

Análise teórica da atuação de canabinoides nas vias metabólicas do câncer de mama por meio da biologia de sistemas e revisão sistemática da literatura

Theoretical analysis of the cannabinoid action in breast cancer metabolic pathways by systems biology and systematic literature review

Jônatan Telles Ramos¹, Vanessa Ferreira Lemos², Scheila de Avila e Silva³

Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais comum e incidente tipo de tumor. Apesar dos avanços significativos no tratamento, permanecem lacunas em relação ao entendimento dos mecanismos de resistência às terapias. Os canabinoides têm demonstrado significativa atuação no tratamento de tumores mamários, tanto em culturas celulares como em modelos vivos. Dado o perfil heterogêneo deste tipo de tumor e a complexidade do potencial terapêutico dos canabinoides, é necessária a identificação de vias metabólicas de atuação destes compostos, para a elaboração de medicamentos no combate a doenças como o câncer de mama. Neste trabalho, buscou-se, por meio de uma Revisão Sistemática da Literatura e dados obtidos na base de dados StringDB, explicar o papel de atuação do canabidiol em células MDA-MB-231 de câncer de mama. Identificou-se que a clássica via de sinalização JAK-STAT pode ser uma via crucial para a atuação do canabidiol no câncer de mama, tendo em vista que a proteína STAT3 pode ser ativada por receptores acoplados a proteína G, que são alvos de modulação alostérica negativa do canabidiol. Conclui-se que o efeito do canabidiol em seus respectivos receptores pode promover a modulação dos mesmos e consequentemente a não ativação de STAT3.

Palavras-chave: Câncer de mama. Canabidiol. Gpcr. STAT3.

Breast cancer is the most common and incident kind of tumor. Despite the significant advances on treatment, there are gaps regarding the understanding of the therapy resistance mechanisms. The cannabinoids have shown considerable activity in breast tumors treatment of both *in vitro* and *in vivo*. Given the heterogenic profile of this kind of tumor, and the complexity of the therapeutical potential of the cannabinoids, it is necessary to identify the acting metabolic pathways of these compounds for the development of medicines to treat diseases like breast cancer. In this paper, through a systematic literature review and data obtained at the StringDB database, it was aimed to explain the role of the cannabidiol cannabinoid on MDA-MB-231 breast cancer cells. It was found that the classic JAK-STAT pathway can be crucial for cannabidiol acting on breast cancer, knowing that the STAT3 protein can be activated through G-protein coupled receptors, which are a negative allosteric modulation target from cannabidiol. It was concluded that the cannabidiol's effect on its respective receptor can promote their modulation and, as consequence, the non-activation of STAT3.

Keywords: Cannabinoids. Breast cancer. Cannabidiol. Gpcr. STAT3.

Autor Correspondente: Jônatan Telles Ramos

E-mail: jtramos@ucs.br

Declaração de Interesses: Os autores certificam que não possuem implicação comercial ou associativa que represente conflito de interesses em relação ao manuscrito.

¹ Universidade de Caxias do Sul

² Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande Sul

³ Universidade de Caxias do Sul

INTRODUÇÃO

Preparados com *Cannabis sativa* L. têm sido utilizados por muitos séculos como fonte de fibras, alimento e óleo, assim como de maneira recreacional e medicinal (1). Entretanto, as estruturas químicas de seus compostos únicos – os canabinoides – não foram elucidadas até os anos 1960. Três décadas depois, os primeiros indícios sobre a ação molecular destes compostos foram estabelecidos, o que levou a uma expansão da pesquisa básica sobre canabinoides e estudos dos efeitos terapêuticos destes compostos em vários campos, incluindo o campo da oncologia (2). Até a data presente, nove medicamentos à base de *C. sativa* podem ser prescritos para diferentes tratamentos e condições específicas. Dentre eles, cinco possuem comprovada ação no tratamento de sintomas oriundos do câncer (3).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), é possível definir como câncer mais de cem tipos de doenças, todas apresentam em comum a capacidade de as células proliferarem de forma desordenada, invadindo órgãos e tecidos com a possibilidade de disseminarem-se para distintas regiões do organismo, mediante um processo denominado metástase (4).

O câncer de mama, além de ser diagnosticado com maior frequência, é a principal causa de morte por câncer dentre as mulheres do mundo todo (5). Para o Brasil, estimaram-se cerca de 60 mil novos casos no biênio 2018-2019, o que contribuiu para colocar este tipo de câncer, excluindo-se a Região Norte, como o mais comum em todo território nacional (4). Em 2018, foram estimados mais de dois milhões de novos casos e cerca de 627.000 mortes por câncer de mama em todo o mundo (5).

Avanços na área das Biociências permitiram um novo desenho para os mapas genômicos da taxonomia tumoral, que transitou da histologia para os níveis genéticos. Além disso, avanços nos tratamentos, com o desenvolvimento de novos fármacos e marcadores moleculares para determinados tipos de tumores, trouxeram progressos na área da oncologia (6). No entanto, apesar dos avanços significativos tanto no diagnóstico como no tratamento, muitas lacunas permanecem do ponto de vista clínico e científico. Estas estão relacionadas à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento, além do entendimento dos mecanismos de resistência às terapias (7).

O câncer de mama divide-se em classes moleculares que são caracterizadas através dos perfis de expressão gênica, os chamados (i) *basal like*, que correspondem majoritariamente ao perfil triplonegativo, ou seja, não possui expressão de receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e nem o gene HER2; (ii) *luminal* predominantemente positivo para ER; e os tumores (iii) *HER2⁺*, os quais apresentam amplificação e altos níveis de expressão do gene HER2, também conhecido como ERBB2 que codifica o fator de crescimento epidermal (7).

