

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

LUCIANA DE FÁTIMA CHAVES DE MELLO ZISCHLER

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE BJ_{cu}L SOBRE O DESTINO DE CÉLULAS DE
CÂNCER COLORRETAL**

CURITIBA

2016

LUCIANA DE FÁTIMA CHAVES DE MELLO ZISCHLER

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE BJcuL SOBRE O DESTINO DE CÉLULAS DE
CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciência da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Selene Elifio-Esposito

Co-orientador: Prof. Dr. Olivier Micheau

CURITIBA

2016

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Zischler, Luciana de Fátima Chaves de Mello
Z81e Efeitos biológicos de BJcuL sobre o destino de células de câncer colorretal /
2016 Luciana de Fátima Chaves de Mello Zischler; orientadora, Selene
Elífilio-Esposito; co-orientador, Olivier Micheau. – 2016.
104 f. : il. ; 30 cm

Registro de Patente no INPI: BR 10 2017 016091 2
Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2016.
Inclui bibliografias

1. Colon (Anatomia) - Câncer. 2. Reto - Câncer. 3. Lectinas. 4. Ubiquitina.
5. Células – Mecanismo de controle. I. Elífilio-Esposito, Selene Lobo . II.
Micheau, Olivier. Pontifícia Universidade Católica Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.994347



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
 Escola de Medicina
 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto Sensu

PUCPR
 GRUPO MARISTA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 07 dias do mês de outubro de 2016, realizou-se a sessão pública de defesa de tese, "EFEITOS BIOLÓGICOS DE BJCuL SOBRE O DESTINO DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL" apresentado por Luciana de Fátima Chaves de Mello Zischler para obtenção do título de Doutor; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr ^a Selene Elifio Esposito (PUCPR) – Presidente	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr ^a . Ana Maria Trindade Grégio (PUCPR)	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr ^a . Patrícia Maria Stuelp Campelo (PUCPR)	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr ^a . Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira (Instituto Butantan)	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr ^a . Sheila Maria Brochado Winnischofer (UFPR)	<i>[Assinatura]</i>

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr ^a Selene Elifio Esposito	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. Dr ^a . Ana Maria Trindade Grégio	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. Dr ^a . Patrícia Maria Stuelp Campelo	Conceito: <u>APROVADA</u>
Prof. Dr ^a . Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes	Conceito: <u>APROVADA</u>
Prof. Dr ^a . Sheila Maria Brochado Winnischofer	Conceito: <u>Aprovada</u>

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

[Assinatura]
 Prof. Dr^a Selene Elifio Esposito
 Presidente da Banca Examinadora

[Assinatura]
 Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecolts -Filho
 Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

À Ricardo, meu amado e paciente marido.
Sem o seu apoio, a realização desse trabalho
não teria sido possível. Obrigada!

Aos meus filhos, Renata e Henrique. Que
agora eu possa recuperar parte do tempo que
passou sem que eu percebesse. Vocês
cresceram! E que vocês tenham aprendido
que as ideias devem sair do campo da
imaginação para que se concretizem no
campo da realidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Selene Elifio Esposito, por sua sabedoria, ponderação e conselhos. Sempre presente! Obrigada!

Ao meu co-orientador, Olivier Micheau, não só pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas principalmente, pelo acolhimento incondicional em seu laboratório, pelo apoio quando tudo parecia obscuro. Obrigada por confiar em meu trabalho, tornando-me mais confiante.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

“Chaque personne qui croise notre vie la croise seule mais ne reste pas seule ni nous laisse seul. Il emporte un peu de nous-même, elle laisse un peu d'elle-même”

Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e sua Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo incentivo à formação docente e suporte para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUC-PR, na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. Roberto Pecoits, pelo apoio recebido.

À CAPES, pela concessão da bolsa de PDSE.

Ao Decanato da Escola de Medicina da PUC-PR, na pessoa da Dra. Lídia Ana Zytynski Moura, pelo apoio incondicional e pelo suporte que possibilitou a concretização deste trabalho.

À Profa. Ana Cristina Seixas Greca, coordenadora do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da PUC-PR, pelo companheirismo e compreensão ao longo dessa jornada.

Aos colegas de laboratório no Brasil, em especial Natália Bonan, Marcela Dias-Netipanyj, Nilton França Júnior e Nayara Dotti.

Aos colegas de laboratório na França: Thibault Ratier, Ayméric Morlé, Andrei Constantinescu e Agathe Dubuisson.

*“Se andarmos apenas por caminhos já traçados,
chegaremos apenas onde os outros chegaram.”*

Alexander Graham Bell (1847-1922)

RESUMO

BJcuL é uma lectina tipo-C purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, que se liga especificamente a β -galactosídeos. Efeitos pró-inflamatórios e anti-tumorais têm sido atribuídos a BJcuL, uma vez que ativa neutrófilos e macrófagos, além de diminuir o crescimento de uma série de linhagens celulares tumorais. Recentemente, BJcuL foi relacionada à indução de apoptose em células de câncer colorretal HT29 devido ao acúmulo de proteínas pró-apoptóticas da via extrínseca da apoptose, como FADD e caspase 8, sugerindo que esta proteína poderia favorecer a apoptose induzida por TRAIL. Para testar esta hipótese, duas linhagens de células de câncer colorretal, HT29 e HCT116 foram estimuladas com concentrações crescentes de BJcuL (1 μ g/mL - 20 μ g/mL), na presença ou ausência de TRAIL. Entretanto, ao contrário de nossas expectativas, BJcuL não foi capaz de induzir apoptose nestas células, como observado nos ensaios de marcação com Anexina-V/7AAD, ensaio clonogênico e *immunoblotting*. Entretanto, além de induzir acúmulo de FADD e caspase 8, BJcuL também induz acúmulo de proteínas anti-apoptóticas, como c-FLIP, Bcl-2 e survivina, assim como de proteínas poliubiquitinadas. Estimulação prévia com o inibidor de deubiquitinas WP1130 (10 μ M) resultou na diminuição dos níveis de survivina induzidos por BJcuL. Este resultado indica que BJcuL não está inibindo o proteassoma, mas interferindo na ação de deubiquitinas. Juntos, nossos resultados sugerem pela primeira vez, que uma lectina tipo c derivada de veneno de serpente interfere no sistema ubiquitina-proteassoma. Compostos capazes de influenciar o sistema ubiquitina-proteassoma são importantes ferramentas na busca por novos agentes terapêuticos, uma vez que podem elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no balanço entre proteínas pró e anti-apoptóticas, o que é essencial para determinar o destino celular.

Palavras-chave: Lectina do tipo-C. Câncer colorretal. c-FLIP. Bcl-2. Survivina.
Sistema ubiquitina-proteassoma

ABSTRACT

BJcuL is a C-type lectin purified from the venom of *Bothrops jararacussu*, which binds specifically to β -D-galactosides. Pro-inflammatory and antitumor effects have been related to BJcuL, as it activates neutrophils and macrophages, besides decreasing growth in different tumor cell lines. Recently, it was found that BJcuL is able to induce accumulation of pro-apoptotic proteins of the extrinsic pathway, such as FADD and caspase-8, in the colorectal cancer cell line HT29, suggesting that this lectin may be able to enhance TRAIL-induced apoptosis. To test this hypothesis, two colorectal cancer cell lines, HT29 and HCT116, were stimulated with increasing concentrations of BJcuL (1-20 μ g/mL) in presence or absence of TRAIL. Contrary to our expectations, however, BJcuL was found to be unable to induce apoptosis in these cells, as monitored by annexin-V/7AAD, clonogenic assays and immunoblotting. However, besides FADD and caspase-8, BJcuL was also found to induce the accumulation of anti-apoptotic proteins, as c-FLIP, Bcl-2 and survivin, as well as accumulation of poly-ubiquitinated proteins. Previous stimulation with the inhibitor of deubiquitinases WP1130 (10 μ M) resulted in decrease of BJcuL-induced survivin levels. This result indicates that BJcuL is not inhibiting the proteasome, but interfering in the activity of deubiquitinases. Altogether, our results suggest for the first time, that this C-type lectin derived from snake venom exerts effects on the ubiquitin system. Compounds able to influence such system are important tools in the search for new therapeutic targets in cancer or degenerative diseases, since they can elucidate molecular mechanisms engaged in the determination of cell fate.

Key words: Snake venom C-type lectin. Colorectal cancer. c-FLIP. Bcl-2. Survivin. Ubiquitin-proteasome system

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS APOPTÓTICAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA.....	23
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DOS DOMÍNIOS COM HOMOLOGIA À BCL-2 ENTRE AS DIFERENTES PROTEÍNAS QUE COMPÕEM A FAMÍLIA BCL-2.....	25
FIGURA 3 -	INTER-RELAÇÕES ENTRE AS DIFERENTES PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2.....	27
FIGURA 4 -	PASSO A PASSO DO PROCESSO DE UBIQUITINAÇÃO.....	33
FIGURA 5 -	TIPOS DE UBIQUITINAÇÃO DAS PROTEÍNAS-ALVO E SEU SIGNIFICADO BIOLÓGICO NA FISIOLOGIA CELULAR.....	34
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM PROTEASSOMA 26S.....	36
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA IAP HUMANA E SEUS DOMÍNIOS.....	40
FIGURA 8 -	INTERREGULAÇÃO SMAC/DIABLO-XIAP ATRAVÉS DE POLIUBIQUITINAÇÃO POR CADEIAS POLI-UB K48.....	43
FIGURA 9 -	VIA CLÁSSICA DE ATIVAÇÃO DO NFκB.....	50
FIGURA 10 -	VIA NÃO CANÔNICA OU ALTERNATIVA DE NFκB.....	52
FIGURA 1 - artigo	EFFECT OF BJCUL IN THE VIABILITY OF CRC CELLS HT29 AND HCT116 AND MEF CELLS.....	65
FIGURA 2 -	BJCUL RAISES THE LEVELS OF PROTEIN	

artigo	EXPRESSION.....	67
FIGURA 3 -	BJCUL EFFECTS ON UPS	68
artigo		
FIGURA IV –	BJCUL ESTABILIZA OS NÍVEIS DE BCL-	
Apêndice 1	2.....	98
FIGURA V –	ANÁLISE DE SUBSTRATOS FOSFORILADOS POR	
Apêndice 1	PKA EM RESÍDUOS DE SERINA E TREONINA.....	99

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SUBDIVISÃO DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS BCL-2 DE ACORDO COM SUA FUNÇÃO NO CONTROLE DA APOPTOSE.....	26
QUADRO 2 - RECEPTORES DE MORTE DE SUPERFÍCIE CELULAR PERTENCENTES À SUPERFAMÍLIA DOS RECEPTORES DE FATOR DE NECROSE TUMORAL.....	29

LISTA DE SIGLAS

AkT	<i>Protein kinase B</i>
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome complex</i>
Apo-1/Apo1L	<i>Apoptotic antigen 1/Apo1 Ligand</i>
Apo-2/Apo2L	<i>Apoptogenic antigen 2/Apo2 Ligand</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer 1</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma protein 2</i>
Bcl-x	<i>Bcl-2-like 1 protein</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-2-related protein long form of Bcl_x</i>
Bcl-w	<i>Bcl-2-like 2 protein</i>
Bfl-1	<i>Bcl-2 related gene expressed in fetal liver</i>
BH	<i>Bcl-2 Homology Domain</i>
Bid / tBid	<i>BH3-interactin domain / truncated Bid</i>
Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BIR	<i>Baculovirus IAP Repeat</i>
BMF	<i>Bcl-2-Modifying Factor</i>
Bok	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
c-Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>
CCR	<i>Câncer Colorretal</i>
CD95/CD95L	<i>Cluster of differentiation 95/CD95 Ligand</i>
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
c-FLIP	<i>cellular-FADD-like Interleukine-1 beta-converting enzyme-inhibitory protein</i>
c-myc	<i>cellular-myelomatosis vírus oncogene</i>
CRC	<i>Colorectal cancer cells</i>
CTL	<i>c-type lectin</i>

CYLD	<i>Cylindromatosis</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DR4	<i>Death Receptor 4</i> ou <i>receptor de morte 4</i>
DR5	<i>Death Receptor 5</i> ou <i>receptor de morte 5</i>
DUB	<i>Deubiquitinase</i>
EGFR	<i>Epithelial Growth Fator Receptor</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-regulating Kinases 1 and 2</i>
FADD	<i>Fas-associated Death Domain</i>
Fas/FasL	<i>Fatty acid Synthetase receptor e Fas-Ligante</i>
Fbw7	<i>F-box and WD repeat domain-containing 7</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration, USA</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
HECT	<i>Homologous to E6-associated protein C-terminus</i>
HRK	<i>Harakiri</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
IAP/ c-IAP1/2	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein /cellular-IAP 1/2</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
ILP2	<i>IAP-like protein 2</i>
I κ B/I κ B α /pI κ B α	<i>Inhibitor of κB/subunit alfa/phosphorylated form</i> ou <i>inibidor de κB</i>
JAMM	<i>JAMM/MPN domain-associated metallopeptidases</i>
JNK1	<i>Jun-N-terminal kinase 1</i>
Josefina	<i>Machado-Joseph Disease protein domain proteases</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRR	<i>Leucine-Rich Repeats</i>
LT β R	<i>Lymphotoxin Beta Receptor</i>
LUBAC	<i>Linear Ubiquitin chain Assembly Complex</i>
MAPK	<i>Mytogen-Activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MCPIP	<i>Monocyte Chemotactitc protein-induced protease</i>
Mdm2	<i>Murine Double Minute 2</i>

ML-IAP	<i>Melanoma IAP</i>
MME	<i>Membrana Mitochondrial Externa</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MULE	<i>Mcl-1 Ubiquitin ligase</i>
NACHT	<i>Domain found in NAIP</i>
NAIP	<i>Neuronal Apoptosis-Inhibitory Protein</i>
NEMO	<i>NFκB Essential Modulator</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NIK	<i>NFκB Inhibitory Kinase</i> ou quinase inibitória de NFκB
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NSCLC	<i>Non-Small Cells Lung Cancer</i>
OTU	<i>Ovarian-tumor proteases</i>
PEST	Sequência Prolina-Glutamato-Serina-Treonina
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
Poli-Ub	Poliubiquitinação
Puma	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
RANK	<i>Receptor Activator of NFκB</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RTK	<i>Receptores Tyrosine Kinase</i>
SCF	<i>Skp1/Cul1/F-box protein complex</i>
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondrial activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low isoelectric point</i>
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
TAK1-TAB2	<i>Transforming growth factor β-activating kinase 1 – TAK-binding protein</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNFR1/2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1 or 2</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
TRADD	<i>TNF-Receptor Associated Death Domain</i>

TRAF	<i>TNF-Receptor Associated Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related Apoptosis-inducing Ligand</i> ou Fator Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF
TRAILR1/2	<i>TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1 and 2</i> ou Receptor de Fator Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF
UBD	<i>Ubiquitin-Binding Domain</i>
UBP	<i>Ubiquitin Binding Protein</i>
UCH	<i>Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolases</i>
UPS	<i>Ubiquitin-Proteasome System</i>
USP	<i>Ubiquitin-Specific Protease</i>
XAF-1	<i>XIAP-associated Factor</i>
XIAP	<i>X-linked IAP</i>
β TRCP	<i>β-transducin Repeat Containing Protein Isoform 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	ESTABELECIMENTO DO CÂNCER.....	21
2.2	APOPTOSE.....	22
2.2.1	Via Intrínseca ou mitocondrial.....	23
2.2.2	Via extrínseca.....	28
2.3	SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMO – UPS.....	32
2.3.1	E3-ligases.....	37
2.3.2	Deubiquitinases.....	38
2.3.3	Família das IAP.....	39
2.3.3.1	XIAP.....	41
2.3.3.2	Survivina.....	43
2.4	REGULAÇÃO DA FAMÍLIA BCL-2 PELO UPS.....	45
2.5	REGULAÇÃO DE C-FLIP PELO UPS.....	47
2.6	O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFKB COMO REGULADOR NEGATIVO DA APOPTOSE	48
2.7	TOXINAS ANIMAIS COMO FONTE DE AGENTES TERAPÊUTICOS	54
2.8	BJCUL E SUAS MÚLTIPLAS PROPRIEDADES	55
3	JUSTIFICATIVA	57
4	OBJETIVOS	58
5	METODOLOGIA E RESULTADOS	59
	ARTIGO CIENTÍFICO – <i>BjcuL</i> , a c-type lectin obtained from <i>Bothrops jararacussu</i> venom, induces stabilization of the levels of anti-apoptotic proteins via ubiquitin system with participation of deubiquitinases in two colorectal cancer cell lines in vitro.....	60
	<i>Introduction</i>	61
	<i>Material and methods</i>	62
	<i>Results</i>	63
	<i>Discussion</i>	68
	<i>References</i>	71
6	DISCUSSÃO	75

7	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE 1 – RESULTADOS SUPLEMENTARES.....	97
	APÊNDICE 2 – DECLARAÇÃO DE ESTÁGIO DE DOUTORADO <i>FELLOW</i>	100
	APÊNDICE 3 – <i>THE LECTIN BJCOL INDUCES APOPTOSIS THROUGH TRAIL EXPRESSION, CASPASE CASCADE ACTIVATION, AND MITOCHONDRIAL MEMBRANE PERMEABILITY IN A HUMAN COLON ADENOCARCINOMA CELL LINE</i>	101
	APÊNDICE 4 – <i>DEATH RECEPTOR INDUCED-APOPTOSIS SIGNALING REGULATION BY EZRIN IS CELL TYPE-DEPENDENT AND OCCURS IN A DISC- INDEPENDENT MANNER IN COLON CANCER CELLS</i>	103

1 INTRODUÇÃO

Venenos e toxinas animais são considerados fontes promissoras de novas moléculas biologicamente ativas. Em particular, toxinas derivadas de venenos de serpentes têm sido amplamente estudadas como potenciais agentes terapêuticos no tratamento do câncer (Liu, Yang *et al.*, 2014). Entre os componentes derivados de venenos de serpentes, as lectinas do tipo c (*C-type lectins* – CTL) são um dos mais conhecidos. Elas apresentam a capacidade de interagir com β -D-galactosídeos, exercendo variados efeitos biológicos como modulação do sistema imunológico, adesão celular, agregação plaquetária, proliferação celular e indução de morte celular (Ogawa, Chijiwa *et al.*, 2005; Sartim e Sampaio, 2015; Yau, Dan *et al.*, 2015). A ação anti-tumoral de tais CTL tem sido descrita a muito tempo e atribuída à diminuição da proliferação celular e indução de apoptose. No entanto, pesquisas mais detalhadas a respeito de quais vias celulares estão envolvidas em seus efeitos biológicos ainda são necessárias (Yau, Dan *et al.*, 2015). O detalhamento dos mecanismos de ação das CTLs derivadas de veneno de serpente vem a contribuir para a investigação de novos alvos terapêuticos no tratamento do câncer e identificação de novos marcadores biológicos úteis para a pesquisa de vias celulares relacionadas a esta doença.

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que pode ser regulada por duas vias de sinalização celular: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (Fulda e Debatin, 2006). Para que a homeostase celular seja mantida, ambas as vias são reguladas por um equilíbrio entre a expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas (Strasser, Cory *et al.*, 2011), que pode ocorrer em três níveis: (1) na membrana plasmática, pelo recrutamento de c-FLIP (*cellular Fas-associated death domain-like interleukin 1 β -converting enzyme inhibitory protein*), que compete com as caspases 8 e 10 pela interação com FADD (*Fas-associated Death Domain*) na montagem do DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (Irmiler, Thome *et al.*, 1997); (2) na mitocôndria, onde proteínas anti-apoptóticas da superfamília Bcl-2 inibem a oligomerização de Bax/Bak (*Bcl-2-associated X protein/Bcl-2 antagonist killer 1*), prevenindo a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MME) (Adams e Cory, 2007); (3) ao nível distal, após a liberação de citocromo c pela mitocôndria,

através da formação do complexo survivina-XIAP (*X-linked IAP*), capaz de inibir a ativação da caspase 9, portanto, bloqueando os efeitos apoptogênicos do citocromo c (Dohi, Okada *et al.*, 2004; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014).