Este câncer tem um caráter heterogêneo e apresenta-se como em outras desordens fisiológicas, por exemplo, aquelas relacionadas à imunidade, nas quais os processos biológicos não são controlados unicamente por proteínas individuais ou por vias lineares discretas e desconectadas, mas por uma rede complexa de interações moleculares em nível de sistema (8). Desse modo, entender como essas redes de interações moleculares originam processos biológicos emergentes e identificar os nós fundamentais para controlá-los, contribui para o entendimento de fenótipos complexos em saúde e doença (9). Assim, o desenvolvimento de drogas eficazes requer a identificação das vias moleculares alteradas nas células tumorais, bem como a compreensão do papel que o fármaco exerce sobre as respectivas vias moleculares. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar, por meio de uma busca bibliográfica, os mecanismos pelos quais o canabinoide canabidiol (CBD) atua na expressão de exossomos e microvesículas (EMVs) em células de câncer de mama do tipo *basal like*.

CANABINOIDES E EXOSSOMOS E MICROVESÍCULAS (EMVS) EM MDA-MB-231

As suposições iniciais para o desenvolvimento do presente trabalho foram baseadas no trabalho realizado por Kosgodage et al. (10) intitulado *Cannabidiol (CBD) is a Novel Inhibitor for Exosome and Microvesicle (EMV) Release in Cancer*. Neste trabalho, os autores identificaram uma significativa redução na liberação de EMVs em células MDA-MB-231 de câncer de mama do tipo *basal like* tratadas com diferentes concentrações de CBD.

Adicionalmente, o trabalho mostra evidências que isto pode estar associado com mudanças na função mitocondrial, incluindo a modulação da expressão das proteínas associadas à mitocôndria proibitina e STAT3.

Exossomos são vesículas extracelulares secretadas pelas células no fluido corporal com tamanho entre 30nm e 120nm que carregam uma variedade de macromoléculas biológicas como RNA, DNA, proteínas entre outras (11). Dessa maneira, compreende-se que vesículas extracelulares, como os exossomos, atuam como engrenagem na rede de sinalização em organismos multicelulares, capazes de transmitir informações entre e através das células (12). Sobre o papel das vesículas extracelulares em tumores, dentre outras funções, tem se mostrado que EMV's podem agir na progressão tumoral através da promoção da angiogênese e invasão tumoral (13).

A proteína STAT3 pertence à família dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT), que compreende sete membros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6). Eles variam conforme seu tamanho, que abrange entre 750 e 850 aminoácidos e, com base em suas funções, a família STAT pode ser dividida em dois grupos. O primeiro grupo inclui o STAT2, STAT4 e o STAT6, este grupo é ativado através de um pequeno número de citocinas e estão envolvidos no desenvolvimento de Células T e na sinalização de Interferon- γ . O segundo grupo inclui o STAT1, STAT3 e STAT5, que são ativados em diferentes tecidos através de vários ligantes e envolvidos na sinalização de Interferon- γ , desenvolvimento de glândulas mamárias e embriogênese. Este grupo também desempenha um papel importante no controle da oncogênese, desde o controle do ciclo celular a apoptose (14).

O STAT3 é amplamente considerado um oncogene e por isso é objeto de intensos estudos. Uma das características distintivas desse gene é sua capacidade de expressar contrastantes efeitos sob diferentes condições. Particularmente, têm se mostrado atividades pró-oncogênicas ou atividades de supressão tumoral de acordo com diferentes tipos etiológicos de tumor e ambiente mutacional (15).

Proibitinas: um grupo altamente conservado de proteínas que são ubiquamente expressas em muitos tipos de células e estão localizadas principalmente na mitocôndria, núcleo e membrana plasmática. As proibitinas possuem um domínio SPFH (Estomatina, Proibitina, Flotilina e HflK/C) na sua porção amino-terminal, possuindo um domínio transmembrânico. Esse domínio permite que a proibitina associe-se a lipídios, além de ancorar-se à membrana plasmática. Na sua porção carboxi-terminal há uma repetição de glutamato e alanina, importante para a formação de oligômeros (16).

Desta maneira questionou-se qual o tipo relação existente entre o CBD e as células de câncer MDA-MB-231, que leva à diminuição das proteínas STAT3 e proibitinas nessas células. Uma das possibilidades seria a capacidade do CBD de deformar estruturalmente estas proteínas, levando a não ocorrência das mesmas nos testes específicos.

METODOLOGIA

Tomando como motivação os resultados apresentados por Kosgodage et al. (10), os quais apresentaram redução da liberação de EMV's em células de câncer de mama tratadas com CBD, buscou-se descrever os mecanismos que conectam a liberação de EMV's, com a expressão das proteínas STAT3, afim de esclarecer a via metabólica de atuação do referido canabinoide nas células de câncer de mama. Para isso, optou-se pela metodologia de revisão sistemática da literatura (RSL) (17) e elaboração de modelo teórico com auxílio das informações contidas na base de dados StringDB (18).

A execução da RSL ocorreu primeiramente com a definição das bases eletrônicas indexadas MEDLINE/Pubmed e Scopus, que foram escolhidas considerando sua relevância e abrangência de títulos na área da saúde. As publicações em ambas bases de dados foram identificadas pela seguinte estratégia de busca: (((((cannabis) OR cannabinoids) OR CBD) OR THC)) AND (((("breast cancer") OR "breast neoplasms") OR "breast carcinoma") OR BRCA1) OR BRCA2). Por conseguinte, definiram-se os critérios de inclusão e exclusão (Figura 1).

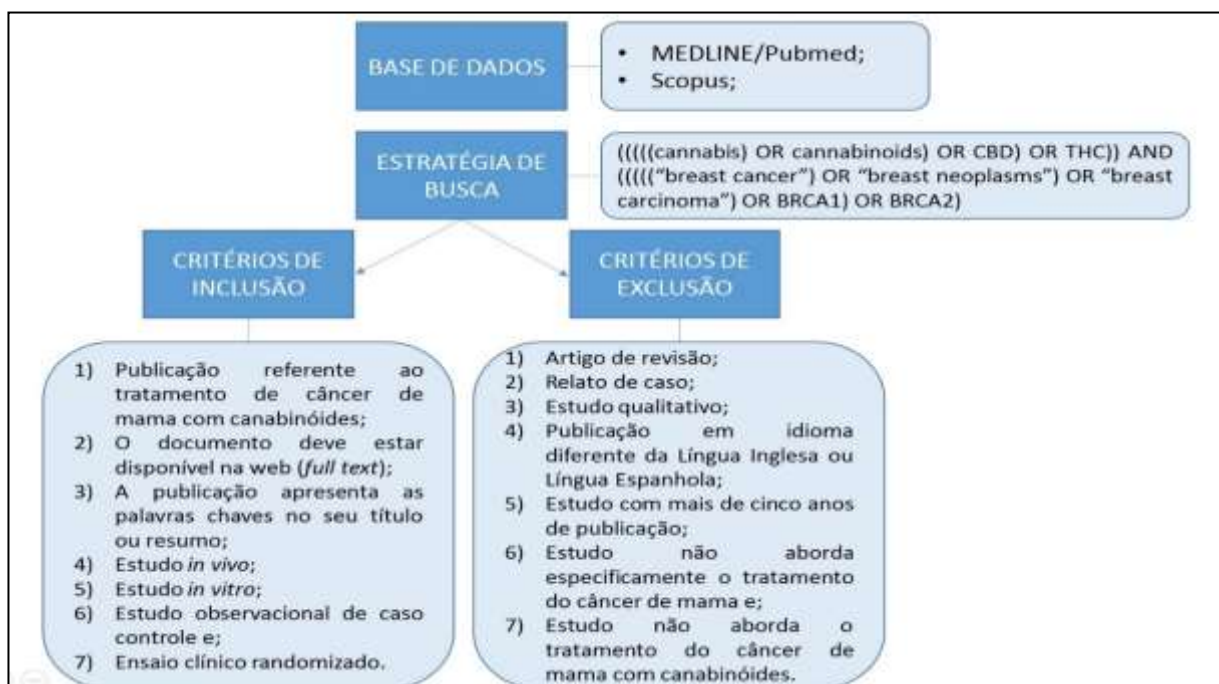


Figura 1 - Metodologia usada para execução da Revisão Sistemática da Literatura.

A finalidade da plataforma StringDB é a exibição de redes de interações proteína-proteína, a qual está disponível online no endereço (string-db.org). Nesse sentido, para o presente trabalho a plataforma foi utilizada por meio da inserção da proteína alvo STAT3 no campo de busca específico do StringDB, tendo como organismo de ocorrência o *Homo sapiens*. As configurações selecionadas foram a exibição de no máximo cinco interações diretas, nível de confiança por interações de 90% e exibição de interações de ações moleculares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do resultado inicial obtido através da estratégia de busca da RSL, o qual apresentou 378 artigos, destes, 11 foram selecionados para a leitura integral e extração de dados. Dentre os artigos selecionados, abordam-se o uso de canabinóides oriundos da planta, canabinóides sintéticos e preparação botânica de substâncias (PBS) para o tratamento do câncer de mama, sendo o CBD o

canabinoide vegetal mais utilizado nos estudos. Todos os tipos moleculares de câncer de mama são abordados, contudo a maior prevalência é do tipo *Basal like* (triplo-negativo), o qual é abordado em dez estudos. Dentre os estudos obtidos, todos abordam pesquisas *in vitro* e foram analisados os efeitos de atuação dos canabinoides em treze linhas celulares tumorais distintas. Além disso, quatro estudos abordam também ensaios *in vivo*, os quais utilizaram camundongos fêmeas. Estes dados, bem como a via de atuação identificada em cada estudo, estão sintetizados no Quadro 1.

Quadro 1 - Sintetização dos dados extraídos na Revisão Sistemática da Literatura.

TÍTULO-AUTORES	LINHA CELULAR	CANABINOIDE	TIPO MOLECULAR DE CÂNCER	VIA DE ATUAÇÃO
Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer - Elbaz M et al. (19)	a) SUM159; b) 4T1.2; c) SCP2; d) MVT-1; e) MDA-MB-231; f) RAW264.7;	CBD	<i>Basal like</i>	EGF/EGFR
Cannabidiol (CBD) Is a Novel Inhibitor for Exosome and Microvesicle (EMV) Release in Cancer - Kosgodage U. S. et al. (10)	MDA-MB-231	CBD	<i>Basal like</i>	Funções da mitocôndria
Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer - Murase R. et al. (20)	a) MDA-MB-231; b) MDA-MB231-luc-D3H2LN; c) 4T1;	CBD	<i>Basal like</i>	Expressão do gene Id1
Cannabidiolic acid-mediated selective down-regulation of c-fos in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness - Takeda S. et al. (21)	MDA-MB-231	CBDA	<i>Basal like</i>	Expressão do gene c-fos
Delta(9) -THC modulation of fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) gene expression: possible involvement of induced levels of PPARalpha in MDA-MB-231 breast cancer cells - Takeda S. et al. (22)	MDA-MB-231	Δ 9-THC	<i>Basal Like</i>	Expressão PPAR α e FA2H
Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in	a) MDA-MB-231; b) T-47D;	CBD	a) <i>Basal like</i> ; b) <i>Luminal</i> ;	Expressão das proteínas