A superexpressão de c-FLIP, Bcl-2 e survivina está relacionada a um pior prognóstico clínico em pacientes com câncer (Ullenhag, Mukherjee *et al.*, 2007; Mclornan, Barrett *et al.*, 2010; Zeestraten, Benard *et al.*, 2013) e aquisição de resistência à quimioterapia, o que as torna potenciais alvos terapêuticos (Micheau, Shirley *et al.*, 2013; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014; Opferman, 2016). Entretanto, o desenvolvimento de terapias baseadas na diminuição da expressão destas três proteínas exige conhecimentos mais aprofundados dos mecanismos moleculares que as regulam. Todas as três proteínas têm sua regulação transcricional bem conhecida e extensivamente descrita (Micheau, Lens *et al.*, 2001; Siddiqui, Ahad *et al.*, 2015; Chen, Duan *et al.*, 2016). Quanto à regulação ao nível pós-traducional, sabe-se que a expressão de c-FLIP, Bcl-2 e survivina pode ser regulada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (*Ubiquitin-Proteasome System – UPS*). Este mecanismo se baseia no equilíbrio entre a ação de E3 ligases e deubiquitinases (DUBs), entretanto, sua regulação ainda não é completamente entendida (Breitschopf, Haendeler *et al.*, 2000; Zhao, Tenev *et al.*, 2000; Wilkie-Grantham, Matsuzawa *et al.*, 2013). A habilidade de regular rapidamente a expressão de proteínas-chave envolvidas nas vias de morte celular faz com que E3 ligases e DUBs sejam potenciais alvos terapêuticos no tratamento do câncer (Liu, Shaik *et al.*, 2015).

BJcuL é uma CTL purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e que apresenta potencial pró-inflamatório, como demonstrado pela ativação de neutrófilos e macrófagos *in vitro*, sem causar citotoxicidade (Elifio-Esposito, Tomazeli *et al.*, 2011; Dias-Netipanyj, Boldrini-Leite *et al.*, 2016). BJcuL também é capaz de diminuir o crescimento de células tumorais de mama, pâncreas, rim, ovários e glioma, assim como do tecido endotelial (Pereira-Bittencourt, Carvalho *et al.*, 1999; De Carvalho, Schmitmeier *et al.*, 2001). Já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que BJcuL induz apoptose em células de tumor gástrico das linhagens MKN45 e AGS (Nolte, De Castro Damasio *et al.*, 2012). Ao testar BJcuL em células de câncer colorretal (CCR) da linhagem HT29 foi observado aumento da marcação

imunohistoquímica de TRAIL (*TNF-related Apoptosis-inducing Ligand*), FADD, caspase 8 e Bax, além de um incremento da liberação de citocromo c pela mitocôndria (Damasio, Nolte *et al.*, 2014). Estes achados sugeriram que BJcuL exerce efeitos pró-apoptóticos nas células HT29, o que poderia estar envolvido com a apoptose induzida por TRAIL.

Logo, o objetivo deste estudo foi aprofundar a investigação dos efeitos de BJcuL em células de CCR das linhagens HT29 e HCT116. Os resultados aqui apresentados revelam que BJcuL modula a expressão de diferentes moléculas envolvidas no destino celular. Entretanto, sua ação não culmina com a conclusão da apoptose em ambas linhagens celulares estudadas. Mas, decoremos aqui uma nova ação biológica desta lectina: BJcuL está envolvida na estabilização dos níveis de c-FLIP, pBcl-2 e survivina, agindo através do UPS e envolvendo a participação de DUBs. Compostos com a habilidade de influenciar tal mecanismo de modificação pós-traducional, impactando na expressão de tais proteínas, são importantes ferramentas na pesquisa de novos alvos terapêuticos, uma vez que estes podem elucidar mecanismos essenciais que regulam o fino equilíbrio responsável pelo destino celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTABELECIMENTO DO CÂNCER

O câncer é um dos problemas de saúde pública mais relevantes no mundo. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em 2030 surgirão aproximadamente 5 milhões de novos casos da doença nas Américas, sendo mais de 700 mil casos no Brasil (Ferlay, Soerjomataram *et al.*, 2013). Destes, 42% afetarão pessoas com idade abaixo dos 65 anos e a taxa de mortalidade é estimada em 53% (Schilithz, Lima *et al.*, 2015). A condição da doença causa um grande impacto sobre as famílias dos indivíduos acometidos, seja este psicológico ou socioeconômico, o que acaba por repercutir no crescimento de países em desenvolvimento como o Brasil.

Existem vários tipos de câncer, com diferentes incidências na população mundial e um dos mais comuns é o câncer colorretal. No mundo, é a terceira neoplasia mais comum em homens e a segunda entre mulheres, com bom prognóstico quando diagnosticada precocemente. Os fatores de risco incluem dieta e sobrepeso, além do histórico familiar de câncer colorretal (Ferlay, Soerjomataram *et al.*, 2013; Schilithz, Lima *et al.*, 2015).

Uma neoplasia se desenvolve a partir da proliferação desordenada e acelerada de células de maneira que formem uma massa celular com características anormais. Quando as células permanecem agrupadas na mesma massa celular a neoplasia é denominada benigna. Quando as células se tornam metastáticas, ou seja, quando as células desenvolvem a capacidade de migrar pelo organismo, invadindo órgãos e tecidos distantes, a neoplasia se torna maligna, constituindo o câncer propriamente dito (Kumar, Abbas *et al.*, 2013).

Para o estabelecimento do câncer, as células devem desenvolver outras características, como o escape dos fatores de supressão do crescimento, imortalidade, indução da angiogênese e resistência à morte celular que são adquiridas por sucessivas mutações aleatórias originadas por instabilidade genômica ou por fatores epigenéticos (Hanahan e Weinberg, 2011).

O tratamento do câncer envolve o uso de várias estratégias terapêuticas, isoladas ou associadas, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entre elas,

a quimioterapia é uma das mais utilizadas e visa essencialmente a indução de apoptose das células tumorais (Lai, Visser-Grieve *et al.*, 2012). No entanto, algumas neoplasias são intrinsicamente resistentes aos quimioterápicos ou adquirem a resistência a apoptose ao longo do tratamento, o que contribui para a reincidência e mortalidade da doença (Van Geelen, De Vries *et al.*, 2004; Lai, Visser-Grieve *et al.*, 2012). Apesar destes dados, a quimioterapia é uma estratégia que tem evoluído rapidamente à medida que novos alvos terapêuticos são descobertos, permitindo o desenvolvimento de drogas cada vez mais específicas e eficazes de acordo com cada tipo de câncer (Lacasse, Mahoney *et al.*, 2008; Cohen e Tcherpakov, 2010; Strasser, Cory *et al.*, 2011; Pandey, Prasad *et al.*, 2016).

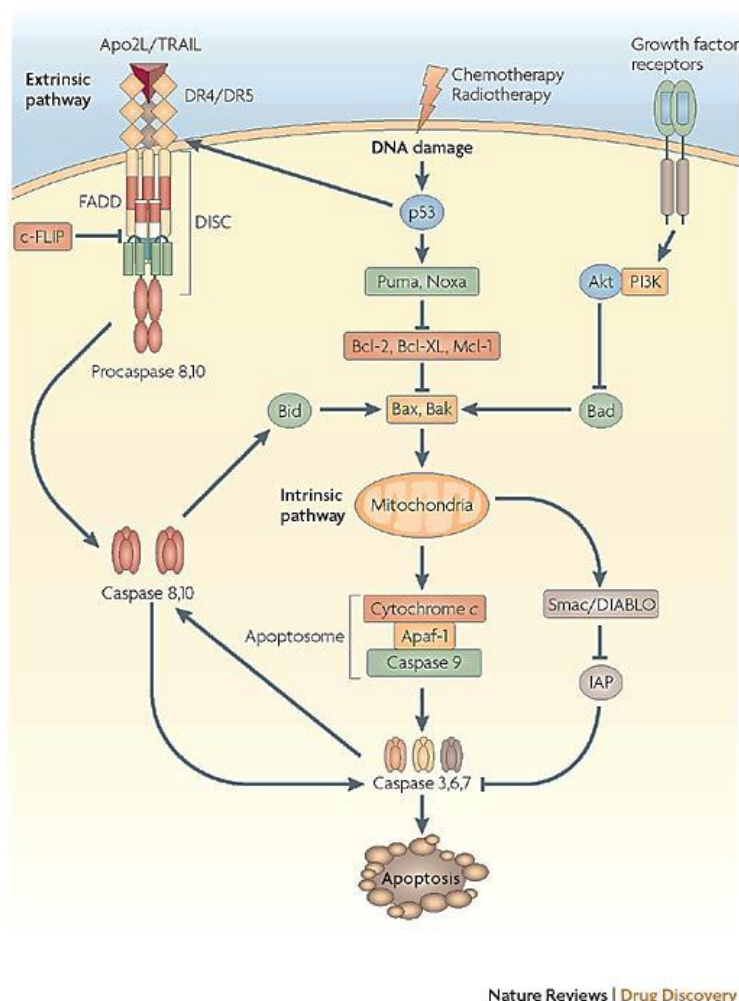
2.2 APOPTOSE

Apoptose é um mecanismo de morte celular programada desenvolvido por organismos multicelulares como um meio eficiente de eliminar células específicas, seja durante o desenvolvimento embrionário, seja em situações de dano celular ou tecidual, podendo ser desencadeada por duas vias moleculares: via intrínseca ou mitocondrial e via extrínseca (FIGURA 1).

Cada via é iniciada de modo singular, no entanto, culminam com os mesmos resultados: ativação de cascata proteolítica mediada por caspases, seguida de alterações morfológicas como formação de bolhas na membrana plasmática, encolhimento da célula, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Fulda e Debatin, 2006; Ashkenazi, A., 2008; Plati, Bucur *et al.*, 2011).

A finalização da apoptose, em ambos os casos, está sujeita a diversos mecanismos moleculares de controle que envolvem diferentes proteínas cruciais ao processo, que são consideradas importantes alvos terapêuticos no tratamento do câncer. Para melhor compreensão da apoptose, as vias intrínseca e extrínseca serão abordadas em detalhes nas sessões a seguir.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS APOPTÓTICAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA



Danos no DNA são detectados pela proteína supressora de tumor p53, que estimula a expressão de proteínas pró-apoptóticas que permitem a permeabilização da membrana mitocondrial, desencadeando a cascata proteolítica mediada por caspases. A ativação da via extrínseca depende da ligação de citocinas a receptores de morte na superfície celular. Além do recrutamento de caspases para o domínio de morte FADD e ativação da cascata proteolítica, esta via pode amplificar o seu sinal de morte ao recrutar a participação da via intrínseca no processo.
 FONTE: Adaptado de Ashkenazi (2008).

2.2.1 Via intrínseca ou mitocondrial

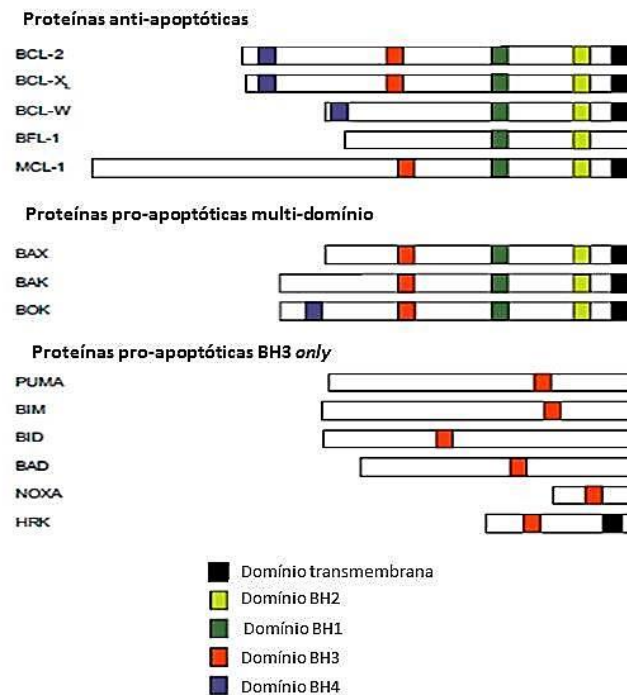
A via intrínseca é disparada por sinais de estresse celular, privação de fatores de crescimento e danos ao DNA. É considerada uma via primária de apoptose e envolve diversas vias moleculares coordenadas, compostas por proteínas anti- e pró-apoptóticas pertencentes à família de proteínas Bcl-2 (*B cell lymphoma protein 2*) e que regulam a integridade da MME. Em resposta

aos estímulos apoptóticos, a MME é permeabilizada e fatores apoptogênicos como citocromo c e Smac/DIABLO são liberados para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, o citocromo c associa-se ao complexo APAF1, formando o apoptossomo, onde é ativada a caspase-9, que desencadeia o restante da cascata proteolítica ao ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 (Adams e Cory, 2007), enquanto Smac/DIABLO liga-se às IAP (Proteínas Inibidoras de Apoptose), desfazendo sua ação inibitória sobre as caspases (Wu, Chai *et al.*, 2000).

O equilíbrio entre as proteínas anti- e pró-apoptóticas envolvidas na via intrínseca da apoptose é fundamental para manter a homeostase celular, impedindo a morte de células saudáveis ou promovendo-a em situações de estresse ou dano irreversível.

Bcl-2 foi a primeira proteína da família a ser descrita, em linfócitos provenientes de linfoma folicular de células B (Strasser, Harris *et al.*, 1991). Desde então, muitas outras proteínas reguladoras da apoptose têm sido descritas e todas elas apresentam, em sua estrutura, regiões de homologia com Bcl-2, denominadas domínios BH (FIGURA 2).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS DOMÍNIOS COM HOMOLOGIA À BCL-2 ENTRE AS DIFERENTES PROTEÍNAS QUE COMPÕEM A FAMÍLIA BCL-2



Proteínas anti- e pró-apoptóticas da família Bcl-2 apresentam múltiplos domínios BH. Aquelas que apresentam apenas o domínio BH3, conhecidas como “BH3 *only*”, possuem exclusivamente função pró-apoptótica.

FONTE: adaptado de Opferman (2016).

A presença destes domínios define a família Bcl-2 que é subdividida em proteínas anti- e pró-apoptóticas. Estas, por sua vez, são classificadas como efetoras, ativadoras diretas ou sensibilizadoras como observado no QUADRO 1 (Strasser, Cory *et al.*, 2011; Opferman, 2016).

QUADRO 1 – SUBDIVISÃO DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS BCL-2 DE ACORDO COM SUA FUNÇÃO NO CONTROLE DA APOPTOSE

SUBFAMÍLIA DE PROTEÍNAS ANTI-APOPTÓTICAS BCL-2	SUBFAMÍLIA DE PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS
<p>Bcl-2</p> <p>Bcl-xL (<i>Bcl-2-related protein long form of Bcl-x_l</i>)</p> <p>Bcl-x (<i>Bcl-2-like 1 protein</i>)</p> <p>Bcl-w (<i>Bcl-2-like 2 protein</i>)</p> <p>Mcl-1 (<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>)</p> <p>Bfl-1 (<i>Bcl-2 related gene expressed in fetal liver</i>)</p>	<p><i>Proteínas efetoras</i></p> <p>Bax</p> <p>Bak</p> <p>Bok (<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>)</p>
	<p><i>“BH3-only” ativadoras diretas</i></p> <p>Bid (<i>BH3-interactin domain</i>)</p> <p>Bim (<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>)</p>
	<p><i>“BH3-only” sensibilizadoras</i></p> <p>Noxa (<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>)</p> <p>Puma (<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>)</p> <p>Bad (<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>)</p> <p>Bik (<i>Bcl-2-interacting killer</i>)</p> <p>BMF (<i>Bcl-2-Modifying Factor</i>)</p> <p>HRK (<i>Harakiri</i>)</p>

As proteínas da família Bcl-2 são classificadas como anti-apoptóticas ou pró-apoptóticas. As proteínas pró-apoptóticas são subdivididas em proteínas efetoras, ativadoras diretas ou sensibilizadoras.

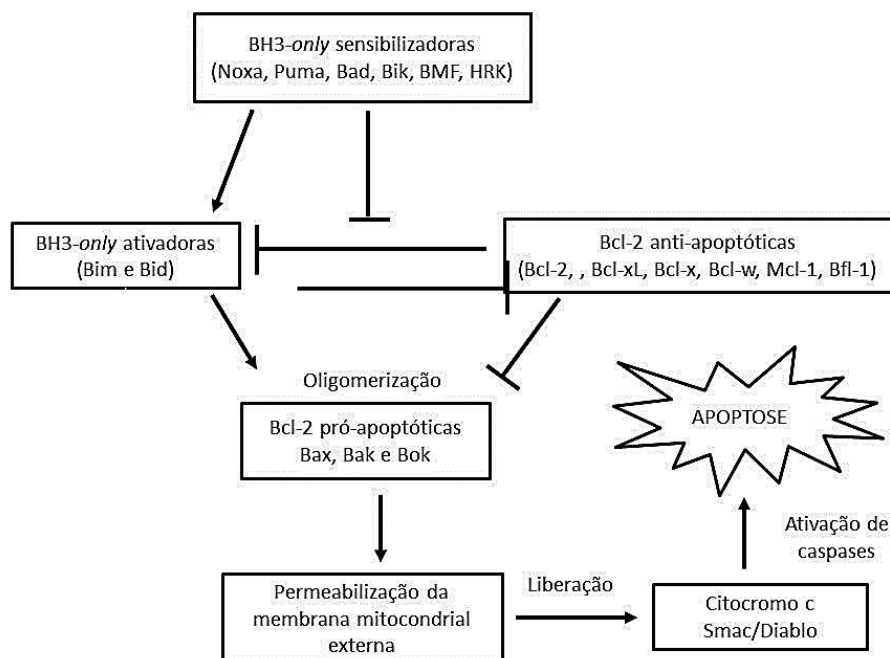
FONTE: adaptado de Strasser, Cory e Adams (2011) e Opferman (2016).

As proteínas da subfamília anti-apoptótica Bcl-2 preservam a integridade da MME inibindo diretamente a ação das proteínas pró-apoptóticas.

A subfamília de proteínas pró-apoptóticas é dividida em três classes: efetoras, “BH3-only” ativadoras diretas e “BH3-only” sensibilizadoras. As proteínas efetoras Bax e Bak possuem três domínios BH, assim como as proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, e quando oligomerizadas formam poros na MME, permeabilizando-a (Kluck, Bossy-Wetzel *et al.*, 1997). As proteínas conhecidas como “BH3-only” compartilham apenas o domínio BH3 com as demais proteínas da família Bcl-2. De acordo com a habilidade em interagir com as proteínas Bcl-2 anti- e pró-apoptóticas, as proteínas “BH3-only” são classificadas como ativadoras diretas ou sensibilizadoras (Strasser, Cory *et al.*, 2011). As ativadoras diretas, como Bid e Bim, promovem oligomerização de Bax e Bak, que por sua vez, permeabilizam a MME, culminando com a liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo c e Smac/DIABLO. A ação

pró-apoptótica de Bim e Bid é inibida quando proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas se ligam diretamente à elas. As proteínas sensibilizadoras, como Noxa e Puma, ligam-se às Bcl-2 anti-apoptóticas impedindo que estas neutralizem a ação das ativadoras diretas, permitindo que a oligomerização de Bax ou Bak ocorra (FIGURA 3) (Adams e Cory, 2007; Chipuk, Moldoveanu *et al.*, 2010). O equilíbrio da expressão destas proteínas está sujeito tanto ao controle transcricional quanto pós-traducional. Estes aspectos serão abordados posteriormente neste trabalho.

FIGURA 3 – INTER-RELAÇÕES ENTRE AS DIFERENTES PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2



A oligomerização das proteínas efetoras Bax, Bak ou Bok leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa e liberação de fatores apoptogênicos que ativam a cascata proteolítica mediada por caspases, culminando com a apoptose. As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 podem inibir a oligomerização de Bax/Bak ligando-se diretamente a elas ou por inibição das proteínas “BH3-only” ativadoras diretas. As proteínas “BH3-only” sensibilizadoras são capazes de ativar as proteínas ativadoras diretas ao mesmo tempo em que inibem a ação das Bcl-2 anti-apoptóticas, liberando Bim e Bid para que promovam a oligomerização de Bax/Bak. Setas indicam ativação, setas em T indicam inibição.

FONTES: O próprio autor; baseado em Adams e Cory (2007); Strasser, Cory e Adams (2011)

Os mecanismos que levam células tumorais ao escape da apoptose induzida por via intrínseca são bem conhecidos e envolvem super-expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 combinada à baixa expressão de proteínas pró-apoptóticas, principalmente Bax (Adams e Cory, 2007), super-expressão de IAPs, como XIAP e survivina (Dohi, Okada *et al.*, 2004; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014) e mutações do gene supressor de tumor p53 (Lowe, Cepero *et al.*, 2004), responsável por recrutar as proteínas “*BH3-only*” sensibilizadoras. Diversas estratégias terapêuticas que visam estes mecanismos como alvos moleculares têm sido desenvolvidas. Os miméticos de moléculas “*BH3-only*” agem inibindo proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas mesmo em tumores que apresentam mutação da proteína p53. Entre eles, o composto ABT-263 (Navitoclax) já se encontra em testes clínicos de fase II (Strasser, Cory *et al.*, 2011; Pandey, Prasad *et al.*, 2016) e o composto Venetoclax[®] (AbbVie, Inc. e Genentech Inc., USA) já teve seu uso aprovado pelo FDA, nos USA, para o tratamento de leucemia linfocítica crônica (Mullard, 2016). Antagonistas de IAPs, também conhecidos como miméticos de Smac, e inibidores de survivina são considerados promissores agentes anti-tumorais, havendo vários compostos com estas características sendo desenvolvidos e testados em testes pré-clínicos para o tratamento de melanoma, câncer colorretal e de mama. Destes, o Smac mimético AEG35156 (câncer hepatocelular) e os inibidores de survivina LY2181308 (câncer de próstata) e YM155 (câncer de pulmão de células não-pequenas) estão em fase II de testes clínicos (Pandey, Prasad *et al.*, 2016).

2.2.2 Via extrínseca da apoptose

A via extrínseca da apoptose requer a ligação de fatores de morte a receptores de superfície celular específicos, pertencentes à superfamília dos receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNF). Os receptores de morte celular melhor conhecidos e seus respectivos ligantes estão listados no Quadro 2.

Estes receptores possuem um domínio de morte (DD, do inglês: *Death Domain*) intracitoplasmático que recruta a proteína adaptadora FADD. As procaspases iniciadoras 8 ou 10 se ligam à FADD através de seus domínios efetores de morte (*Death Effector Domain* – DED) formando o DISC ou

complexo I, ligado à membrana. No DISC, as pro-caspases 8 ou 10 são clivadas e liberadas para o citoplasma onde desencadeiam a cascata proteolítica através da ativação das caspases executoras 3, 6 e 7 (Shirley, Morizot *et al.*, 2011).

QUADRO 2 – RECEPTORES DE MORTE DE SUPERFÍCIE CELULAR PERTENCENTES À FAMÍLIA DOS RECEPTORES DE FATOR DE NECROSE TUMORAL

RECEPTORES	LIGANTES
Apo-1 (<i>apoptotic antigen 1</i>) OU Fas (<i>Fatty acid Synthetase receptor</i>) OU CD95 (<i>cluster of differentiation 95</i>)	Apo-1-ligante (Apo1L) OU Fas-ligante (FasL) OU CD95-ligante (CD95L)
TNFR-1/2 (Receptor de Fator de Necrose Tumoral -1 ou 2)	TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>)
Apo-2 (<i>apoptotic antigen 2</i>) OU TRAIL-R1 ou DR4 (Receptor de Fator Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF 1 ou receptor de morte 4) E TRAIL-R2 ou DR5 (Receptor de Fator Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF 2 ou receptor de morte 5)	Apo-2-ligante (Apo2L) OU TRAIL

FONTE: Sayers (2011)

Em algumas células, o sinal apoptótico disparado pelos receptores de morte pode ser amplificado pelo recrutamento da via intrínseca quando a ativação de caspase-8 não é suficiente para finalizar a apoptose apenas por via extrínseca. Nestas células, a proteína pró-apoptótica Bid é clivada pela caspase-8, originando uma forma truncada chamada de tBid, capaz de neutralizar Bcl-2, culminando na oligomerização de Bax/Bak e liberação de citocromo c pela mitocôndria. Estas células são chamadas de células tipo II, enquanto aquelas que não dependem do recrutamento da via intrínseca para finalizar a apoptose são chamadas de células tipo I (Ozoren e El-Deiry, 2002).

Devido à ampla expressão dos três tipos de receptores de morte em células tumorais e por serem facilmente acessados por agentes terapêuticos, eles têm sido investigados como alvos para o tratamento do câncer. Outra característica que os torna alvos interessantes é a indução de apoptose por vias independentes do gene supressor de tumor *TP53*, uma vez que este está

envolvido na regulação da via intrínseca da apoptose e mais da metade dos tumores humanos adquirem mutações que o silenciam. Assim, estes tumores tornam-se resistentes aos quimioterápicos convencionais que induzem apoptose nas células tumorais por via intrínseca (Sayers, 2011; Shirley, Morizot *et al.*, 2011).

No entanto, os estudos realizados *in vivo* para testar os receptores Fas e TNFR1 como alvos terapêuticos no tratamento contra o câncer demonstraram que a estimulação de ambos desencadeia graves efeitos colaterais, como inflamação endotelial e hepatotoxicidade (Leist, Gantner *et al.*, 1996). Por outro lado, TRAIL tem se demonstrado seguro em estudos realizados *in vivo*, induzindo baixa citotoxicidade em células normais e promovendo rápida apoptose em diferentes tipos de células tumorais (Ashkenazi, Pai *et al.*, 1999; Bernardi, Secchiero *et al.*, 2012). Além disso, a baixa capacidade de ativar o fator de transcrição pro-inflamatório NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) maximiza o potencial apoptótico de TRAIL quando este é administrado em combinação com quimioterapias já utilizadas, como irinotecan/camptotecina, oxiplatina e etoposide (Kim, Fisher *et al.*, 2000; Ravi, Jain *et al.*, 2004; El Fajoui, Toscano *et al.*, 2011; Kim, Lee *et al.*, 2012).

Estas características tornam TRAIL um dos alvos terapêuticos antitumorais mais estudados nos últimos anos (Fulda, Meyer *et al.*, 2002; Galligan, Longley *et al.*, 2005; Ashkenazi, A, 2008; Ashkenazi, A., 2008; De Miguel, Lemke *et al.*, 2016), desde que foi descrito pela primeira vez em 1996 (Pitti, Marsters *et al.*, 1996). Como resultado, têm sido desenvolvidas várias estratégias que visam induzir apoptose em células tumorais estimulando o receptor de TRAIL através da administração de TRAIL recombinante humano ou através de anticorpos monoclonais contra o DR4 ou o DR5 (Adams, Totpal *et al.*, 2008; Ashkenazi, A, 2008), além das terapias combinatórias, que potencializam sua ação apoptótica. A maior parte destas estratégias terapêuticas encontra-se em diferentes etapas dos testes clínicos e, apesar de serem bem toleradas pelos pacientes, grande parte dos testes tem falhado devido à aquisição de resistência à apoptose induzida por TRAIL (Bernardi, Secchiero *et al.*, 2012; De Miguel, Lemke *et al.*, 2016).

Múltiplas são as causas de tal resistência, como distúrbios na expressão dos receptores de morte, com super-expressão de receptores “iscas”, que não

possuem um DD efetivo (Ashkenazi e Dixit, 1999), super-expressão de c-FLIP (Irmeler, Thome *et al.*, 1997), diminuição da expressão ou inibição do recrutamento de caspase-8 para o DISC (El-Deiry, 2012), desequilíbrio na expressão de Bcl-2 e Bax (Burns e El-Deiry, 2001; Fulda, Meyer *et al.*, 2002) e super-expressão das IAPs XIAP (Cummins, Kohli *et al.*, 2004; Ndozangue-Touriguine, Sebbagh *et al.*, 2008) e survivina (Stolfi, Caruso *et al.*, 2011).

A resistência ao TRAIL pode ser modulada pela combinação com outras drogas quimioterápicas, como etoposide e irinotecan/camptotecina, que induzem aumento de DR5 na superfície celular (Galligan, Longley *et al.*, 2005; Zhu, Zhao *et al.*, 2012) ou cisplatina, doxorubicina e 5-fluorouacil (5-FU), que aumentam o recrutamento de caspase 8 para o complexo DISC (Lacour, Hammann *et al.*, 2001; Lacour, Micheau *et al.*, 2003; Kim, Lee *et al.*, 2012). A ação destas drogas abrange diferentes aspectos moleculares da resistência ao TRAIL, favorecendo o estabelecimento de terapias baseadas na característica molecular de cada tumor (Van Geelen, De Vries *et al.*, 2004).

Dentro deste contexto, venenos e toxinas de origem animal já foram sugeridos como compostos coadjuvantes na terapia com TRAIL, promovendo a sensibilização de células resistentes a essa citocina. Entre eles pode-se citar a melitina, que é a principal toxina do veneno das abelhas, que age através da ativação de quinases envolvidas na inibição do fator nuclear κ B (NF κ B) em células de câncer hepatocelular (Wang, Chen *et al.*, 2009), toxinas provenientes de animais marinhos, que agem através de mecanismos moleculares diversos, tais como inibição da via do NF κ B, da via Wnt, aumento da expressão de DR5 e inibição de survivina (Elmallah e Micheau, 2015) e o veneno bruto da serpente *Vipera libertina turanica*, que induz apoptose em sinergia com TRAIL ao aumentar a expressão dos receptores DR4 e DR5 em células tumorais hepáticas, pulmonares e colorretais (Park, Jo *et al.*, 2012).

Os mecanismos capazes de regular a apoptose não envolvem apenas o equilíbrio entre proteínas anti- e pró-apoptóticas ligadas diretamente às vias intrínseca e extrínseca. Outras vias de sinalização, como o UPS (Broemer e Meier, 2009) e a ativação do NF κ B (Karin e Lin, 2002) têm participação crucial na regulação da apoptose. Desta maneira, mesmo que um estímulo de morte já tenha sido disparado, por via intrínseca ou extrínseca, não há garantias de que

a morte celular seja finalizada de fato. A seguir, tanto o UPS quanto a via do NFκB serão detalhados.

2.3. SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMO – UPS

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional reversível que ocorre pela adição de monômeros de ubiquitina a proteínas específicas. Esta modificação tem sido amplamente estudada desde a década de 1980 e rendeu o Prêmio Nobel de Química de 2004 para Hershko, Ciechanover e Rose (Nobelprize.Org, 2004).

A ubiquitina é uma pequena proteína de 76 aminoácidos e 8 kDa, que apresenta 7 resíduos de lisina em sua estrutura (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) e que se liga covalentemente aos resíduos de lisina de diversas proteínas-alvo. A primeira função atribuída à ubiquitinação foi o direcionamento de proteínas para a degradação proteossômica, o que se tornou a função mais conhecida desta modificação pós-traducional (Hershko, Eytan *et al.*, 1982). No entanto, ao longo dos anos, a ubiquitinação tem sido descrita como um mecanismo fundamental de regulação de vários outros processos celulares, como tráfego endocítico, sinalização da via do NF-κB, ativação de histonas, reparo do DNA e sobrevivência celular (Haglund, Di Fiore *et al.*, 2003; Haglund e Dikic, 2005; Krappmann e Scheidereit, 2005), impactando em doenças inflamatórias, neurodegenerativas e câncer (Moore, Dawson *et al.*, 2003; Hoeller, Hecker *et al.*, 2006; O'donnell e Ting, 2012).

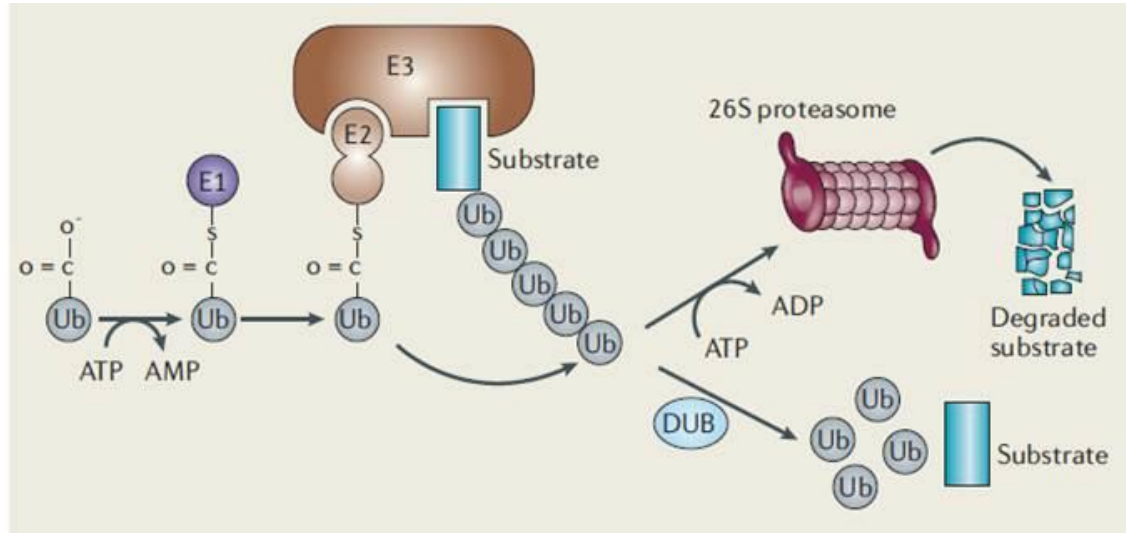
O passo a passo do processo de ubiquitinação envolve três enzimas conhecidas como E1 ativadora, E2 conjugase e E3 ligase (FIGURA 4) (Hershko e Ciechanover, 1998).

A enzima ativadora E1 prepara o monômero de ubiquitina através da formação de uma ligação tioéster entre um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e a glicina 76 (G76) da porção c-terminal da ubiquitina.

A enzima E2 é uma enzima de conjugação caracterizada por possuir um domínio conjugador de ubiquitina (UBC). Esta enzima transfere o monômero de ubiquitina ligado à enzima ativadora E1 para a enzima E3 ligase. E2 pode também transferir a ubiquitina diretamente para proteínas-alvo quando estas possuem domínios de ligação a ubiquitinas (*Ubiquitin Binding Domain* - UBD).

A E3 ligase recebe o monômero de ubiquitina da E2 conjugase e o liga em resíduos de lisina específicos da proteína-alvo.

FIGURA 4 – PASSO A PASSO DO PROCESSO DE UBIQUITINAÇÃO

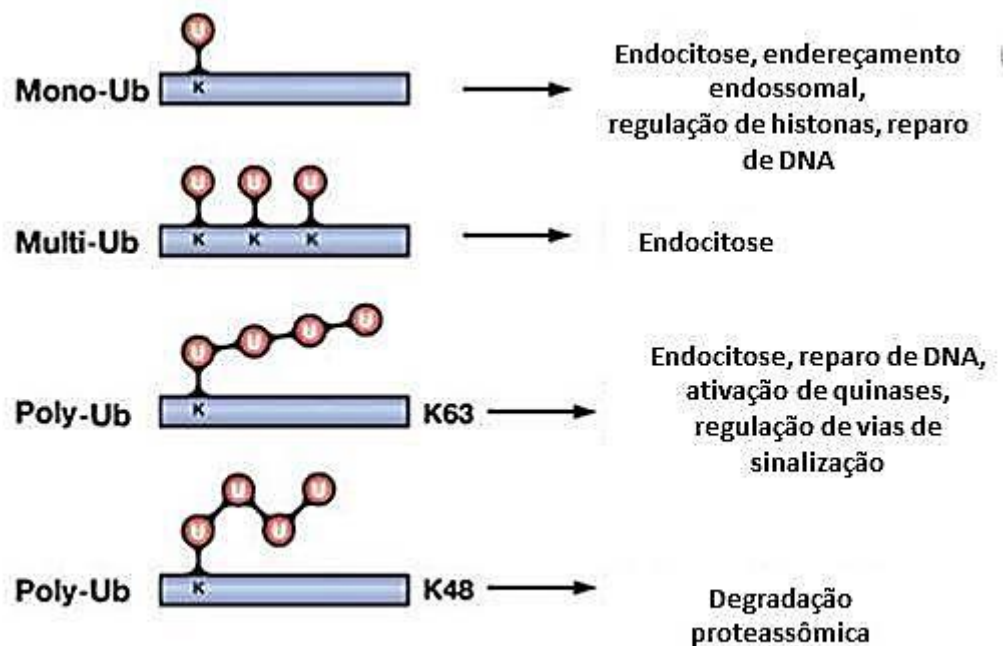


A ativação dos monômeros de ubiquitina pela enzima E1 ocorre através de uma ligação entre um resíduo de cisteína da enzima e um resíduo de glicina da porção c-terminal da ubiquitina, em um mecanismo ATP-dependente. A enzima conjugadora E2 transfere a ubiquitina da enzima ativadora E1 para a enzima E3 ligase, que a adiciona à proteína-alvo. Quando os monômeros de ubiquitina se ligam uns aos outros pelas lisinas 48, formam cadeias poliubiquitinadas que são reconhecidas pelo proteassoma 26S, que por sua vez degrada a proteína-alvo. A proteína-alvo pode ser poupada da degradação proteossômica quando as cadeias poliubiquitinadas são removidas por deubiquitinases (DUB).

FONTE: Adaptado de Hoeller, Hecker e Dikic (2006).

Quando a E3 ligase adiciona um único monômero de ubiquitina a um único resíduo de lisina na proteína-alvo, esta é considerada monoubiquitinada. Quando vários monômeros de ubiquitina são adicionados individualmente a diferentes resíduos de lisina, a proteína é considerada multiubiquitinada. Quando cadeias alongadas de ubiquitinas são formadas pela adição sucessiva de novos monômeros àqueles já adicionados à proteína-alvo, esta é denominada poliubiquitinada (FIGURA 5) (Hershko e Ciechanover, 1998; Hoeller, Hecker *et al.*, 2006; Martinez-Forero, Rouzaut *et al.*, 2009).

FIGURA 5 - TIPOS DE UBIQUITINAÇÃO DAS PROTEÍNAS-ALVO E SEU SIGNIFICADO BIOLÓGICO NA FISIOLOGIA CELULAR



FONTE: Adaptado de Haglund e Dikic (2005).

Vários fatores definem se uma proteína-alvo será mono ou poliubiquitinada. Um dos fatores é o tipo de domínio presente no sítio ativo da E3 ligase envolvida no processo, que podem ser o domínio uBox, o domínio HECT (*Homologous to E6-associated protein C-terminus*) ou o domínio RING (*Really interesting new gene*). Também depende do tipo de proteína-alvo, que pode conter UBDs e sofrer auto-ubiquitinação ou pode ocorrer remoção de monômeros ou cadeias de ubiquitinas por DUBs (Hershko e Ciechanover, 1998; Haglund, Di Fiore *et al.*, 2003; Martinez-Forero, Rouzaut *et al.*, 2009). O tipo de ubiquitinação vai definir o destino da proteína-alvo, como descrito a seguir.