TÍTULO-AUTORES	LINHA CELULAR	CANABINOIDE	TIPO MOLECULAR DE CÂNCER	VIA DE ATUAÇÃO
breast cancer cell lines - Sultan A. S. et al. (23)				mTOR-Ciclina D1 e PPAR γ
Appraising the "entourage effect": Antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer - Blasco-benito S. et al. (24)	a) MCF-7; b) T-47D; c) BT474; d) HCC1954; e) MDA-MB-231; f) SUM159;	Δ 9-THC E PREPARAÇÃO BOTÂNICA DE CANNABIS	a) <i>Basal like</i> ; b) <i>Luminal</i> ; c) <i>HER2⁺</i>	-
Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells - Takeda S. et al. (25)	MDA-MB-231	CBDA	<i>Basal like</i>	Expressão de COX-2, Id-1 e SHARP1
Combined Antiproliferative Effects of the Aminoalkylindole WIN55,212-2 and Radiation in Breast Cancer Cells - Emery S. et al. (26)	a) MCF-7; b) MDA-MB-231; c) MCV-10A; d) 4T1;	WIN55,212-2	<i>Basal like</i>	Sinalização Esfingosina-1-fosfato
The use of Styrene Maleic Acid Nanomicelles encapsulating the synthetic cannabinoid analog WIN55,212-2 for the treatment of cancer - Xian S. et al. (27)	a) MDA-MB-231; b) MCF-7;	WIN55,212-2	a) <i>Basal like</i> ; b) <i>Luminal</i> ;	-
Modulation of breast cancer cell viability by a cannabinoid receptor 2 agonist, JWH-015, is calcium dependent - Anderah et al. (28)	a) 4T1; b) MCF-7;	JWH-015	<i>Luminal</i>	Via MAPK/ERK

A partir da análise dos resultados, tomou-se como ponto de partida algumas evidências mostradas por Kosgodage et al. (10), especificamente em relação às modulações da expressão da proteína STAT3 em células MDA-MB-231 de câncer do tipo *basal like*. Utilizando a base de dados StringDB, evidenciou-se que a proteína STAT3 constitui a via de sinalização JAK-STAT. Através de suas interações, as proteínas tirosina-quinase não receptoras JAK1, JAK2 e JAK3, ligam-se à proteína STAT3 e promovem sua ativação. Esta por sua vez, transloca-se para o núcleo e promove a expressão de EGFR, Il-6 e Il-10, conforme apresentado na Figura 2.

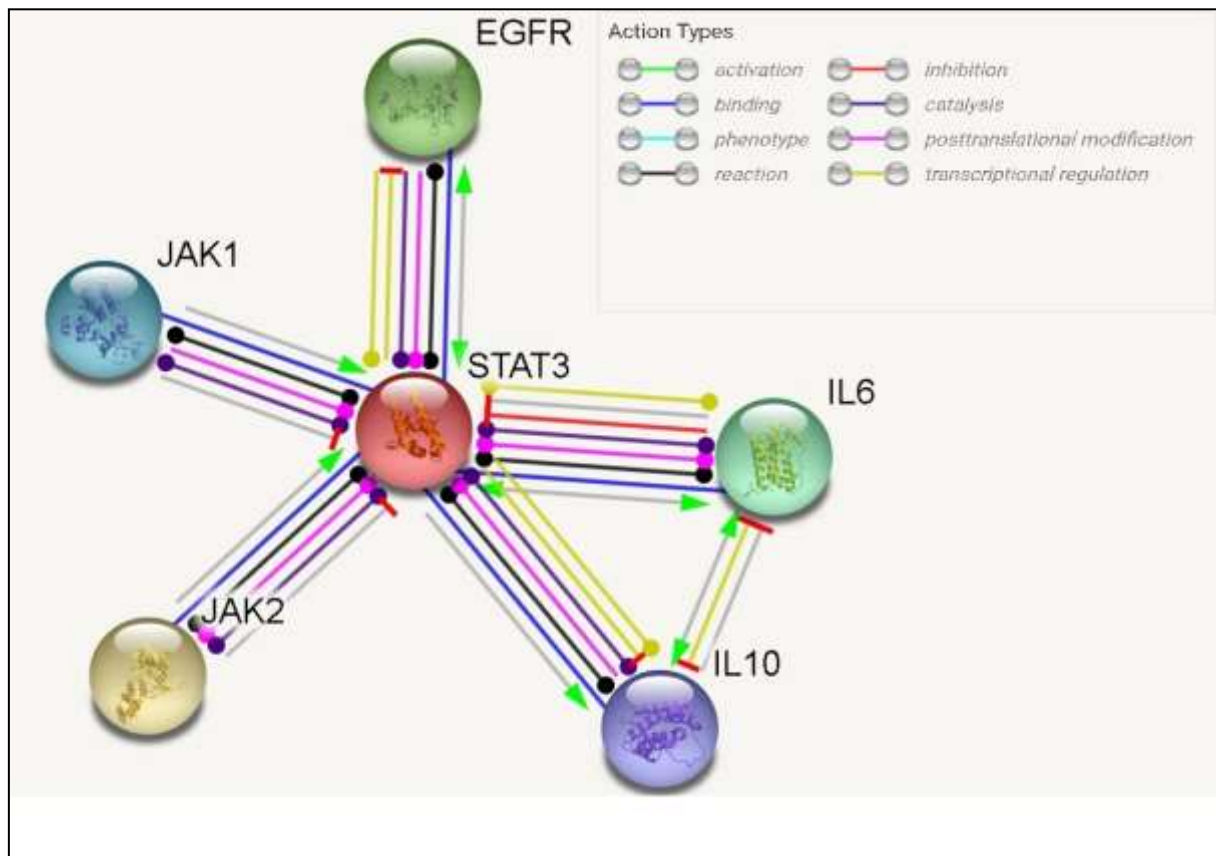


Figura 2 - O nóculo central representa a proteína STAT3 e os demais nóculos representam suas interações diretas. Apresentação de todas as funções moleculares possíveis entre essas proteínas em diferentes vias metabólicas. A interação prevalente dependerá do momento celular e/ou estímulos ambientais.

A VIA DE SINALIZAÇÃO JAK-STAT

Kosgodage et al. (10) evidenciaram que células MDA-MD-231 tratadas com CBD tiveram alterações na modulação da expressão da proteína STAT3, as quais também apresentaram expressão reduzida. As proteínas STAT são ativadas pela via de sinalização Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK/STAT). Esta via foi descoberta através de experimentos que visavam inicialmente estudar a ativação da transcrição induzida por $\text{INF-}\alpha$ e $\text{INF-}\gamma$ (29).