A mono e a multiubiquitinação estão envolvidas na endocitose de proteínas de membrana, no endereçamento de proteínas para degradação lisossômica, no mecanismo de reparo do DNA e regulação da transcrição (Hershko e Ciechanover, 1998; Haglund, Di Fiore *et al.*, 2003). O mecanismo regulado por monoubiquitinação melhor descrito é a internalização de receptores tirosina-quinase (RTK), especificamente o receptor de fator de

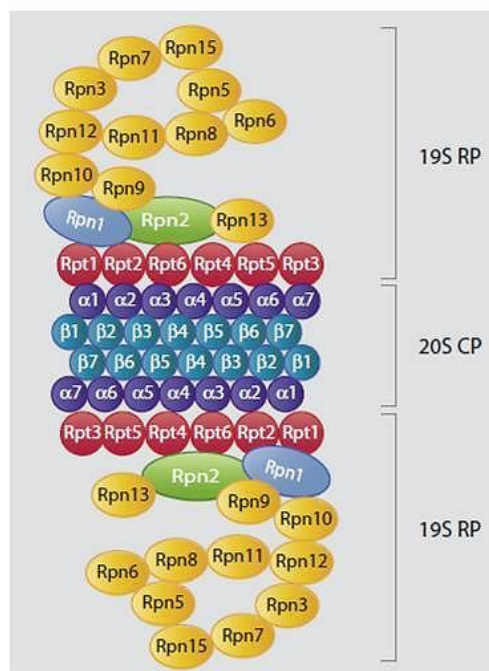
crescimento epitelial (EGFR). A E3 ligase c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*) é a responsável por esta monoubiquitinação, promovendo a internalização dos receptores (Hicke, 2001; Haglund, Di Fiore *et al.*, 2003), enquanto a remoção deste sinal pela DUB USP8, está relacionada com a degradação do EGFR pelo lisossomo (Alwan e Van Leeuwen, 2007).

As cadeias poliubiquitinadas podem apresentar os monômeros de ubiquitina ligados uns aos outros por suas lisinas 48, sendo denominadas na literatura especializada em ubiquitinação como cadeias K48 ou poli-Ub K48. Quando os monômeros de ubiquitina estão ligados por suas lisinas 63, as cadeias poliubiquitinadas são conhecidas como cadeias K63 ou poli-Ub K63. Neste trabalho, serão denominadas desta maneira para seguir o padrão da literatura internacional (Haglund, Di Fiore *et al.*, 2003; Haglund e Dikic, 2005; Martinez-Forero, Rouzaut *et al.*, 2009).

As cadeias poli-Ub K48 são retorcidas e as proteínas-alvo assim poliubiquitinadas são reconhecidas e degradadas pelo proteassoma 26S, um complexo proteolítico ATP-dependente localizado tanto no citoplasma quanto no núcleo de células eucarióticas. Este complexo é formado por 50 subunidades diferentes, totalizando uma massa molecular de aproximadamente 2,5 MDa e constituído por 2 subcomplexos: uma partícula central proteolítica 20S em forma de barril e duas partículas regulatórias 19S localizadas em cada uma das extremidades da partícula central. As partículas 19S ATP-dependentes se ligam às proteínas poliubiquitinadas através do reconhecimento de suas cadeias poli-Ub K48 (FIGURA 6) (Glickman e Ciechanover, 2002). Então, DUBs associadas ao proteassoma removem estas cadeias da proteína-alvo, que é clivada em pequenos peptídeos pelo núcleo proteolítico da partícula 20S e os monômeros de ubiquitina são reciclados (Broemer e Meier, 2009; D'arcy e Linder, 2012; D'arcy, Wang *et al.*, 2015). Assim, a eliminação de proteínas ocorre de maneira controlada, assegurando o *turnover* proteico normal.

A polimerização de cadeias poli-Ub K48 é promovida por diferentes E3 ligases, como SCF^{Fbw7} (*Skp1/Cul1/F-box protein complex, F-box and WD repeat domain-containing 7*), Mdm2 (*murine double minute 2*) e APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome complex*) (Liu, Shaik *et al.*, 2015).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM PROTEASSOMA 26S



O proteassoma é formado por uma partícula central proteolítica conhecida como 20S CP e partículas regulatórias 19S RP.

FONTE: Adaptado de D'Arcy, Wang e Linder (2015).

As cadeias poli-Ub K63 são lineares e consideradas uma modificação pós-traducional importante para a ativação de vias de sinalização não-degradativas. Estas cadeias criam arcabouços proteicos onde se encontram sítios de ancoragem para proteínas ou complexos proteicos envolvidos nas vias de sinalização do NFκB e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), impactando na resposta imunológica, nos processos inflamatórios e na biologia de células tumorais (Martinez-Forero, Rouzaut *et al.*, 2009; O'donnell e Ting, 2012). As cadeias poli-Ub K63 também modulam a apoptose ao regularem a atividade das caspases efetoras 3 e 7, mascarando o sítio catalítico destas enzimas. Assim, as caspases são protegidas de auto-clivagem e a viabilidade celular é mantida mesmo quando há presença de níveis ótimos de caspases (Ditzel, Broemer *et al.*, 2008; Broemer e Meier, 2009). A polimerização de cadeias poli-Ub K63 é regulada por E3 ligases específicas, como as proteínas TRAF e c-IAP (Varfolomeev, Blankenship *et al.*, 2007; Martinez-Forero, Rouzaut *et al.*, 2009).

Como o UPS é capaz de interferir em vários mecanismos relacionados à tumorigênese, muitos esforços têm sido feitos na busca por compostos

terapêuticos capazes de interferir na sua regulação. A falta de especificidade dos inibidores de E1-ativadoras, de E2-conjugases e até mesmo de alguns inibidores de proteassoma resulta em efeitos indesejáveis que prejudicam sua aplicação na clínica. Por outro lado, a alta especificidade das E3 ligases e DUBs as torna alvos terapêuticos interessantes para o tratamento do câncer, por gerarem menos efeitos colaterais (Liu, Shaik *et al.*, 2015).

2.3.1 E3 ligases

Aproximadamente 1000 genes codificam E3 ligases em nosso genoma (Sun, 2003; Metzger, Hristova *et al.*, 2012). Entre elas, as IAPs são as mais importantes na regulação da apoptose e serão abordadas em uma seção exclusiva mais à frente. As demais E3 ligases, não pertencentes à família IAP, assim como as DUBs, serão abordadas aqui de acordo com sua participação na regulação da apoptose e seu impacto no processo de tumorigênese.

As E3 ligases que possuem domínios do tipo RING (*Really Interesting New Gene*) são as mais abundantes e podem se apresentar na forma de peptídeos únicos, como a Mdm2 e XIAP, ou podem formar complexos proteicos, como as SCF (Sun, 2003; Metzger, Hristova *et al.*, 2012). Mdm2 e SCF^{Fbw7} têm seu papel bem definido na biologia tumoral e por isso são consideradas alvos-terapêuticos importantes (Liu, Shaik *et al.*, 2015).

Mdm2 é o principal regulador negativo da proteína p53, direcionando-a para a degradação proteassômica e impactando diretamente na resistência a apoptose em células tumorais (Sun, 2006; Liu, Shaik *et al.*, 2015).

SCF^{Fbw7} é uma proteína supressora de tumor que direciona as oncoproteínas c-myc (*cellular-myelomatosis vírus oncogene*) (Yada, Hatakeyama *et al.*, 2004), Mcl-1 (Inuzuka, Shaik *et al.*, 2011) e p100/NFκB2 (Fukushima, Matsumoto *et al.*, 2012) à degradação proteassômica.

SCF^{βTRCP} (SCF-β-transducin Repeat Containing Protein Isoform 1) é importante para a ativação da via de NFκB ao adicionar cadeias poli-ub K48 a IκBα fosforilado, direcionando-o à degradação proteassômica (Spencer, Jiang *et al.*, 1999). Sua inibição, portanto, poderia atenuar a resposta pró-inflamatória. No entanto, esta E3 ligase promove também a degradação de proteínas supressoras de tumor de acordo com o tipo celular e o contexto

fisiológico em que as células estão inseridas, o que faz com não seja considerada um bom alvo terapêutico (Liu, Shaik *et al.*, 2015).

2.3.2 Deubiquitinases

As DUBs são importantes reguladoras da via da ubiquitinação por removerem monômeros de ubiquitina e cadeias poli-Ub das proteínas já ubiquitinadas, protegendo-as da degradação proteassômica ou desmontando os arcabouços que sustentam vias de sinalização específicas.

Mais de 90 DUBs já foram identificadas e são divididas em 6 classes: USP ou UBP (*Ubiquitin-specific proteases ou Ubiquitin-binding protein*), UCH (*Ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*), OTU (*Ovarian-tumor proteases*), Josefina (*Machado-Joseph disease protein domain proteases*), JAMM (*JAMM/MPN domain-associated metallopeptidases*) e MCPIP (*monocyte chemotactic protein-induced protease*) (Nijman, Luna-Vargas *et al.*, 2005; D'arcy, Wang *et al.*, 2015). Entre estas, as USPs são as mais numerosas, com número compatível ao de E3 ligases, o que confere ao processo de ubiquitinação e deubiquitinação a mesma precisão encontrada no processo de fosforilação exercido por quinases e fosfatases (D'arcy, Wang *et al.*, 2015). Algumas DUBs são associadas às partículas 19S do proteassoma e regulam a entrada das proteínas-alvo na partícula 20S ao removerem cadeias poli-Ub K48 excessivas. Elas também reciclam monômeros de ubiquitina e evitam que o proteassoma seja obstruído por excesso de substrato (D'arcy e Linder, 2012).

Em torno de 20 DUBs estão relacionadas à regulação do processo de apoptose, tanto positiva quanto negativamente (Ramakrishna, Suresh *et al.*, 2011; D'arcy, Wang *et al.*, 2015).

USP2 é um exemplo de DUB que exerce papéis contraditórios na regulação da apoptose. Enquanto a baixa expressão da isoforma de 41 kDa induz sobrevivência em células de rim embrionário humano (HEK293) (Gewies e Grimm, 2003) e hepatócitos (Haimerl, Erhardt *et al.*, 2009) através da ativação da via do NFκB e expressão de c-FLIP, a baixa expressão da isoforma de 69 kDa induz apoptose em células de câncer de próstata pela desestabilização da enzima ácido graxo sintase (Graner, Tang *et al.*, 2004).

USP22 é uma DUB considerada crucial na promoção de tumorigênese e estabelecimento de resistência a apoptose, sendo sua super-expressão considerada um indicador de mau prognóstico em pacientes portadores de diferentes tipos de câncer. USP22 remove as cadeias poli-Ub K48 da histona H2B e favorece a tumorigênese do câncer colorretal, promovendo migração celular, ativação das vias de sobrevivência, aumento da instabilidade cromossômica e inibição de mecanismos de reparo do DNA. Portanto, pacientes com marcação negativa de H2B ubiquitinada apresentam altos níveis de expressão de USP22, o que a torna um indicador de mau prognóstico nestes pacientes. Quando ubiquitinada, H2B está relacionada com maior taxa de sobrevida dos pacientes em 5 anos (Wang, Zhu *et al.*, 2015). USP22 também causa resistência a apoptose em células de carcinoma hepatocelular por deubiquitinação e acúmulo de survivina (Tang, Liang *et al.*, 2015). Em células de câncer de pulmão de células não pequenas (*Non-Small Cells Lung Cancer* - NSCLC), USP22 está relacionada com a agressividade do tumor por promover transição epitélio-mesenquimal e metástase (Hu, Yang *et al.*, 2015).

USP28 promove a super-expressão do fator de transcrição c-myc ao remover as cadeias poli-Ub K48 adicionadas pela E3 ligase SCF^{Fbw7}, inibindo a degradação proteossômica deste fator. Por isso é considerada uma importante coadjuvante na tumorigênese do câncer colorretal e de bexiga urinária, apresentando potencial como indicador de prognóstico e alvo terapêutico (Popov, Herold *et al.*, 2007; Popov, Wanzel *et al.*, 2007).

2.3.3 Família das IAP

As IAPs são E3 ligases importantes na regulação da sobrevivência e morte celular, pois desempenham papéis cruciais para a inibição da apoptose, controle da proliferação celular e modulação da via do NFκB. A super-expressão de IAPs contribui para a tumorigênese, quimioresistência e progressão do câncer, o que as torna um importante indicador de prognóstico (Hunter, Lacasse *et al.*, 2007; Pandey, Prasad *et al.*, 2016).

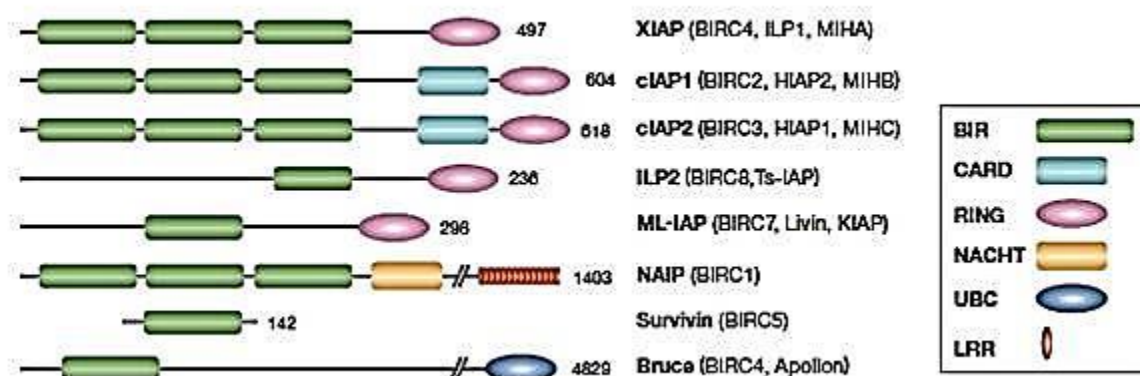
Estas proteínas foram descritas pela primeira vez como parte do genoma do baculovírus, agindo como inibidoras de apoptose nas células do hospedeiro e são caracterizadas pela presença de 70 a 80 aminoácidos que

constituem domínios denominados BIR (*Baculovirus IAP repeat*) (Deveraux, Roy *et al.*, 1998; Deveraux e Reed, 1999). Estes domínios são responsáveis por interações proteína-proteína e se ligam a domínios IBM (*IAP Binding Motifs*) presentes nas caspases e antagonistas de IAP. Fazem parte da família das IAPs: NAIP (*Neuronal Apoptosis-Inhibitory Protein*), XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ILP2 (*IAP-like protein 2*), Bruce/Apollon, survivina e livina/ML-IAP (melanoma IAP) (Deveraux e Reed, 1999; Lacasse, Mahoney *et al.*, 2008; Kocab e Duckett, 2016).

Com exceção de NAIP, Bruce/Apollon e survivina, todas as outras IAPs possuem, além de seu característico domínio BIR, um domínio RING responsável por sua ação como E3 ligases (FIGURA 7) (Pandey, Prasad *et al.*, 2016).

Neste trabalho é descrita, especificamente, a ação reguladora de XIAP e survivina sobre a apoptose.

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA IAP HUMANA E SEUS DOMÍNIOS



As IAPs são caracterizadas pela presença de um a três domínios BIR, responsáveis pelas interações proteína-proteína típicas destas moléculas. XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2 e ML-IAP agem como E3 ligases devido à presença de um domínio RING. O domínio de recrutamento de caspases (*Caspase Recruitment Domain* - CARD) é exclusivo de cIAP1 e cIAP2, mas sua função ainda não foi esclarecida, uma vez que este domínio não participa da ação inibitória de caspases. O domínio UBC caracteriza Bruce/Apollon como uma E2-conjugase. Os domínios NACHT (*Domain found in NAIP*) e LRR (*Leucine-Rich Repeats*), são exclusivos de NAIP e estão relacionados à imunidade inata e neuroproteção.

FONTE: Adaptado de Eckelman, Salvesen e Scott (2008); LaCasse et al. (2008)

2.3.3.1 XIAP

XIAP (IAP de mamífero ligada ao X) é a única proteína da família das IAP capaz de inibir diretamente as caspases 3, 7 e 9, além de agir como E3 ligase através de seu domínio RING (Schile, Garcia-Fernandez *et al.*, 2008; Galban e Duckett, 2010). Sua super-expressão em vários tipos de tumores está relacionada à quimioresistência (Lacasse, Mahoney *et al.*, 2008).

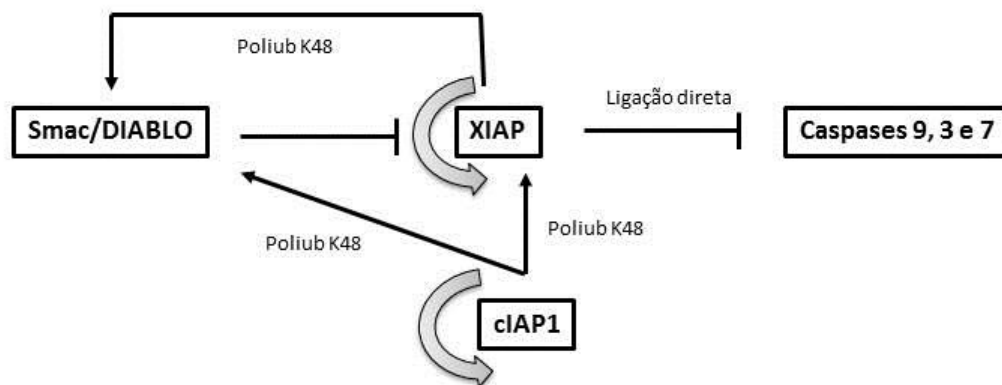
A inibição das caspases 3 e 7 é competitiva, através da ligação entre seu sítio ativo e a região localizada entre os domínios BIR1 e BIR2 de XIAP, no entanto, a inibição da caspase-7 também ocorre de maneira não-competitiva através da ligação de sua porção N-terminal unicamente ao domínio BIR2 de XIAP (Suzuki, Nakabayashi, Nakata *et al.*, 2001). Além disso, através de seu domínio RING, XIAP age como E3 ligase e adiciona cadeias poli-Ub K48 à forma ativa da caspase-3, mas não à pro-caspase 3, levando-a a degradação proteossômica e inibindo a finalização da apoptose (Suzuki, Nakabayashi e Takahashi, 2001). A inibição da caspase-9 ocorre pela ligação de XIAP aos monômeros de caspase-9 através do domínio BIR3, formando heterodímeros que impedem a ligação com outras caspases-9, inibindo a ativação da função proteolítica desta enzima (Shiozaki, Chai *et al.*, 2003). XIAP também regula a atividade de caspase-9 através de seu domínio RING, promovendo poliubiquitinação e degradação proteossômica da forma ativa da caspase, mas não da sua forma inativa, a pro-caspase-9 (Morizane, Honda *et al.*, 2005).

Smac/DIABLO é um fator apoptogênico conhecido por sua capacidade de neutralizar a ação inibitória de IAPs, especialmente XIAP, sobre as caspases (Du, Fang *et al.*, 2000; Verhagen, Ekert *et al.*, 2000). Smac/DIABLO está localizado na mitocôndria e sua liberação ocorre juntamente com o citocromo c após estímulo apoptótico (Adrain, Creagh *et al.*, 2001). Para inibir a interação de XIAP com as caspases, as caudas N-terminais do dímero de Smac/DIABLO ligam-se à XIAP sequencialmente em seus sítios de ligação às caspases 3 e 9 (BIR2 e BIR3). Assim, as caspases são mantidas livres e promovem a continuidade do processo de morte celular (Gao, Tian *et al.*, 2007; Galban e Duckett, 2010). Para garantir o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular, a propriedade E3 ligase de XIAP promove poliubiquitinação de

Smac/DIABLO, conduzindo-o à degradação proteossômica e resgatando a célula do processo de morte (Morizane, Honda *et al.*, 2005).

Outra forma de regulação de XIAP é a auto-ubiquitinação por seu domínio RING, no entanto, relatos contraditórios a respeito têm colocado em dúvida este mecanismo (Galban e Duckett, 2010). Na figura 8 é possível visualizar, de maneira simplificada, como ocorrem essas regulações. Desde que esses mecanismos foram descritos, várias análises estruturais de XIAP vêm contribuindo para identificar sítios de ligação de Smac/DIABLO que possam ser usados como alvos terapêuticos (Chai, Du *et al.*, 2000; Wu, Chai *et al.*, 2000). Estas pesquisas resultaram no desenvolvimento de pequenas moléculas chamadas Smac-miméticas ou peptídeos derivados de Smac, pois são derivados da porção N-terminal desta molécula (Sun, Nikolovska-Coleska *et al.*, 2007). Importantes evidências provenientes de testes pré-clínicos têm sustentado o uso de Smac-miméticos como estratégia terapêutica contra o câncer, principalmente quando combinados com TRAIL. Vários estudos demonstram que Smac-miméticos aumentam a resposta de células tumorais de pâncreas, neuroblastoma, glioma e câncer colorretal (Fulda, Wick *et al.*, 2002; Vogler, Walczak *et al.*, 2009) à apoptose induzida por TRAIL quando estas células apresentam desequilíbrio na expressão das proteínas da família Bcl-2, pois a inibição de XIAP promove clivagem de caspase-3 sem que haja necessidade de recrutar a via intrínseca (Gillissen, Richter *et al.*, 2013).

FIGURA 8 - INTERREGULAÇÃO SMAC/DIABLO-XIAP ATRAVÉS DE POLIUBIQUITINAÇÃO POR CADEIAS POLI-UB K48



A proteína anti-apoptótica XIAP inibe a ativação da caspases 9, 3 e 7 ao bloquear seus sítios de interação com os substratos. Esta ação é inibida por Smac/DIABLO, que interage com XIAP inibindo seus sítios de ligação com as caspases 9, 3 e 7 e promovendo apoptose. Devido a seu domínio RING, XIAP exerce função de E3 ligase, promovendo sua própria regulação através de autoubiquitinação. XIAP também pode ser poliubiquitinada por c-IAP1. Ambas IAPs inibem a apoptose ao adicionarem cadeias poli-ub K48 a Smac/DIABLO, que é direcionado à degradação proteossômica. Setas indicam estimulação, cabeças de setas em "T" indicam inibição, setas curvadas indicam auto-ubiquitinação por cadeias poli-ub K48.

FONTE: O próprio autor; baseado em Schile, Garcia-Fernandez e Steller (2008); Galban e Duckett (2010).

2.3.3.2 Survivina

Apesar de ser expressa regularmente nos tecidos embrionários e fetais, survivina é indetectável na maioria dos tecidos adultos, sendo encontrada apenas em precursores hematopoiéticos CD34⁺, células endoteliais e células epiteliais basais, nas quais participa dos processos de renovação rápida de células proliferativas e na resposta celular ao estresse (Tamm, Wang *et al.*, 1998; Altieri, 2008; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014). Sua super-expressão é detectada na maioria das neoplasias humanas e está relacionada à resistência à quimioterapia e recorrência da doença, indicando pior prognóstico clínico, pois interliga diversas vias celulares, conferindo aos tumores capacidade adaptativa, proliferativa e resistência à morte celular (Kawasaki, Altieri *et al.*, 1998; Van 'T Veer, Dai *et al.*, 2002; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014; Wu, Zhao *et al.*, 2016). Estas características classificam a survivina como um alvo

terapêutico na busca por novas drogas para o tratamento do câncer e doenças neurodegenerativas.

Survivina possui tempo de meia-vida de 30 minutos e sua expressão é detectada durante a fase G2/M do ciclo celular, sendo rapidamente degradada pelo UPS (Zhao, Tenev *et al.*, 2000). Ao nível transcricional, a expressão de survivina é controlada negativamente por genes supressores de tumor como *TP53*, que silenciam o promotor *BIRC5*, e é ativada por fatores oncogênicos como TCF4- β -catenina e STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*). No contexto pós-transcricional, os níveis de survivina são regulados por micro-RNAs, pelas vias de sinalização de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) e PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) - AKT (Proteína Quinase B – PKB). Pós-traducionalmente, survivina é fosforilada pela quinase ciclina-dependente 1 (*cycline-dependent kinase 1* - CDK1) e degradada pelo UPS, do que é protegida pela associação à chaperona HSP90 (*Heath Shock Protein 90*) (Nogueira-Ferreira, Vitorino *et al.*, 2013).

A função anti-apoptótica da survivina é exercida apenas pela survivina mitocondrial e é capaz de inibir a morte celular iniciada tanto por via extrínseca quanto intrínseca (Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014). Após sua liberação pela mitocôndria em resposta ao estímulo apoptótico, survivina associa-se à Smac/DIABLO, impedindo sua ação inibidora sobre XIAP (Ceballos-Cancino, Espinosa *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, se liga à XIAP e a estabiliza, impedindo sua auto-ubiquitinação. Forma-se assim um complexo survivina-XIAP que inibe com eficiência a ativação de caspases, impedindo a progressão da morte celular. Quando survivina é fosforilada na Ser20 pela proteína quinase A (PKA), o complexo survivina-XIAP é desestabilizado e a sensibilidade à apoptose é restituída (Dohi, Okada *et al.*, 2004; Dohi, Xia *et al.*, 2007).

A regulação dos níveis de survivina por degradação proteossômica depende de sua poliubiquitinação em vários resíduos de lisina (Zhao, Tenev *et al.*, 2000). A poliubiquitinação de survivina por cadeias poli-Ub K48 é realizada pela E3 ligase SCF^{Fbx17} nos resíduos de lisina 90 e 91 (Liu, Lear *et al.*, 2015). Também já foi descrito que XIAP, quando associado à XAF-1 (*XIAP-associated Factor*), promove poliubiquitinação e degradação proteossômica de survivina (Arora, Cheung *et al.*, 2007).

O efeito anti-apoptótico de survivina pode ser potencializado ainda por inibidores de proteassoma, como evidenciado pela aquisição de resistência à apoptose induzida por pristimerin em células de câncer de próstata tratadas com os inibidores de proteassoma MG132 e lactacistina (Liu, Gao *et al.*, 2014). A super-expressão de survivina também é consequência de altos níveis de expressão de USP22, o que está relacionado a mau prognóstico em pacientes de carcinoma hepatocelular. Quando USP22 é silenciada *in vitro*, os níveis de survivina tornam-se baixos e as células se tornam mais suscetíveis aos tratamentos quimioterápicos (Tang, Liang *et al.*, 2015). O uso do inibidor de DUBs WP1130 promove diminuição dos níveis de survivina e XIAP através da inibição de USP9X, reforçando a importância do UPS no controle da apoptose (Karpel-Massler, Banu *et al.*, 2016). Apesar destas evidências, não está claro se outras E3 ligases e DUBs participam da regulação dos níveis de survivina. Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de controle da apoptose orquestrado pelo complexo survivina-XIAP podem revelar novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer.

2.4 REGULAÇÃO DA FAMÍLIA BCL-2 PELO UPS

Em células saudáveis, os níveis de Bcl-2 anti-apoptóticas são altos, enquanto as “BH3-only” estão praticamente ausentes ou têm sua expressão restrita a compartimentos subcelulares. Em situações de estresse celular ou dano ao DNA este equilíbrio pende em favor das “BH3-only” através de mecanismos de transcrição e modificações pós-traducionais, como a ubiquitinação. A ativação de cada tipo de proteína “BH3-only” depende do estímulo de morte sofrido pela célula.

Na maioria das vezes, as proteínas a serem ubiquitinadas são previamente marcadas por fosforilação em sítios específicos. Por exemplo, os baixos níveis da proteína pró-apoptótica Bim são regulados pela fosforilação de seu resíduo de serina 69 pela proteína quinase ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*). Essa fosforilação é o sinal para que Bim seja poliubiquitinada e direcionada para a degradação proteassômica. O aumento da expressão de Bim é induzido por estresse de retículo endoplasmático e privação de fatores de crescimento, que levam à sua desfosforilação pela

fosfatase 2A, portanto, perda do sinal de poliubiquitinação com cadeias poli-Ub K48 e estabilização dos níveis da proteína (Ley, Balmano et al., 2003). De maneira diferente, a ativação de Bid depende de sua clivagem pela caspase-8 e não envolve fosforilação. Após a clivagem de Bid, seu fragmento N-terminal é poliubiquitinado e degradado, permitindo a exposição da porção c-terminal, que possui o domínio BH3 responsável por sua ligação à Bax ou Bak, que então se oligomerizam e induzem a permeabilidade da MME (Tait, De Vries et al., 2007).

A estabilidade da proteína anti-apoptótica Mcl-1 é controlada pela fosforilação de resíduos de aminoácidos em suas sequências PEST (Prolina-Glutamato-Serina-Treonina), o que é o sinal para sua poliubiquitinação pela E3 ligase MULE (Mcl-1 Ubiquitina ligase) (Zhong, Gao et al., 2005). Quando o resíduo de treonina 163 é fosforilado pela proteína quinase ERK1/2 (Domina, Vrana et al., 2004), Mcl-1 é deubiquitinada e estabilizada pela ação de USP9X (Schwickart, Huang et al., 2010). Por outro lado, a fosforilação do resíduo de serina 159 pela proteína quinase GSK3 (*Glicogen sintase kinase 3*) é um sinal para a poliubiquitinação pela E3 ligase SCF^{Fbw7}, seguida de degradação proteassômica (Inuzuka, Shaik et al., 2011).

Apesar de Bcl-2 ter sido a primeira proteína anti-apoptótica da família Bcl-2 descrita, apenas o mecanismo de fosforilação que antecede sua ubiquitinação é conhecido (Siddiqui, Ahad et al., 2015). A fosforilação do resíduo de serina 70 de Bcl-2 pela proteína quinase C (PKC) é fundamental para a sua função anti-apoptótica (Ito, Deng et al., 1997), assim como a fosforilação do resíduo de serina 87 mediada por ERK, é essencial para protegê-la da degradação proteassômica. Quando este sítio é desfosforilado em resposta ao estímulo por TNF- α , Bcl-2 é poliubiquitinada e conduzida à degradação proteassômica, favorecendo a apoptose (Dimmeler, Breitschopf et al., 1999; Breitschopf, Haendeler et al., 2000). Um estudo recente conduzido por Rooswinkel e cols (2014) demonstrou que o potencial anti-apoptótico das proteínas da família Bcl-2 depende antes de sua estabilidade do que da afinidade por proteínas “BH3-only” ou Bax e Bak. De acordo com estes autores, a expressão de Mcl-1 é mais instável que Bcl-2 devido à rápida degradação proteassômica a que está sujeita, o que torna Bcl-2 mais eficiente na inibição da apoptose (Rooswinkel, Van De Kooij et al., 2014). Este fato evidencia a importância da identificação de E3 ligases e DUBS específicas

envolvidas na estabilização de Bcl-2 com o objetivo de desenvolver novos agentes terapêuticos capazes de induzir sua degradação proteassômica, neutralizando sua ação anti-apoptótica.

2.5 REGULAÇÃO DE C-FLIP PELO UPS

O principal inibidor de apoptose induzida por TRAIL é c-FLIP, que possui homologia com as caspases iniciadoras 8 e 10 e compete com elas pela ligação à FADD, inibindo a ativação destas caspases devido à falta de atividade catalítica em seu DED (Irmiler, Thome et al., 1997). Sua super-expressão está relacionada a 14% de aumento do risco de recorrência em pacientes com câncer colorretal e causa resistência à quimioterapia por 5-fluorocil, oxiplatina e camptotecina, sendo um indicador de mau prognóstico da doença (Longley, Wilson et al., 2006; Ullenhag, Mukherjee et al., 2007; Mclornan, Barrett et al., 2010). Estas características fazem da regulação negativa de c-FLIP uma estratégia importante no tratamento do câncer, fato que tem levado vários grupos de pesquisa a investigar os mecanismos de regulação desta proteína.

A expressão de c-FLIP é ativada pela via do NF κ B ao nível transcricional (Micheau, Lens et al., 2001) e regulada ao nível pós-traducional por uma ação mútua que envolve fosforilação, ubiquitinação e degradação proteassômica, que é diferenciada entre suas isoformas c-FLIP_L (longa), c-FLIP_s (curta) e c-FLIP_R (Raji) (Poukkula, Kaunisto et al., 2005; Kaunisto, Kochin et al., 2009; Wilkie-Grantham, Matsuzawa et al., 2013).

Em resposta à estimulação dos receptores de TNF- α e TRAIL, todas as isoformas de c-FLIP são fosforiladas por PKC no resíduo de serina 193. Esta fosforilação protege c-FLIP_s e c-FLIP_R da poliubiquitinação e degradação proteassômica, mas não c-FLIP_L (Kaunisto, Kochin et al., 2009). A E3 ligase AIP4 é a responsável pela poliubiquitinação e direcionamento para degradação proteassômica de c-FLIP_s, mas sua capacidade de ubiquitinação é abolida pela USP8 quando esta é ativada por Akt, resultando em resistência a apoptose induzida por TRAIL (Panner, Crane et al., 2010). A fosforilação de c-FLIP_s por ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) precede sua poliubiquitinação por c-Cbl e posterior degradação proteassômica, promovendo apoptose em

macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (Kundu, Pathak *et al.*, 2009).

Apesar de c-FLIP_L também ser protegida da poliubiquitinação pela fosforilação de S193 por PKC, sua estabilidade não é afetada. O significado desta resposta diferencial das isoformas de c-FLIP a um mesmo mecanismo de fosforilação ainda não foi elucidado (Kaunisto, Kochin *et al.*, 2009). No entanto, outros mecanismos de fosforilação e ubiquitinação de c-FLIP_L têm sido descritos. Após estimulação por TNF- α , a proteína quinase JNK1 (*Jun-N-terminal kinase 1*) fosforila e ativa a E3 ligase da família HECT Itch, que adiciona cadeias poli-Ub K48 a c-FLIP_L, direcionando-a à degradação proteossômica. Este é um dos mecanismos pelos quais a estimulação por TNF- α é capaz de recrutar e ativar a caspase-8 no complexo II da via clássica de NF κ B, induzindo apoptose (Micheau e Tschopp, 2003; Chang, Kamata *et al.*, 2006). A geração de ROS induz a degradação proteossômica de c-FLIP_L pela fosforilação da treonina 166 seguida de poliubiquitinação da lisina 167 (Wilkie-Grantham, Matsuzawa *et al.*, 2013). No entanto, as quinases e E3 ligases envolvidas no processo ainda não foram desvendadas. Em macrófagos, a degradação de c-FLIP_L tem sido atribuída à fosforilação do resíduo de serina 273 por Akt (Shi, Tran *et al.*, 2009). Em linhagens de melanoma, a poliubiquitinação de c-FLIP é inibida pela fosforilação promovida por CaMKII, conferindo resistência a apoptose induzida por TRAIL nestas células (Xiao, Yang *et al.*, 2005). Apesar do avanço na elucidação dos sítios de fosforilação de c-FLIP que precedem ou inibem a sua poliubiquitinação, a identificação de todas as E3 ligases e DUBs envolvidas no processo ainda depende de mais estudos.

2.6 O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF κ B COMO REGULADOR NEGATIVO DA APOPTOSE

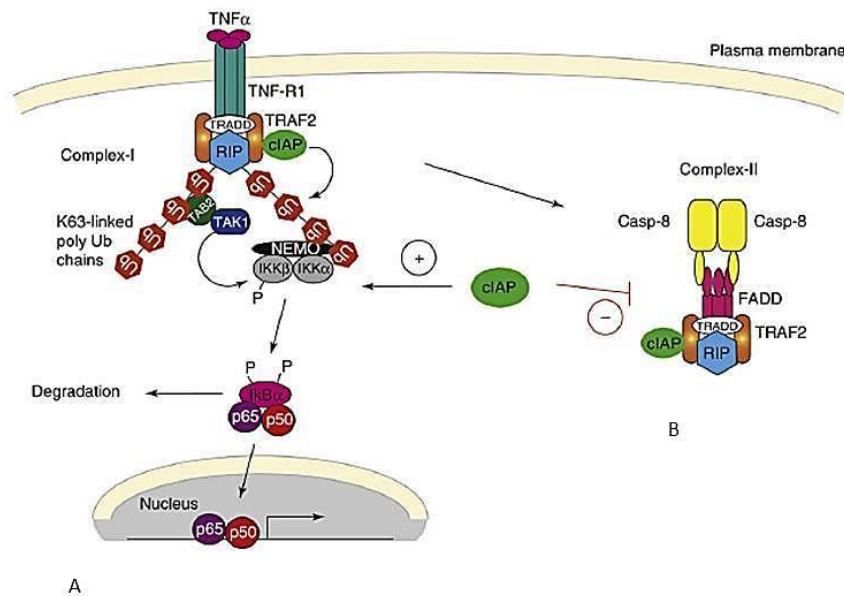
NF κ B é uma família de fatores de transcrição diméricos (p65/RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 e p52/p100) localizados no citoplasma, que compartilham um domínio RH (*Rel homology*). Após serem ativados, estes fatores são translocados para o núcleo, onde regulam a expressão de genes relacionados com imunidade e inflamação (Karin, 1999; Vallabhapurapu e Karin, 2009). O

domínio RH contém a sequência de localização nuclear dos fatores κ B, é responsável pela dimerização e ligação destes fatores ao DNA e é o sítio de ligação dos inibidores de NF κ B (I κ Bs) localizados no citoplasma, dos quais I κ B α é o melhor estudado (Karin, 1999).

Duas vias regulam a ativação de NF κ B (FIGURAS 9 e 10).

A via clássica é induzida pela estimulação de TNFR1 e resulta na ativação do heterodímero RelA/p50 (FIGURA 9). Esta via está envolvida no desencadeamento da resposta imune e ação pró-inflamatória. A via alternativa ou não-canônica é induzida, principalmente, pela estimulação do TNFR2 e ativa o heterodímero RelB/p52, estando envolvida na organogênese de órgãos linfoides secundários, maturação e sobrevivência de linfócitos B e metabolismo ósseo (Karin e Lin, 2002; Karin, 2006; Sun, 2011).

FIGURA 9 – VIA CLÁSSICA DE ATIVAÇÃO DO NFκB



A – Via clássica, complexo I. Quando o receptor TNFR1 é estimulado por TNF- α , o complexo I é formado, ligado à porção intracitoplasmática do receptor. Este complexo I é composto por TRADD, TRAF2 e RIP1, que é poliubiquitinada com cadeias poli-Ub K63 por c-IAP1/2. O arcabouço formado favorece a aproximação dos complexos quinase TAK1-TAB2 e IκK. O complexo IκK se liga ao arcabouço por meio de sua subunidade NEMO e da cadeia LUBAC (não representada na figura). TAK1-TAB2 então fosforila a subunidade IκKβ do complexo IκK, que fosforila IκBα. Quando fosforilado, IκBα é poliubiquitinado pela E3 ligase SCF^{βTRCP} (não representada na figura) e direcionado para degradação proteossômica, liberando o dímero RelA/p50 (p65/p50) para que entre no núcleo e inicie a transcrição de genes relacionados à inflamação e sobrevivência celular. B – Via clássica, complexo II. Quando o estímulo efetuado por TNF- α não é eficiente na ativação do dímero RelA/p50 (p65/p50), o complexo I se dissocia do receptor e se solubiliza no citoplasma onde recruta FADD e caspase-8, formando o complexo II que contribui para a indução de apoptose quando os níveis de c-FLIP são mantidos baixos.

Adaptado de Broemer e Meier (2009); Micheau e Tschopp (2003)

Na via clássica, na ausência de estímulo do TNFR1 ou TLR (*Toll-like Receptor*) pela ligação de TNF- α , lipopolissacarídeo (LPS) ou interleucina-1 (IL-1), os dímeros de NFκB são mantidos no citoplasma ligados ao IκBα, de maneira que sua sequência de localização nuclear fique inacessível. Após estimulação do receptor, proteínas adaptadoras como TRADD (*TNF-Receptor*

Associated Death Domain), TRAF1/2 (*TNF-Receptor Associated Factor*) e RIP (*Receptor-interacting protein*) são recrutadas para interagir com a porção intracitoplasmática do receptor formando o complexo I, associado a membrana plasmática (Karin, 1999; Micheau e Tschopp, 2003). Este complexo recruta clAP1/2 que adicionam cadeias poli-Ub K63 à RIP1 formando um arcabouço de ancoragem para os complexos de quinases TAK1-TAB2 (*Transforming growth factor β -activating kinase 1 – TAK-binding protein*) e I κ K (*I κ B kinase*) (FIGURA 9a) (O'donnell, Legarda-Addison *et al.*, 2007; Bertrand, Milutinovic *et al.*, 2008).