As proteínas STAT possuem uma estrutura modular com domínios altamente definidos, que incluem o domínio N-terminal, um domínio de ligação do DNA, um domínio conector, o domínio SH2 e o domínio de transativação C-terminal, que são mostrados na Figura 3. Cada um desses domínios é importante para as funções fisiológicas das proteínas STAT (14). O domínio SH2 interage com sítios de fosforilação de tirosina das JAKs para recrutar STATs para os receptores da membrana. Após a fosforilação da tirosina, ocorre a dimerização entre os domínios SH2 e o domínio contendo a fosfotirosina localizada na região C-terminal (30).

As proteínas JAK são quinases relativamente grandes com cerca de 1150 aminoácidos e com peso molecular variando entre 116-140 kDa. Tem como característica principal a presença de dois domínios homólogos chamados domínios JH1 e JH2 (30). O domínio JH1 é um domínio funcional tirosina-quinase e o domínio JH2 que carece de atividade observável de tirosina-quinase, é chamado de domínio pseudo-quinase. Além desses, há o domínio SH2 e o domínio FERM (14). Os domínios FERM e JH1,

também conhecidos como porção N-terminal e C-terminal, possuem suas funções descritas, enquanto as funções dos outros domínios são pouco descritas. Sabe-se que o domínio FERM desempenha papel na interação das JAK com os receptores de membrana e o domínio JH1 nas funções catalíticas (30).

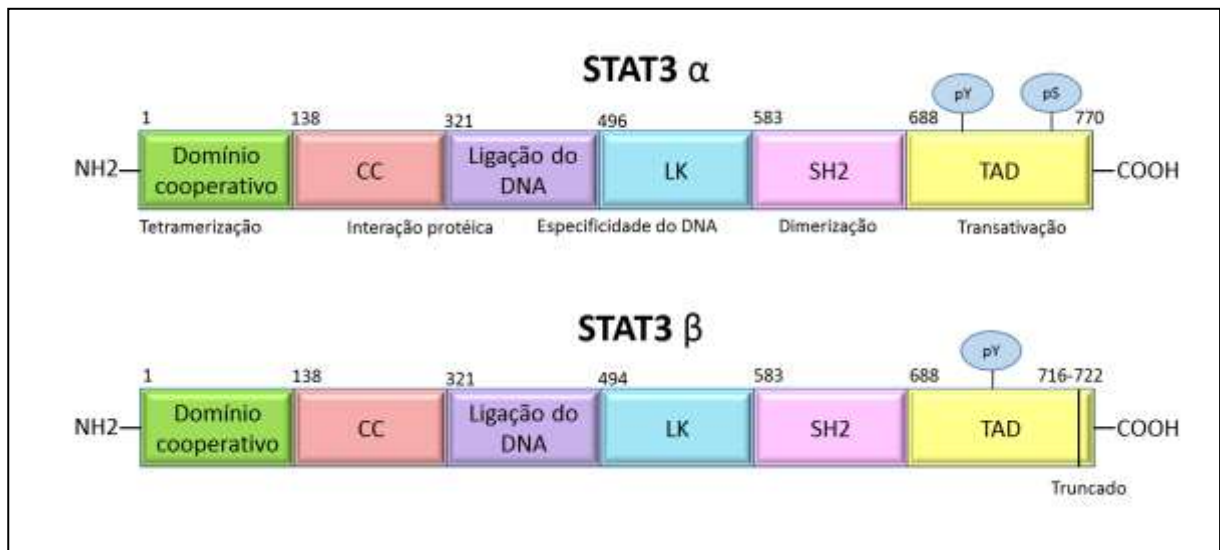


Figura 3 - Adaptado de Subramaniam et al., 2017 (14). Isoformas da proteína STAT3. O domínio N-terminal medeia a interação dímero-dímero STAT para formar um tetrâmero. Essa interação é essencial para estabilizar a ligação dos dímeros ao DNA. O domínio de ligação do DNA faz contato físico com elementos de resposta STAT3 em promotores de genes alvo e está ligado ao domínio de homólogo Src2 (SH2) através do domínio de ligação. A fosforilação do resíduo de tirosina na região de dimerização medeia a interação com o domínio SH2 de outro dímero que estabiliza a formação de dímeros de STAT. A variante STAT3 β contém uma deleção do terminal COOH resultando em um quadro de leitura aberto alterado. Esta isoforma truncada dimeriza-se e se liga ao DNA, mas não consegue ativar a expressão gênica.

A sinalização por JAK/STAT se inicia quando as proteínas JAKs conectam-se ao seu receptor na membrana da célula. No caso das citocinas, seus receptores formam homo ou heterodímeros após se ligarem, iniciando a sinalização. Como as JAKs são associadas aos receptores, com a dimerização destes elas se transfosforilam e fosforilam resíduos de tirosina na porção citoplasmática do receptor, criando ancoradouros para a porção SH2 das STATs. Após se ligarem aos receptores, as STATs são fosforiladas pelas JAKs. Assim ativadas, STATs se dissociam do receptor, dimerizam-se e translocam-se para o núcleo onde se ligam ao DNA e regulam a expressão gênica (31).

Sabe-se que a via JAK/STAT é ativada por mais de 50 citocinas e fatores de crescimento, estando associada a diversas funções celulares (30). Além disso, a ativação da via JAK/STAT possibilita a transcrição de vários proto-oncogenes, incluindo c-myc, ccnd1 e VEGF, sendo uma via crucial da migração celular e metástase do câncer (32).

ATIVAÇÃO DE STAT3

A sinalização de STATs é crítica para diversos processos celulares normais, como: desenvolvimento embrionário, organogênese, imunidade inata e adaptativa e regulação de diferenciação, crescimento e apoptose celular. Em células normais, a ativação de proteínas STAT3 é estritamente controlada para prevenir regulação gênica desprogramada, enquanto a ativação constitutiva de STAT3 foi detectada em um grande número de linhas celulares de câncer humano e tumores primários (14).