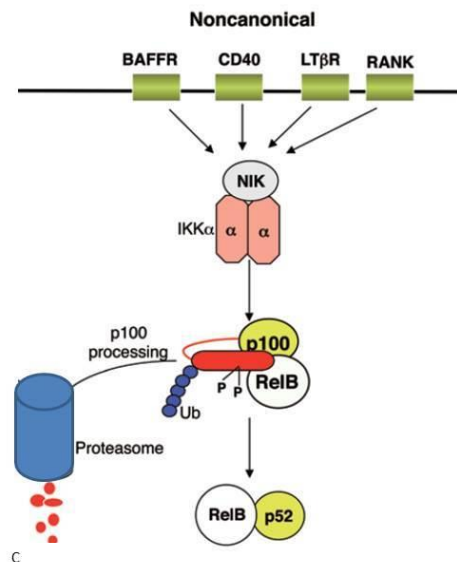
O complexo I κ K é composto por duas subunidades catalíticas denominadas I κ K α e I κ K β , e uma subunidade regulatória denominada I κ K γ ou NEMO (*NF κ B Essential Modulator*), que se liga às cadeias poli-Ub K63 ligadas à RIP através de um complexo intermediário denominado LUBAC (*Linear Ubiquitin chain Assembly Complex*) (Gerlach, Cordier *et al.*, 2011; Kocab e Duckett, 2016). LUBAC modifica o complexo I κ K e garante sua proximidade com TAK1-TAB2, o que é necessário para a fosforilação da subunidade I κ K β no arcabouço formado pela poliubiquitinação de RIP (Ea, Deng *et al.*, 2006). Então, I κ K β se torna ativada e fosforila I κ B α (Miyamoto, Maki *et al.*, 1994), gerando o sinal para que este seja poliubiquitinado com cadeias poli-Ub K48 pela E3 ligase SCF ^{β TRCP}. I κ B α fosforilado (pI κ B α) é direcionado para a degradação proteossômica, permitindo a entrada do heterodímero p65/p50 (ou RelA/p50) no núcleo, onde ativa a transcrição de genes relacionados à resposta inflamatória e sobrevivência celular (Broemer e Meier, 2009; O'donnell e Ting, 2012) (Figura 9a).

Micheau e Tschopp (2003) demonstraram que após o estímulo inicial de TNFR1, o complexo I se dissocia do receptor e associa-se a FADD e caspase-8 no citoplasma, formando, 16 horas após o estímulo, o complexo II. Este complexo é capaz de induzir apoptose quando a ativação do complexo I não é eficiente em ativar a transcrição de c-FLIP (Micheau, Lens *et al.*, 2001; Micheau e Tschopp, 2003) (FIGURA 9b).

A ativação da via não-canônica (ou alternativa) de NF κ B depende da ativação da quinase inibitória de NF κ B (*NF κ B Inhibitory Kinase - NIK*) após estimulação de diferentes receptores como TNFR2, CD40, receptor de Linfotóxina Beta (LT β R) e RANK (*Receptor activator of NF κ B*) que possuem

domínios de recrutamento das proteínas adaptadoras TRAF2 e TRAF3 (Sun, 2011) (FIGURA 10).

FIGURA 10 – VIA NÃO CANÔNICA OU ALTERNATIVA DE NFκB



Ativação da via não-canônica de NFκB. Quando outros receptores de superfície, que não TNFR1 ou TLR, são estimulados, ocorre a ativação da quinase NIK, que fosforila a subunidade IκKα do complexo IκK. Esta subunidade fosforila e sinaliza a ubiquitinação do heterodímero p100/RelB, que é degradado parcialmente pelo proteassomo, originando o heterodímero p52/RelB que é translocado para o núcleo.

FONTE: Adaptado de Sun (2011)

Na ausência de estimulação dos receptores, NIK se mantém associada ao complexo TRAF2/3-cIAP e é constantemente poliubiquitinada pela c-IAP e degradada pelo proteassomo, de maneira que seus níveis são quase indetectáveis (Varfolomeev, Blankenship *et al.*, 2007). Após estimulação específica de um dos receptores acima citados, cIAP promove sua auto-ubiquitinação, assim como a ubiquitinação de TRAF2/3, resultando em acúmulo de NIK, que ativa a subunidade IκKα do complexo IκK (Senftleben, Cao *et al.*, 2001). Então, IκKα promove a fosforilação de p100 em resíduos de serina específicos, sinalizando a sua ubiquitinação. Então, p100 é degradada parcialmente, gerando o fragmento p52 e expondo sua sequência de

localização nuclear para que o heterodímero p52/RelB entre no núcleo (FIGURA 9) (Sun, 2011).

A inibição da apoptose, juntamente com a ativação de genes pro-inflamatórios, faz com que a via clássica de NFκB seja considerada um fator-chave no desenvolvimento do câncer, progressão tumoral e aquisição de quimioresistência.

Evidências epidemiológicas que relacionam a inflamação crônica e certas infecções ao estabelecimento de câncer despertaram a necessidade de se investigar a participação de vias pro-inflamatórias no processo de tumorigênese. A partir destas investigações, TNF-α emergiu como a principal citocina ativadora da via de NFκB e inibidora de apoptose (Karin e Lin, 2002; Karin, 2006). Esta conclusão é o resultado de estudos envolvendo modelos animais mutantes *RelA⁻/RelA⁻* (Beg, Sha *et al.*, 1995) e estudos *in vitro* envolvendo IκBs super-repressores incapazes de liberar NFκB do citoplasma para o núcleo, (Van Antwerp, Martin *et al.*, 1996), os quais demonstraram que TNF-α é capaz de induzir extensiva apoptose na ausência de NFκB.

A ação anti-apoptótica de NFκB se deve à ativação da transcrição de genes codificadores de proteínas anti-apoptóticas como c-FLIP, Bfl-1, Bcl-X_L, cIAP1/cIAP2, survivina e XIAP, após a estimulação de TNFR1, promovendo sobrevivência celular (Micheau, Lens *et al.*, 2001; Karin e Lin, 2002; Lin, Guan *et al.*, 2010), o que torna a regulação negativa de NFκB uma estratégia interessante a ser usada nas terapias de combate ao câncer. A investigação de proteínas envolvidas no UPS como A20, CYLD (cilindromatose) e USP11 nos fornecem pistas sobre novos alvos terapêuticos capazes de atenuar a sinalização de NFκB.

A20 é um potente inibidor de NFκB. Esta proteína possui um domínio DUB do tipo OTU na extremidade amino-terminal que remove as cadeias poli-Ub K63 de RIP1, desmontando o arcabouço que promove a ativação de NFκB. Ao mesmo tempo, através de seu domínio RING presente na extremidade c-terminal, A20 adiciona cadeias poli-Ub K48 à RIP1 e a encaminha à degradação proteassômica (Wertz, O'rourke *et al.*, 2004; Heyninck e Beyaert, 2005).

CYLD é uma DUB que foi inicialmente identificada em famílias com predisposição à formação de tumores benignos de apêndices da pele, condição

conhecida como cilindromatose. CYLD regula negativamente a ativação de NFκB ao remover as cadeias poli-Ub K63 de TRAF2 e NEMO, que compõem o arcabouço necessário para a ativação da via (Kovalenko, Chable-Bessia *et al.*, 2003; Trompouki, Hatzivassiliou *et al.*, 2003). A baixa expressão desta proteína nas famílias predispostas á cilindromatose estabiliza o arcabouço de ativação de NFκB, o que contribui não só para a formação dos tumores na cilindromatose, mas também para o estabelecimento de melanoma e carcinoma de células basais (Harhaj e Dixit, 2012).

Além de A20 e CYLD, outras DUBs também têm participam da regulação negativa de NFκB. USP11 remove as cadeias poli-Ub K48 de IκBα, inibindo sua degradação e translocação de NFκB para o núcleo (Sun, Tan *et al.*, 2010), USP21 e USP7 desmontam o arcabouço de ativação de NFκB ao remover, respectivamente, as cadeias poli-Ub K63 de RIP1 (Xu, Tan *et al.*, 2010) e de NEMO (Li, Guan *et al.*, 2014).

2.7 TOXINAS ANIMAIS COMO FONTE DE AGENTES TERAPÊUTICOS

Venenos e toxinas de origem animal são considerados uma fonte promissora de novas moléculas biologicamente ativas e têm sido amplamente estudados como potenciais agentes terapêuticos, resultando no desenvolvimento de novas drogas. A mais conhecida é o anti-hipertensivo Captopril, desenvolvido a partir do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* na década de 1970 (King, 2011). Apesar do sucesso desta descoberta, uma série de dificuldades na obtenção, manutenção e caracterização das toxinas, somadas à falta de investimento por parte das indústrias farmacêuticas, dificultaram o desenvolvimento de novas drogas a partir destes compostos (Zambelli, Pasqualoto *et al.*, 2016). No entanto, nos últimos anos, graças a novos investimentos e aos avanços tecnológicos disponíveis, novas drogas derivadas de venenos e toxinas animais foram desenvolvidas e aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration, USA*). Entre elas estão o analgésico Ziconotide (nome comercial: Prialt®, Elan Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA), derivado do veneno da lesma-do-mar *Conus magus* e o regulador da glicemia Exenatida (nome comercial: Byetta®, Amylin and Eli Lilly), obtido da

saliva do lagarto norte-americano *Heloderma suspectum* (King, 2011; Zambelli, Pasqualoto *et al.*, 2016).

A complexa mistura de substâncias biologicamente ativas encontradas no veneno de serpentes faz com que estes sejam especialmente estudados na busca por novos agentes terapêuticos no tratamento contra o câncer (Jain e Kumar, 2012; Liu, Yang *et al.*, 2014) Entre estas substâncias estão as lectinas tipo c (*c-type lectins* – CTL) (Ogawa, Chijiwa *et al.*, 2005; Sartim e Sampaio, 2015).

CTL são proteínas que possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos específico e que, na presença de cálcio, exercem diversos efeitos biológicos, como modulação do sistema imunológico (Santiago, Leitao *et al.*, 2014), agregação plaquetária (Panunto, Da Silva *et al.*, 2006), regulação da proliferação (Jebali, Fakhfekh *et al.*, 2014) e adesão celular (Marcinkiewicz, 2013) e indução de morte celular (Yau, Dan *et al.*, 2015). Mais de 80 CTLs já foram isoladas do veneno de diferentes espécies de serpente, entre elas, a BJcuL (Ozeki, Matsui *et al.*, 1994; Ogawa, Chijiwa *et al.*, 2005).

2.8 BJCuL E SUAS MÚLTIPLAS PROPRIEDADES

BJcuL é uma CTL derivada do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararacussu*. É composta por 135 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 32 KDa e apresenta afinidade por β -D-galactosídeos (Carvalho, Marangoni *et al.*, 1998; De Carvalho, Marangoni *et al.*, 2002). Ela vem sendo descrita como uma molécula capaz de inibir o crescimento de células tumorais de mama, pâncreas, rim, ovário e glia, além de inibir o crescimento do tecido endotelial (Pereira-Bittencourt, Carvalho *et al.*, 1999; De Carvalho, Schmitmeier *et al.*, 2001). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que BJcuL age sobre o sistema imunológico, sendo capaz de ativar neutrófilos e macrófagos, modulando a resposta imune inata, sem causar citotoxicidade (Elifio-Esposito, Tomazeli *et al.*, 2011; Dias-Netipanyj, Boldrini-Leite *et al.*, 2016). Nós também demonstramos que BJcuL induz apoptose em células de tumor gástrico das linhagens MKN45 e AGS (Nolte, De Castro Damasio *et al.*, 2012). Ao testar os efeitos de BJcuL sobre as células de câncer colorretal HT29 observamos aumento da marcação imunohistoquímica de TRAIL, FADD,

caspase-8 e Bax, associado à diminuição da taxa de respiração celular seguida de liberação de citocromo c (Damasio, Nolte *et al.*, 2014). Estes achados nos levaram a atribuir uma ação pró-apoptótica de BJcuL sobre as células HT29, a qual poderia interferir na apoptose induzida por TRAIL, talvez revertendo a resistência que estas células apresentam à esta citocina (Ashkenazi, Pai *et al.*, 1999; Van Geelen, De Vries *et al.*, 2004).

A morte celular programada é um processo complexo que envolve um grande número de moléculas e organelas que agem orquestradas em diferentes vias intracelulares. Os processos de indução de morte e de sobrevivência são controlados por diversos agentes reguladores endógenos presentes nos meios intra e extracelular, que definirão em conjunto o destino celular. Os mecanismos capazes de regular a apoptose envolvem o equilíbrio entre proteínas anti- e pró-apoptóticas, e também outras vias de sinalização que exercem regulação mútua, promovendo ou inibindo a apoptose de acordo com o tipo celular e as condições fisiológicas em que as células se encontram. Estes mecanismos foram detalhados neste trabalho a fim de auxiliar a compreensão da complexa regulação do processo de morte celular e da forma com que BJcuL pode estar afetando o destino celular.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer tem sido considerado um conjunto de diferentes doenças, visto que seu estabelecimento se deve à alterações de diferentes aspectos da fisiologia celular.

A indução de apoptose é o principal alvo das estratégias quimioterápicas hoje utilizadas, no entanto, a aquisição de resistência por certos tipos de tumor abre a necessidade de se buscar novas drogas, capazes de contornar os mecanismos de adaptação pró-sobrevivência desenvolvidos pelas células tumorais. O mecanismo de morte celular envolve muitas vias diferentes e seu estudo revela diferentes alvos interessantes para terapia. No entanto, muitos dos mecanismos que regulam a apoptose ainda são mal compreendidos e precisam ser melhor explicados. Neste contexto, não apenas a busca de novas drogas é importante, mas também a busca de novos compostos capazes de indicar pistas sobre a regulação molecular que auxiliem na elucidação de tais mecanismos.

Muitas das pesquisas realizadas no Brasil que visam o uso de venenos e toxinas animais como fonte de novos compostos biologicamente ativos acabam por fornecer muitas informações sobre seus efeitos, mas falham ao explorar os mecanismos por trás deles. O aprofundamento das pesquisas na busca por estas respostas é fundamental para a valorização da produção científica e tecnológica nacional, visto que a riqueza de nossa biodiversidade nos fornece uma ampla gama de compostos com potencial para o desenvolvimento de novas drogas, marcadores biológicos e registro de patentes.

BJcuL é uma molécula que apresenta múltiplas possibilidades de aplicação, cujos efeitos têm sido amplamente descritos, mas cujos mecanismos ainda demandam estudos mais aprofundados para que seja validada como um composto útil para aplicação na clínica ou na pesquisa pré-clínica.

Resultados anteriores sugeriram que BJcuL induziria apoptose nas células de CCR HT29, e poderia exercer alguma interferência na apoptose induzida por TRAIL, o que levou ao desenvolvimento deste trabalho.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a ação pró-apoptótica de BJcuL em células tumorais colorretais das linhagens HT29 e HCT116 e sua habilidade em sensibilizar estas células ao TRAIL.

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Avaliar a citotoxicidade de BJcuL e o seu impacto na indução da apoptose promovida por TRAIL,
- Investigar a expressão de marcadores anti e pró-apoptóticos nas células tumorais tratadas com BJcuL, TRAIL ou em combinação,
- Investigar as vias sinalizadoras intracelulares pelas quais BJcuL, TRAIL ou sua combinação promovem apoptose.

5 METODOLOGIA E RESULTADOS

O desenvolvimento e resultados obtidos são apresentados nas páginas seguintes, na forma de artigo submetido e aguardando resposta.

A formatação é a exigida pela revista *Archives of Toxicology*, FI 6,637, área Medicina I da CAPES. Para facilitar a leitura, o tamanho da fonte foi aumentado aqui.

BJcuL, a c-type lectin obtained from *Bothrops jararacussu* venom, induces accumulation of anti-apoptotic proteins in two colorectal cancer cell lines through interference in ubiquitin systemL. Zischler^{1,2}, O. Micheau^{3,4}, S. Elifio-Esposito^{1,2}¹ Health Science Postgraduate Program, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil.² School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil.³ Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR866, F-21000 Dijon, France.⁴ INSERM, LNC UMR866, F-21000 Dijon, France.Corresponding author: L. Zischler, luciana.zischler@pucpr.br**Keywords :** snake venom C-type lectin – colorectal cancer – c-FLIP – survivin – ubiquitin system – deubiquitinase**Abstract**

BJcuL is a C-type lectin purified from the venom of *Bothrops jararacussu*, which binds specifically to β -D-galactosides. Pro-inflammatory and antitumor effects have been related to BJcuL, as it activates neutrophils and macrophages, besides decreasing growth in different tumor cell lines. Recently, it was found that BJcuL is able to induce accumulation of pro-apoptotic proteins of the extrinsic pathway, such as FADD and caspase-8, in the colorectal cancer cell line HT29, suggesting that this lectin may be able to enhance TRAIL-induced apoptosis. To test this hypothesis, two colorectal cancer cell lines, HT29 and HCT116, were stimulated with increasing concentrations of BJcuL (1-20 μ g/mL) in presence or absence of TRAIL. Contrary to our expectations, however, BJcuL was found to be unable to induce apoptosis in these cells, as monitored by annexin-V/7AAD, clonogenic assays and immunoblotting. However, besides FADD and caspase-8, BJcuL was also found to induce the accumulation of anti-apoptotic proteins, as c-FLIP and survivin, as well as accumulation of poly-ubiquitinated proteins. Previous stimulation with the inhibitor of deubiquitinases WP1130 (10 μ M) resulted in decrease of BJcuL-induced survivin levels. This result indicates that BJcuL is not inhibiting the proteasome, but interfering in the activity of deubiquitinases. Altogether, our results suggest for the first time, that this C-type lectin derived from snake venom exerts effects on the ubiquitin system. Compounds able to influence such system are important tools in the search for new therapeutic targets in cancer or degenerative diseases, since they can elucidate molecular mechanisms engaged in the determination of cell fate.

Acknowledgements

The authors thank the Butantan Institute/Brazil for providing *B. jararacussu* venom. L. Zischler was supported by fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior/Brazil (CAPES - N° BEX4938/14-3).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Introduction

Animal venoms are considered promising sources of novel biologically active molecules. In particular, snake venom toxins have been widely studied as potential therapeutic agents (Liu, Yang *et al.*, 2014). C-type lectins (CTL) are among the well-known components of snake venoms. They present the peculiar ability to interact with β -D-galactosides glycoligands and therefore exert extensive biological effects such as immune system modulation, platelet aggregation, cell proliferation, cell adhesion and cell death induction (Ogawa, Chijiwa *et al.*, 2005; Sartim e Sampaio, 2015; Yau, Dan *et al.*, 2015). Antitumor activity of snake venom CTL has been described and attributed to cell proliferation arrest and apoptosis induction, pointing to the investigation of either new targets for cancer therapy or new biological markers useful for the research of cancer-related pathways. However, detailed investigations concerning the cellular pathways targeted by snake venom CTL are still necessary (Yau, Dan *et al.*, 2015).

Apoptosis is a programmed cell death mechanism triggered by intrinsic (mitochondrial) or extrinsic pathways (Fulda e Debatin, 2006). In order to maintain the cellular homeostasis, both pathways are regulated by a balance between apoptotic and anti-apoptotic proteins (Strasser, Cory *et al.*, 2011), which can occur in three levels: (1) at the membrane, by recruitment of the key inhibitor of extrinsic apoptosis c-FLIP (cellular Fas-associated death domain-like interleukin 1 β -converting enzyme inhibitory protein), which compete with caspases 8 or 10 for the interaction with FADD in the assembly of DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Irmeler, Thome *et al.*, 1997); (2) at the mitochondria, where anti-apoptotic proteins from Bcl-2 family inhibit Bax/Bak oligomerization, preventing the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Adams e Cory, 2007) and; (3), at the distal level, downstream cytochrome c release, by the assembly of a survivin-XIAP complex able to inhibit caspase-9 activation, blocking therefore, the apoptotic effects of cytochrome c (Dohi, Okada *et al.*, 2004; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014).

c-FLIP, Bcl-2 and survivin overexpression is correlated to poor prognostic in cancer patients (Ullenhag, Mukherjee *et al.*, 2007; McIornan, Barrett *et al.*, 2010; Zeestraten, Benard *et al.*, 2013) and to acquisition of resistance to chemotherapies, making them potential therapeutic targets for cancer treatments (Micheau, Shirley *et al.*, 2013; Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014; Opferman, 2015). However, the development of targeted therapies for cancer focused on downregulation of these proteins claims for wide knowledge of molecular mechanisms regulating their expression. Anti-apoptotic proteins c-FLIP and survivin have their transcriptional regulation well understood and extensively described (Micheau, Lens *et al.*, 2001; Chen, Duan *et al.*, 2016). At the post-translational level, it is known that the anti-apoptotic proteins c-FLIP and survivin expression can be regulated by the ubiquitin system (US). This mechanism works under the balance of E3 ligases and deubiquitinases, however, how it is regulated is not completely understood (Wilkie-Grantham, Matsuzawa *et al.*, 2013; Karpel-Massler, Banu *et al.*, 2016). The ability to rapidly regulate the expression of key proteins engaged in the apoptosis pathways makes both E3 ligases and DUBs potential therapeutic targets for cancer treatments (Liu, Shaik *et al.*, 2015).