A atividade canônica de STAT3 como um fator de transcrição depende principalmente da fosforilação mediada por JAK, o que torna possível que os dímeros de STAT3 se concentrem no núcleo, liguem-

se no DNA e ativem a transcrição (15). No entanto, novos esclarecimentos acerca de diferentes maneiras de ativação de STAT3 estão sendo elucidados, corroborando para a compreensão do funcionamento desta proteína.

Receptores de citocina, cuja função é receber citocinas da família da Il-6, são os mais conhecidos ativadores de STAT3. Proteínas tirosina-quinase receptores (RTKs) também podem catalisar a fosforilação de STAT3 através de sua atividade intrínseca da tirosina-quinase no receptor. As RTKs mais comuns incluem o EGFR, VEGFR, PDGFR e o fator estimulante de colônia 1. Similarmente as RTK, as proteínas quinases não receptores (nRTKs), também podem fosforilar diretamente as STAT3 por meio da transferência de um grupo fosfato do ATP para o resíduo de tirosina da STAT3, as nRTKs mais conhecidas são as SFKs e ABL. Os receptores *Toll-like* (TLR) também ativam diretamente STAT3. Este processo ocorre quando há estimulação do TLR durante a produção de IgG(33). Além destes, têm se mostrado evidências de que receptores acoplados à proteína G (GPCR) são ativadores de STAT3 (34). Adicionalmente, em um contexto patológico, sabe-se que a superexpressão de GPCRs está associada a muitos aspectos de câncer de mama, incluindo crescimento tumoral, invasão, migração, sobrevivência, metástase e angiogênese (35). As múltiplas vias de ativação da STAT3 são mostradas na Figura 4.

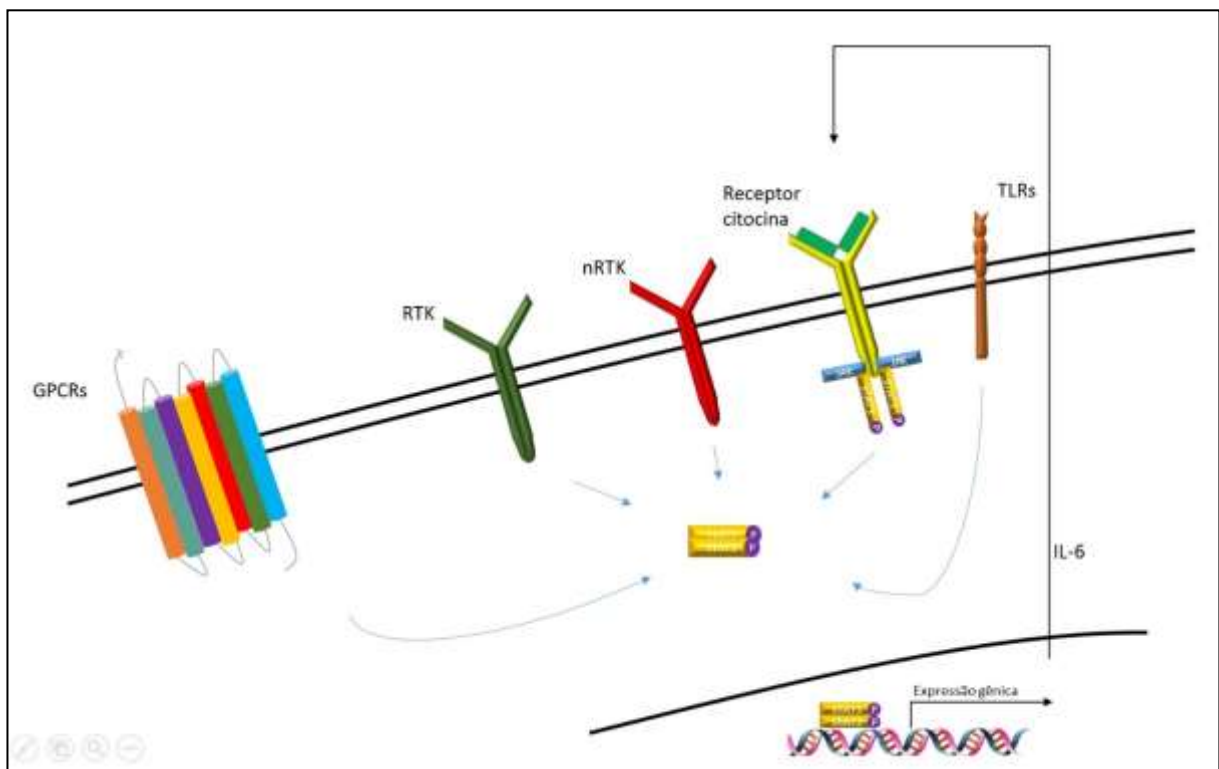


Figura 4 - Figura 4. Adaptado de Yuan, Zhang e Niu, 2015(33). Múltiplas vias de ativação de STAT3.

STAT3 E GPCRS

GPCRs são a ampla família de proteínas transmembranas, que medeiam a transdução do sinal do espaço extracelular para o interior da célula. GPCRs não transmitem sinais apenas através de mensageiros secundários, mas também de fatores de transcrição (33). Um diverso número de ligantes como íons inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, esteroides, lipídios, nucleotídeos, nucleosídeos, aminas biogênicas entre outras moléculas podem estimular GPCRs e levar à transdução de sinais extracelulares em mensagens intracelulares (35).

Tradicionalmente os GPCRs não são associados com a ativação de STAT3, porém descobertas recentes evidenciam esta ativação e compreende-se que a mesma parece exigir JAKs (33). Recentemente, JAKs e STATs foram identificadas como novos efetores à jusante de diferentes proteínas G heterotrômicas, como é o caso dos GPCRs Angiostesina II e o receptor 1 da esfingosina-1-fosfato (S1PR1) (33). Especificamente, sobre a relação entre GPCRs e STAT3, Lee et al. (36), evidenciaram que S1PR1 induz a ativação persistente de STAT3, mostrando que neste mecanismo ocorre um *feedback* positivo, tendo em vista que muitas citocinas e fatores de crescimento, como o VEGF, o EGF, dentre outros, que são conhecidos por interagir com a via de sinalização S1P-S1PR1, também são ativadores de STAT3, que por sua vez, quando ativadas, promovem a produção destas moléculas (36). Além deste, evidenciou-se que os receptores de procinetina 1 e 2, os GPCR, são capazes de ativar STAT3 em células mieloides malignas e normais (37).