BJcuL is a CTL purified from *Bothrops jararacussu* venom which has pro-inflammatory potential as demonstrated by the activation of neutrophils and macrophages in vitro, without causing cytotoxicity (Elifio-Esposito, Tomazeli *et al.*, 2011; Dias-Netipanyj, Boldrini-Leite *et al.*, 2016). BJcuL is

also able to decrease the growth of breast, pancreatic, renal, ovarian and glioma tumor cells, as well as of endothelial tissue (Pereira-Bittencourt, Carvalho *et al.*, 1999; De Carvalho, Schmitmeier *et al.*, 2001). Our group has shown that BJcuL induces apoptosis in MKN45 gastric tumor cells and AGS cell lines (Nolte, De Castro Damasio *et al.*, 2012). When assessing BJcuL effects on the colorectal cancer (CRC) cell line HT29, increased immunohistochemistry staining of TRAIL, FADD, caspase 8 and Bax was observed, in addition to decreasing cellular respiration rate, followed by an increment in the release of cytochrome c (Damasio, Nolte *et al.*, 2014). These findings suggested that BJcuL exerts pro-apoptotic action on HT29 cells, which could be involved with TRAIL-induced apoptosis. Therefore, the aim of this study was to further investigate BJcuL effect on CRC cell lines HT29 and HCT116. The results presented herein reveal that BJcuL does modulate different molecules involved in cell fate. However, its action does not culminate in the appropriate conclusion of apoptosis in the both cell lines here studied. Instead, we disclose a new action of this lectin: BJcuL is involved in the stabilization of the levels of c-FLIP and survivin, acting via the ubiquitin system (US), involving the participation of deubiquitinases. Compounds with ability to influence such posttranslational regulation of proteins are important tools in the search for new therapeutic targets, since they can be used to elucidate key molecular mechanisms involved in the fine protein balance responsible for the determination of cell fate.

Material and Methods

BJcuL purification

The venom of the snake *Bothrops jararacussu* was provided by the Butantan Institute (São Paulo – Brazil) in the form of lyophilized pool and was stored in a freezer at - 20° C until use. BJcuL was purified from crude venom by affinity chromatography on an agarose-D-galactose column as described previously (Elifio-Esposito, Hess *et al.*, 2007).

Cell culture and treatment

Human CRC cell lines HT29 and HCT116 and mouse embryonic fibroblasts (MEF) were obtained from the American type culture collection (ATCC). Cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Dominique Dutscher, Brumath, France) containing 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum under humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Cells were incubated with BJcuL in concentrations from 1 µg/mL to 20 µg/mL based on previous studies (Nolte, De Castro Damasio *et al.*, 2012; Damasio, Nolte *et al.*, 2014) for 24h at 37°C, followed or not by TRAIL (500 ng/mL or 1 µg/mL) incubation for 8h. To evaluate the cytotoxic effect of BJcuL on non-tumor cells, MEF were stimulated with BJcuL in the same conditions as the CRC cells. For this cell line, 2 µM staurosporin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was used for 24h as a positive control of apoptosis. To obtain a positive control for NFκB pathway, HT29 and HCT116 cells were also treated with TNF-α (500 ng/mL) for 10 and 60 minutes, followed or not by BJcuL (2.5 and 20 µg/mL) at different time points (from 10 minutes to 24h). To check the activity of DUBs after BJcuL stimulation, HCT116 cells were stimulated

for 30 minutes with 10 μ M WP1130 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), followed by BJcuL (2.5 μ g/mL) for 60 minutes.

Viability and apoptosis assays

Annexin-V/7AAD staining. Cells were seeded in 12-well plates (1×10^4 cells/well) and treated as described above. Following treatment, cells were harvested by trypsinization and stained with annexin-V and 7AAD (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) according to the manufacturer's instruction. Cells were subjected to flow cytometry analysis in BD FACScalibur instrument (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software.

Clonogenic Assay. HT29 and HCT116 cells were seeded in 12-well plates (2×10^2 cells/well) and treated with BJcuL and TRAIL as described above. After 24h of incubation, the treatment was removed and the cells were maintained in culture for 14 days. Cells were washed, fixed in methanol and stained with 0.05% methylene blue solution (Sumantran, 2011).

Western blotting

Cell lysates were obtained using modified RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X100, 0.05% SDS, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), containing protease and phosphatase inhibitors (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The lysates were resolved on SDS-PAGE (12% or 15%) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were blocked for 1h in 5% non-fat dry milk or BSA in PBS or TBS containing 0.05% Tween 20, incubated with primary antibody for 2h at room temperature (RT) or overnight at 4°C, washed and incubated for 1h with secondary antibody at RT. After washing three times, the chemiluminescence was detected using Western Bright Quantum kit (Advansta, Menlo Park, CA, USA) and visualized by ChemiDoc MP gel imager (Bio-Rad).

Antibodies

Primary antibodies (1:500 or 1:1000): Caspase 3 (8G10) and Caspase 8 (5F7) were obtained from Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France), FADD (06-711) is from Millipore (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), Cleaved Lamin A/C (Asp230) is from Epitomics (Abcam, Paris, France), Survivin (2808) is from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin, France), Human Survivin antibody is from R&D Systems (Lille, France), HSC70 (SC7248), I κ B α (C-21 – SC371), pI κ B α (SC101713), FLIP (G11) and Ubiquitin (P4D1 – SC8017) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CliniSciences, Nanterre, France). Secondary antibodies (1:10000): HRP-conjugated anti-rabbit were obtained from Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France), HRP-conjugated anti-mouse IgG1-, Ig2a- and Ig2b-specific antibodies were from Southern Biotech (Clinisciences, Nanterre, France).

Results

Effects of BJcuL on the viability of colorectal cancer cell lines.

The increase of FADD and Caspase 8 levels detected before through immunocytochemistry staining in HT29 cells stimulated by BJcuL (Damasio et al. 2014) was confirmed by immunoblot and detected also in HCT116 cells (Fig. 1a).

The effect of BJcuL on the viability of HT29 and HCT116 cells was examined by flow cytometry. Cells were treated with BJcuL (1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence or absence of TRAIL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and stained by annexin V/7-AAD. Figure 1b shows that BJcuL in concentrations above 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced less than 20% of cell death in HCT116 treated cells, while HT29 cells showed no increase in cell death, as compared to untreated control. In order to test if BJcuL could sensitize CRC cells to TRAIL-induced apoptosis, BJcuL stimulus was removed after 24h and a new medium containing TRAIL was added. No significant alteration in the percentage of cell death was observed indicating no interference of this lectin on TRAIL signaling pathway (Fig. 1b). TRAIL alone induced apoptosis in around 80% of HCT116 cells while HT29 cells showed only 20% of cell death, consistent with the TRAIL-induced apoptosis resistance previously described for this cell line (Ashkenazi, Pai *et al.*, 1999; Van Geelen, De Vries *et al.*, 2004). To evaluate the cytotoxic effect of BJcuL on non-tumor cells, MEF cells were subjected to the same BJcuL stimulation as described above. Since these cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis, 2 μM staurosporine for 8h was used as positive control. BJcuL was able to induce some apoptosis in such cells (Fig. 1c). However, as shown in HCT116 cells subjected to a clonogenic assay, the cytostatic effect of BJcuL was almost negligible (Fig. 1d). Supporting these findings, immunoblotting experiments clearly indicate that BJcuL, at the opposite of TRAIL, is unable to induce caspase-8, caspase-3 or lamin A/C cleavage (Fig. 1e). As expected, the cleavage of these proteins is observed in HCT116 TRAIL-sensitive cells after TRAIL stimulation, even when they are previously stimulated with BJcuL (Fig. 1e, left panel). No cleaved caspases were observed in HT29 cells stimulated under both conditions (Fig. 1e, right panel). Taken together, these findings indicate that BJcuL does not induce apoptosis neither interferes in TRAIL-induced apoptosis in these both CRC cells.

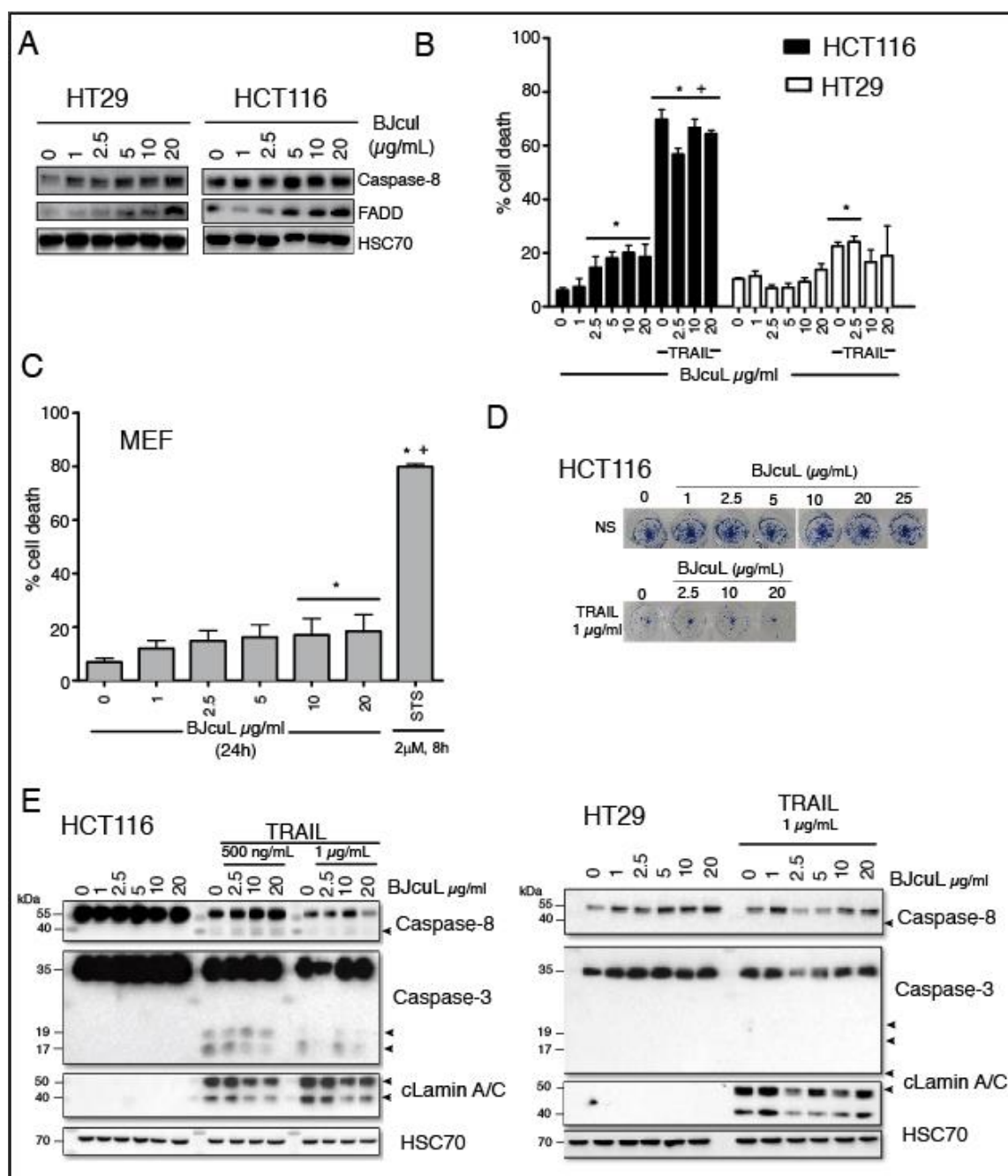


Fig 1 Effect of BJcuL in the viability of CRC cells HT29 and HCT116 and MEF cells. (a) BJcuL raise the levels of FADD and caspase 8 in CRC cells stimulated by BJcuL for 24h at concentrations from 1 µg/mL to 20 µg/mL. (b) Both CRC cell lines were also stimulated by TRAIL 1 µg/mL for 24h, in the combination or not with BJcuL for 24h. Cell death percentage was assessed by Annexin-V/7AAD staining. (c) MEF cells were stimulated by BJcuL in the same conditions as the CRC cells and by STS 2 µM for 8h as positive control. (d) Clonogenic Assay. After stimulation with BJcuL (24h), TRAIL (24h) or in combination of both stimuli at the same concentrations as for cytometry analysis, HCT116 cells were cultivated for 14 days and stained by 0.05% methylen blue solution. (e) Immunoblotting showing the expression of pro-apoptotic proteins in HCT116 (left panel) and HT29 cells (right panel). HSC70 was used as loading control. Symbols: * indicates significant difference among treatments and the control, + indicates significant difference among TRAIL, TRAIL+BJcuL or STS treatment and BJcuL treatment (Results are mean +/- SD of at least three replicates. P values <0.05 were accepted as significant)

BJcuL raises and stabilizes the levels of anti-apoptotic proteins

Despite its ability to increase FADD, caspase-8 and cytochrome c release (Fig. 1a) (Damasio, Nolte *et al.*, 2014), BJcuL is unable to trigger apoptosis or to increase sensitivity to TRAIL, in both HT29 and HCT116 cells (Fig. 1b and c). We therefore investigated the possibility that this lectin may also alter the steady state levels of anti-apoptotic proteins such as c-FLIP and survivin.

c-FLIP

Both cell lines showed increased levels of c-FLIP_L (Fig. 2) observed 10 minutes after BJcuL stimulation. HT29 cells showed also an increase in c-FLIP_s expression, 24h after stimulation (Fig. 2, lower panel). Since c-FLIP is known to be upregulated through activation of the transcription factor NF- κ B after TNF- α stimulation (Micheau, Lens *et al.*, 2001), we investigated whether NF- κ B activation may account for the regulation of c-FLIP after BJcuL stimulation. To address this question, phosphorylation and degradation of I κ B α were analyzed by immunoblot after BJcuL stimulation and/or stimulation with TNF- α . As expected, TNF- α stimulation induced both the degradation and the phosphorylation of I κ B α in these cells after 10 and 60 minutes, respectively (Fig. 2). After BJcuL stimulation, however, I κ B α was neither degraded nor phosphorylated, indicating that regulation of c-FLIP protein levels after BJcuL stimulation is independent of the activation of the NF- κ B pathway. Importantly, in cells stimulated with BJcuL for 24h, then incubated in the presence of TNF- α , the kinetics of phosphorylation and degradation of I κ B α were altered. Likewise, in these conditions, phosphorylation of I κ B α in HCT116 cells was readily detectable 10 minutes after stimulation, instead of 60 minutes, when cells are stimulated with TNF- α alone. Interestingly, degradation of I κ B α elevated up to 60 minutes after TNF- α stimulation in BJcuL treated cells, while in the absence of BJcuL, I κ B α expression levels returned to normal, owing to NF- κ B's ability to induce I κ B α transcription.

Survivin

The BJcuL-induced release of cytochrome c observed before in HT29 cells (Damasio, Nolte *et al.*, 2014), though without induction of apoptosis in CRC cells, as observed in figure 1b, led us to evaluate survivin levels in such cells, once this protein is involved in apoptosis inhibition downstream MOMP (Dohi, Beltrami *et al.*, 2004; Dohi, Okada *et al.*, 2004). After BJcuL stimulation at 2.5 μ g/mL or 20 μ g/mL from 10 minutes to 24h, both HCT116 and HT29 cells show evident increase of survivin expression (Fig. 2).

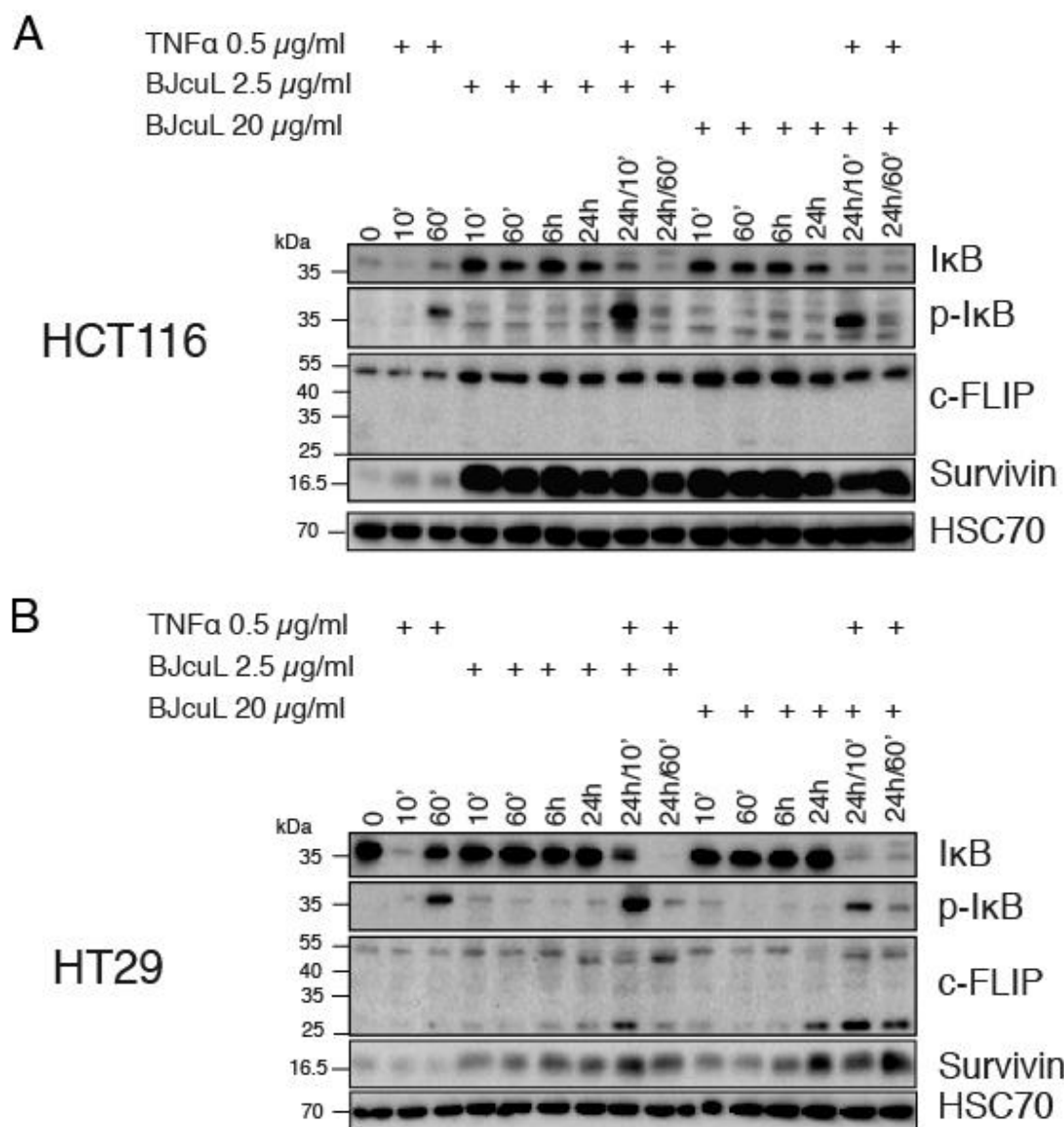


Fig 2 BJcuL raises the levels of protein expression. Cells were stimulated with BJcuL for 10 minutes to 24h at concentrations from 1 μ g/mL to 20 μ g/mL, in combination or not with TNF- α at 500 ng/mL for 10 and 60 minutes. BJcuL interferes in the dynamics of I κ B α degradation when the cells are previously stimulated by TNF- α and upregulates c-FLIP and survivin in HCT116 (A) and HT29 cells (B).