CBD E GPCR

Com base nas propriedades dos canabinoides em inibir inflamação e bloquear a proliferação celular, tem sido investigadas suas aplicações como drogas antitumorais. Adicionalmente, o crescente número de relatos sobre o papel dos receptores de canabinoides nas células tumorais sugere que canabinoides com propriedades diferentes, que podem tanto bloquear ou ativar receptores canabinoides, podem ser úteis no tratamento de câncer (38). De fato, diversos canabinoides têm demonstrado inibição de crescimento de muitos tipos de tumores tanto *in vitro* como *in vivo*, onde os receptores canabinoides CB1 e CB2 mediam parte deste efeito e, particularmente em câncer de mama é amplamente reportada a superexpressão de CB2(3).

Singularmente, o CBD atua como um modulador alostérico da atividade dos receptores CB1 e CB2. Moduladores alostéricos geralmente fornecem modulação negativa tanto na enzimologia quanto na farmacologia e estudos recentes mostram que o CBD atua como modulador alostérico negativo na sinalização mediada tanto por CB1 quanto por CB2 (39,40). Os receptores CB1 e CB2 são GPCR e pertencem a superfamília dos receptores transmembrana. A distribuição destes receptores em distintos tecidos permite um efeito celular seletivo e específico da ativação do receptor. Contudo, é elevada a presença de ambos receptores em diversos tecidos tumorais, e embora o mecanismo de ação ainda não seja completamente elucidado, é bem estabelecido que o CB2 desempenha um papel crucial na carcinogênese e progressão tumoral (38).

CONCLUSÃO

Com base na Revisão Sistemática da Literatura, pôde-se compreender de melhor maneira a interação dos canabinoides no câncer de mama, bem como suas vias de atuação. Este trabalho limitou-sena ação do canabidiol CBD e sua atuação por meio da via clássica de sinalização JAK/STAT. A ativação da proteína STAT3 é tradicionalmente mediada por proteínas JAK, que por sua vez se conectam ao seu receptor na membrana. Compreendeu-se, no entanto, que receptores associados a proteína G, que são receptores de canabinoides como o CBD, são ativadores de STAT3.

Considerando que o CBD atua como um modulador alostérico e que essa modulação é frequentemente negativa, levanta-se a hipótese a ser estudada futuramente, de que em células MDA-MB-231 de câncer de mama, o CBD atua como modulador alostérico negativo em seus receptores, não permitindo que os mesmos ancoram proteínas JAKs, impedindo a ativação de proteínas STAT3 e, dessa maneira, impossibilitando sua translocação para o núcleo e expressão de seus genes alvo, como EGFR. Conforme demonstrado aqui, há relatos nos quais GPCRs como S1PR1 e procinetina 1 e 2 são ativadores

persistentes de STAT3, que por sua vez contribui para regulação positiva de muitos genes críticos para invasão, mobilização de células tumorais e angiogênese tumoral.

Em relação ao trabalho de Kosgodage et al. (10) apresentado no desenvolvimento deste estudo, levando em consideração os resultados obtidos nesta análise teórica, conclui-se que esforços futuros devem ser empenhados para compreender melhor a relação entre as proteínas STAT3, os EGFR e a produção de exossomos e microvesículas.

Acerca da hipótese levantada ao longo do trabalho, a qual sugeriu que a ação do CBD nas células MDA-MB-231 de câncer de mama poderia deformar estruturalmente as proteínas STAT3, fato que levaria a uma redução da expressão destas proteínas nas respectivas células, como evidenciado pelos autores, não se pode afirmar ou negar esta hipótese através do presente trabalho, carecendo assim de estudos futuros.

Considerando-se que o retorno de artigos obtido das bases de dados a partir da estratégia de busca foi consideravelmente maior que o número de artigos selecionados para análise, assume-se que a utilização da mesma apresentou limitações, onde os termos utilizados foram demasiadamente genéricos.

Sugere-se que futuros trabalhos dentro do tema em questão busquem a compreensão da atuação dos canabinoides na via de sinalização JAK-STAT num âmbito prático. Especificamente, indica-se que sejam realizados estudos futuros a fim de elucidar a modulação do canabidiol em células neoplásicas através da proteína STAT3.

Em relação às proteínas STAT3, os EGFR e a produção de microvesículas e exossomos, sugere-se que estudos futuros sejam desenvolvidos a fim de compreender como ocorre essa interação e de que maneira os canabinoides podem interagir com estas moléculas e substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) BONINI, Sara Anna et al. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 227, p. 300-315, set. 2018.
- (2) VELASCO, Guillermo; SÁNCHEZ Cristina; GUZMÁN, Manuel. Cancer. In: PERTWEE, Roger G. (Ed). **Handbook of Cannabis**. 1. ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2014. Cap. 35, p. 626-643.
- (3) FRAGUAS-SÁNCHEZ, Ana Isabel; TORRES-SÁNCHEZ, Ana Isabel. Medical use of Cannabinoids. **Drugs**. [s.l.], v. 78, n. 16, p. 1665-1703, nov. 2018.
- (4) INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 3 ed. rev. atual. Rio de Janeiro. 2017. 108 p.
- (5) HANKINSON, Susan E.; POLYAK, Kornelia; GARBER, Judy E. Multiple, often complex, risk factors. In: STEWART, Bernard W. (Ed.); WILD, Christopher P. (Ed.); WEIDERPASS, Elisabete (Ed.). **World Cancer Report 2020**. 1. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020. cap.5, p. 382-393.
- (6) CALDEIRA, Izabela Daniel Sardinha. **Papel da nova citocina FAM3B/PANDER na progressão tumoral em câncer de mama**. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- (7) ROCHA, José Cláudio Casali de; RAMIREZ Ricardo; COSTA, Susanne Cocramo Ventilari da. Câncer de Mama. In: FERREIRA, Carlos Gil (Ed.); ROCHA, José Cláudio Casali da. (Ed.). **Oncologia Molecular**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. Cap. 16, p. 217-225.

- (8) GARDY, Jennifer L. et al. Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 249-262, jun. 2009.
- (9) BARABÁSI, Albert-lászló; GULBAHCE, Natali; LOSCALZO, Joseph. Network medicine: a network-based approach to human disease. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 56-68, 17 dez. 2010.
- (10) KOSGODAGE, Uchini S. et al. Cannabidiol (CBD) Is a Novel Inhibitor for Exosome and Microvesicle (EMV) Release in Cancer. **Frontiers in Pharmacology**. [s.l.], v. 9, p. 889, 13 ago. 2018.
- (11) PULLAN, Jessica E. et.al. Exosomes as Drug Carriers for Cancer Therapy. **Mol. Pharmaceutics**. [s.l.], v. 16, p. 1789-1798, 5 abr. 2019.
- (12) VALADI, Hadi et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 654-659, 7 maio 2007.
- (13) RASHED, Mohammed H. et. al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**. [s.l.], v. 18, p. 538, 2 mar. 2017.
- (14) SUBRAMANIAM, Aruljothi et al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, [s.l.], v. 1835, n. 1, p. 46-60, jan. 2013.
- (15) AVALLE, Lidia et al. STAT3 in cancer: A double edged sword. **Cytokine**, [s.l.], v. 98, p. 42-50, out. 2017.
- (16) JUNIOR, Tharcísio C. T. **Proibitina e a resposta a mecanismos de estresse em melanoma e sua relação com a via E2F1**. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- (17) BRASIL: Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados**. Brasília, DF, 2012. 92 p.
- (18) SZKLARCZYK, Damian et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, [s.l.] v. 45, p. 362-368, out. 2016.
- (19) ELBAZ, Mohamad et al. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: Novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. **Molecular Oncology**, [s.l.] v. 9, n. 49, p. 906-61, jan. 2015.
- (20) MURASE, Ryuichi et al. Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. **Frontiers in Pharmacology**. [s.l.], v. 171, p. 4464-4477, jun 2014.
- (21) TAKEDA, Shuso et al. Cannabidiolic acid-mediated selective down-regulation of c-fos in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. **Journal Of Natural Medicines**, [s.l.], v. 71, n. 1, p. 286-291, 16 ago. 2016.
- (22) TAKEDA, Shuso et al. Δ 9-THC modulation of fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) gene expression: Possible involvement of induced levels of PPAR α in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Toxicology**, [s.l.], v. 326, p. 18-24, dez. 2014.

- (23) SULTAN, Ahmed S.; MARIE, Mona A.; SHEWEITA, Salah A. Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. **The Breast**, [s.l.], v. 41, p. 34-41, out. 2018.
- (24) BLASCO-BENITO, Sandra et al. Appraising the “entourage effect”: Antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 157, p. 285-293, nov. 2018.
- (25) TAKEDA, Shuso et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells. **The Journal of Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 39, n. 5, p. 711-716, 2014.
- (26) EMERY, S. M. et al. Combined Antiproliferative Effects of the Aminoalkylindole WIN55,212-2 and Radiation in Breast Cancer Cells. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 348, n. 2, p. 293-302, 20 nov. 2013.
- (27) XIAN, Susan et al. The Use of Styrene Maleic Acid Nanomicelles Encapsulating the Synthetic Cannabinoid Analog WIN55,212-2 for the Treatment of Cancer. **Anticancer research**, [s.l.], v. 35, n. 9, p. 4707-4712, set. 2015.
- (28) ANDERAH, Todd et al. Modulation of breast cancer cell viability by a cannabinoid receptor 2 agonist, JWH-015, is calcium dependent. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s.l.], p. 59-59, abr. 2016.
- (29) DARNELL, J.E.; Jr., KERR, I.M.; STARK, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, [s.l.], v. 264, p. 1415–1421, 3 jun. 1994.
- (30) FREITAS, Maria C. S. **Avaliação do papel da proteína tirosina-kinase janus kinase 2 (JAK2) em modelo murinho de lesão hepática induzida por isquemia e reperfusão**. Tese (Doutorado)-Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- (31) MURRAY, P. J. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 178, n. 5, p. 2623-2629, 20 fev. 2007.
- (32) KIM, Ji et al. Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. **Oncology Letters**, [s.l.], p. 3981-3989, 20 fev. 2019.
- (33) YUAN, Jie; ZHANG, Fei; NIU, Ruifang. Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 17663, 3 dez. 2015.
- (34) YU, Hua et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.736-746, 24 out. 2014.
- (35) LAPPANO, Rosamaria; JACQUOT, Yves; MAGGIOLINI, Marcello. GPCR Modulation in Breast Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 12, p. 3840-3840, 2 dez. 2018.
- (36) LEE, Heehyoung et al. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 1421-1428, 21 nov. 2010.
- (37) XIN, Hong et al. G-protein-coupled Receptor Agonist BV8/Prokineticin-2 and STAT3 Protein Form a Feed-forward Loop in Both Normal and Malignant Myeloid Cells. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 288, n. 19, p. 13842-13849, 2 abr. 2013.
- (38) KISKOVÁ, Terézia et al. Future Aspects for Cannabinoids in Breast Cancer Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 7, p. 1673, 3 abr. 2019.
- (39) LAPRAIRIE, R B et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 172, n. 20, p. 4790-4805, out. 2015.

(40) MARTÍNEZ-PINILLA, Eva et al. Binding and Signaling Studies Disclose a Potential Allosteric Site for Cannabidiol in Cannabinoid CB2 Receptors. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 8, p. 744, 23 out. 2017.

Recebido: 18 de maio de 2020

Versão Final: 21 de outubro de 2020

Aprovado: 12 de novembro de 2020



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.