BJcuL-induced rise of anti-apoptotic proteins levels is related to US and can be reversed by WP1130, an inhibitor of DUBs

Considering the accumulation of both pro- and anti-apoptotic proteins (Fig. 1a and 2) observed after BJcuL stimulation, and given that BJcuL does not promote NF- κ B activation, we considered some interference of BJcuL in the US. In order to investigate this possibility we used an antibody able to detected ubiquitin and poly-ubiquitinated chains, which revealed the presence of poly-ubiquitinated proteins in the lysates of both cell lineages stimulated by BJcuL when compared to non-stimulated cells (Fig. 3a). The accumulation of poly-ubiquitinated chains follows the same pattern showed by c-FLIP and

survivin accumulation (Fig. 2), however, these proteins do not show the characteristic smears observed when the proteasome is inhibited. Considering that, we investigated whether BJcuL could be involved in the activity of deubiquitinases. As HCT116 cells seem to react faster to BJcuL-induced protein accumulation, they were stimulated with the DUB inhibitor WP1130 at 10 μ M for 30 minutes, followed by BJcuL at 2.5 μ g/mL for 60 minutes. As result we observed decreased levels of survivin, but not of I κ B α , indicating that BJcuL stimulation is not inhibiting the proteasome, but can induce protein accumulation related to DUB's activity (Fig. 3b).

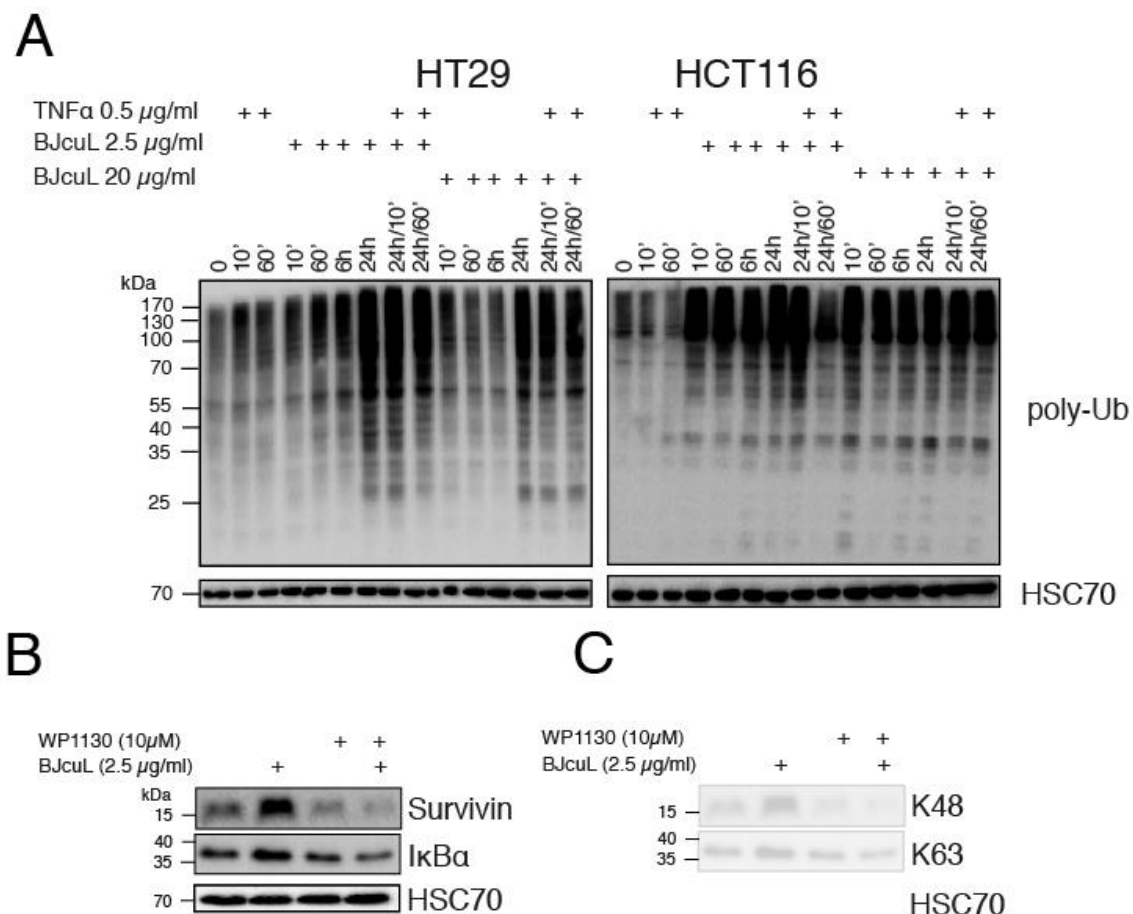


Fig 3 BJcuL effects on US. (a) Cells were stimulated with BJcuL for 10 minutes to 24h at concentrations from 1 μ g/mL to 20 μ g/mL, in combination or not with TNF- α at 500 ng/mL for 10 and 60 minutes. Ubiquitin and poly-ubiquitinated chains are accumulated after 10 minutes of BJcuL stimulation in HCT116 cells (left panel) and after 60 minutes in HT29 cells (right panel). (b) HCT116 cells were stimulated with WP1130 10 μ M for 30 minutes, followed or not by BJcuL at 2.5 μ g/mL for 60 minutes. The levels of survivin decreased when the cells were previously stimulated with the inhibitor of DUBs WP1130, while I κ B α remains similar to the control.

Discussion

Since it had been purified by Carvalho *et al.* (1998) the cytotoxic (Carvalho, 1998; Pereira-Bittencourt, Carvalho *et al.*, 1999; De Carvalho, Schmitmeier *et al.*, 2001; Nolte, De Castro Damasio *et*

al., 2012) and immunomodulatory (Elifio-Esposito, Tomazeli *et al.*, 2011; Dias-Netipanyi, Boldrini-Leite *et al.*, 2016) effects of BJcuL have been related. However, further investigations to elucidate the signaling pathways involved in such effects had never been performed.

Recently, BJcuL was described as an apoptosis inducer in the CRC cells HT29 based on cytotoxic features as decrease of cell metabolism quantified by MTT, loss of adhesion, increase in immunocytochemistry labelling of FADD, caspase-8, TRAIL and Bax, as well as cytochrome c release (Damasio, Nolte *et al.*, 2014). Based on this, it was hypothesized that BJcuL could exert some effect on TRAIL-induced apoptosis. In the present work, using annexin-V/7AAD labeling (Fig. 1b) and clonogenic assays (Fig. 1d), we demonstrate that BJcuL, in fact, does not induce apoptosis on the CRC cell lineages here tested; neither sensitizes these cells to TRAIL-induced apoptosis what is supported by the absence of caspases 8, 3 and lamin A/C cleavage in both cell lines subjected to BJcuL stimulation (Fig. 1e). Once apoptosis is not concluded as expected, we investigate which proteins could take part in such effect. We found that BJcuL induces increased levels of the anti-apoptotic proteins c-FLIP and survivin in both CRC cell lines analyzed (Fig. 2).

As the increased level of both anti-apoptotic proteins was observed from 10 minutes after BJcuL stimulation, at 2.5 $\mu\text{g/mL}$ and 20 $\mu\text{g/mL}$, we considered whether it was due to transcriptional activation of these proteins expression or to post-translational modifications. In order to access this, initially we investigated NF- κB pathway, whose activation culminates in c-FLIP transcription (Micheau, Lens *et al.*, 2001) and is also involved in survivin upregulation (Lin, Guan *et al.*, 2010). NF κB is allocated in the cytoplasm in association with I $\kappa\text{B}\alpha$. After TNF- α stimulation, I $\kappa\text{B}\alpha$ is phosphorylated, ubiquitinated and directed to proteasomal degradation, enabling NF κB translocation to the nucleus where it stimulates protein transcription (Karin e Lin, 2002). Our results show that BJcuL does not induce NF- κB pathway activation once I $\kappa\text{B}\alpha$ is not phosphorylated neither degraded (Fig. 2), what indicates that BJcuL induces c-FLIP and survivin upregulation in another way.

Since c-FLIP and survivin turnover is regulated by US through a balance between kinases, E3-ligases and DUBs (Chang, Kamata *et al.*, 2006; Kaunisto, Kochin *et al.*, 2009; Shi, Tran *et al.*, 2009; Liu, Gao *et al.*, 2014; Liu, Lear *et al.*, 2015; Karpel-Massler, Banu *et al.*, 2016), we hypothesize that BJcuL could interfere in this system, leading to protein accumulation, probably due to proteasome inhibition. This hypothesis was based on the accumulation of poly-ubiquitin chains detected in cell lysates from both cell lines stimulated with BJcuL (Fig. 3a), which is consistent with the accumulation of c-FLIP and survivin (Fig. 2).

Protein accumulation can occur directly by proteasomal inhibition as by dysfunctional E3 ligases or DUBs (Voorhees e Orłowski, 2006; D'arcy, Wang *et al.*, 2015). Nonetheless, if the accumulation of c-FLIP and survivin here observed was result from proteasomal inhibition, it would be expected to see the typical ubiquitin smears in the blots for these proteins (Fig. 2). Besides that, proteasomal inhibition induces cell death in tumor cells, even in those which are resistant to TRAIL-induced apoptosis, as demonstrated by different groups (Naumann, Kappler *et al.*, 2011; Gillissen, Richter *et al.*, 2013; Yuan, Chapman *et al.*, 2013). As these features of direct proteasomal inhibition were not detected for c-FLIP neither survivin in this work (Fig. 2), and BJcuL stimulation does not induce apoptosis in CRC cells (Fig. 1b, d and e) we thought whether BJcuL promotes some effect on DUB's activity. DUBs are enzymes

which remove poly-ubiquitinated chains from target proteins, leading to subsequent inhibition of proteasomal degradation, resulting in proteins accumulated without the typical smears observed in poly-ubiquitinated proteins (Nijman, Luna-Vargas *et al.*, 2005). Furthermore, DUBs activity has been related to acquisition of resistance to apoptosis and malignancy in several tumor cell lines (Schwickart, Huang *et al.*, 2010; Ramakrishna, Suresh *et al.*, 2011; D'arcy, Wang *et al.*, 2015; Ding, Bao *et al.*, 2015; Hu, Yang *et al.*, 2015). Aligned with this, we observed downregulation of survivin in HCT116 cells stimulated previously with the inhibitor of DUBs WP1130, followed by BJcuL (Fig. 3b). We also observed a less intense degradation of I κ B α , comparing to that observed for survivin, supporting that BJcuL does not stimulate NF- κ B pathway. In addition to indicating that DUBs are involved in BJcuL-induced accumulation of survivin, this result also show us that BJcuL is not inhibiting the proteasome, once survivin level decreased after inhibition of DUBs.

Other groups also have described the downregulation of survivin as an answer to DUB inhibition. The survivin upregulation is suppressed when the DUB USP22 is silenced in hepatocellular carcinoma cells (Tang, Liang *et al.*, 2015) and Karpel-Massler and colleagues (2016) found that WP1130 suppresses the rise in the levels of survivin in glioblastoma cells by down-regulation of the DUB USP9x, restoring the sensitivity to apoptosis. USP9x also has been related to deubiquitylation of Itch (Mouchantaf, Azakir *et al.*, 2006), an E3 ligase responsible for the ubiquitination of c-FLIP (Chang, Kamata *et al.*, 2006). These informations come to support further studies in order to check if USP9x activity could be related to BJcuL-induced c-FLIP and survivin upregulation presented here.

Despite the results obtained after WP1130 stimulation support the hypothesis that BJcuL can interfere in DUBs activity, the presence of general poly-ubiquitinated proteins in the lysates from both CRC cell lines stimulated by BJcuL could run against this idea. Nonetheless, some aspects should be considered concerning this point. First, some enzymes, as A20, can act both as E3-ligase and DUB (Wertz, O'rourke *et al.*, 2004), leading to accumulation of poly-ubiquitinated proteins at the same time as other proteins are deubiquitinated and rescued from proteasomal degradation. Second, the DUBs are highly specific proteases. They can present specificity for the ubiquitin moiety itself, targeting different kinds of ubiquitination, as mono-ubiquitination, K63-linked poly-ubiquitinated chains (involved in cell signaling and protein stabilization) or K48-linked poly-ubiquitinated chains (which target the proteins for proteasomal degradation) (Haglund e Dikic, 2005); or can be specific to the target protein itself, those where the poly-ubiquitinated chains are bound to (Nijman, Luna-Vargas *et al.*, 2005). Therefore, it is possible that BJcuL regulates some specific DUB, able to act specifically on survivin or K48-linked chains, once WP1130 stimulation resulted in survivin degradation, but not I κ B α degradation (Fig. 3b). In this way, other proteins can be kept in their poly-ubiquitinated state, being detected by the ubiquitin-specific antibody.

The ability to modulate the proteins levels, impacting on several pathways and cell fate, makes the US one of the more important post-translational modifications studied nowadays and is considered a promising source of research for new therapeutic targets in cancer and neurodegenerative diseases (Edelmann, Nicholson *et al.*, 2011; Liu, Shaik *et al.*, 2015). Concerning cancer treatment, the unbalanced expression of anti- and pro-apoptotic proteins is the main cause of chemoresistance and poor clinical outcome (Strasser, Cory *et al.*, 2011; Pandey, Prasad *et al.*, 2016). The role of US in regulating apoptosis

makes the inhibitors of E3-ligases and DUBs interesting therapeutic agents, once they are able to adjust protein expression, improving the effects of chemotherapies already used in cancer treatment (D'arcy, Wang *et al.*, 2015; Liu, Shaik *et al.*, 2015). In this context, BJcuL comes to be a promising tool to strengthen the investigations in this field, once it can help in the identification of DUBs related to cell death pathways.

The present work attributes a new biological effect to CTL obtained from snake venoms. Together, the results shown here indicate that BJcuL can stabilize different proteins as FADD, c-FLIP and survivin at the post-translational level (Fig. 1a and 2), through interference in US. The abrogation of this effect on I κ B α and survivin expression observed after stimulation with the DUB inhibitor WP1130 (Fig. 3b) shows that BJcuL raises the protein level through activation of DUBs and that this lectin is not inhibiting the proteasomal degradation.

The identification of BJcuL as a compound derived from snake venom able to play effects on US, involving DUBs activity, opens new perspectives for the search and development of new drugs derived from animal venoms and toxins as well as for the discovery of new molecular markers to improve cancer treatment. Furthermore, BJcuL appears as a potential tool to shed light on the high level of complexity showed by US.

References

- Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy *Oncogene* 26:1324-1337 doi:10.1038/sj.onc.1210220
- Ashkenazi A et al. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand *The Journal of clinical investigation* 104:155-162 doi:10.1172/JCI6926
- Athanasoula K, Gogas H, Polonifi K, Vaiopoulos AG, Polyzos A, Mantzourani M (2014) Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials *Cancer letters* 347:175-182 doi:10.1016/j.canlet.2014.02.014
- Carvalho DDM, S.; Oliveira, B.; Novello, J. C. (1998) Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu* *Biochem Mol Biol Int* 44
- Chang L et al. (2006) The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover *Cell* 124:601-613 doi:10.1016/j.cell.2006.01.021
- Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W (2016) Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies *Journal of Cancer* 7:314-323 doi:10.7150/jca.13332
- D'Arcy P, Wang X, Linder S (2015) Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy *Pharmacology & therapeutics* 147:32-54 doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.002
- Damasio C et al. (2014) The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line *Toxicology : official journal of the International Society on Toxinology* 90:299-307 doi:10.1016/j.toxicol.2014.08.062
- de Carvalho DD, Schmitmeier S, Novello JC, Markland FS (2001) Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells *Toxicology : official journal of the International Society on Toxinology* 39:1471-1476
- Dias-Netipanyj MF, Boldrini-Leite LM, Trindade ES, Moreno-Amaral AN, Elifio-Esposito S (2016) BJcuL, a snake-venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro *Toxicology in vitro* doi:10.1016/j.tiv.2016.02.023
- Dias-Netipanyj MF, Boldrini-Leite LM, Trindade ES, Moreno-Amaral AN, Elifio-Esposito S (2016) BjcUL, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 33:118-124 doi:10.1016/j.tiv.2016.02.023
- Ding F et al. (2015) USP22 promotes NSCLC tumorigenesis via MDMX up-regulation and subsequent p53 inhibition *International journal of molecular sciences* 16:307-320 doi:10.3390/ijms16010307

- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004a) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis *The Journal of clinical investigation* 114:1117-1127 doi:10.1172/JCI22222
- Dohi T et al. (2004b) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis *The Journal of biological chemistry* 279:34087-34090 doi:10.1074/jbc.C400236200
- Edelmann MJ, Nicholson B, Kessler BM (2011) Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases *Expert reviews in molecular medicine* 13:e35 doi:10.1017/S1462399411002031
- Elifio-Esposito S et al. (2007) A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 13:782-799
- Elifio-Esposito S et al. (2011) Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom *BMC immunology* 12:10 doi:10.1186/1471-2172-12-10
- Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy *Oncogene* 25:4798-4811 doi:10.1038/sj.onc.1209608
- Gillissen B et al. (2013) Targeted therapy of the XIAP/proteasome pathway overcomes TRAIL-resistance in carcinoma by switching apoptosis signaling to a Bax/Bak-independent 'type I' mode *Cell death & disease* 4:e643 doi:10.1038/cddis.2013.67
- Haglund K, Dikic I (2005) Ubiquitylation and cell signaling *The EMBO journal* 24:3353-3359 doi:10.1038/sj.emboj.7600808
- Hu J et al. (2015) USP22 promotes tumor progression and induces epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma *Lung cancer* 88:239-245 doi:10.1016/j.lungcan.2015.02.019
- Irmeler M et al. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP *Nature* 388:190-195 doi:10.1038/40657
- Kapuria V, Peterson LF, Fang D, Bornmann WG, Talpaz M, Donato NJ (2010) Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis *Cancer research* 70:9265-9276 doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1530
- Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death *Nature immunology* 3:221-227 doi:10.1038/ni0302-221
- Karpel-Massler G et al. (2016) Inhibition of deubiquitinases primes glioblastoma cells to apoptosis in vitro and in vivo *Oncotarget* 7:12791-12805 doi:10.18632/oncotarget.7302
- Kaunisto A, Kochin V, Asaoka T, Mikhailov A, Poukkula M, Meinander A, Eriksson JE (2009) PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability *Cell death and differentiation* 16:1215-1226 doi:10.1038/cdd.2009.35
- Lin J et al. (2010) Inhibitor of differentiation 1 contributes to head and neck squamous cell carcinoma survival via the NF-kappaB/survivin and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:77-87 doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2362
- Liu CC, Yang H, Zhang LL, Zhang Q, Chen B, Wang Y (2014a) Biotoxins for cancer therapy *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15:4753-4758
- Liu J, Shaik S, Dai X, Wu Q, Zhou X, Wang Z, Wei W (2015a) Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment *Biochimica et biophysica acta* 1855:50-60 doi:10.1016/j.bbcan.2014.11.005
- Liu Y et al. (2015b) The Proapoptotic F-box Protein Fbx17 Regulates Mitochondrial Function by Mediating the Ubiquitylation and Proteasomal Degradation of Survivin *The Journal of biological chemistry* 290:11843-11852 doi:10.1074/jbc.M114.629931
- Liu YB et al. (2014b) Ubiquitin-proteasomal degradation of antiapoptotic survivin facilitates induction of apoptosis in prostate cancer cells by pristimerin *International journal of oncology* 45:1735-1741 doi:10.3892/ijo.2014.2561
- McLornan DP et al. (2010) Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:3442-3451 doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0052
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP *Molecular and cellular biology* 21:5299-5305 doi:10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001
- Micheau O, Shirley S, Dufour F (2013) Death receptors as targets in cancer *British journal of pharmacology* 169:1723-1744 doi:10.1111/bph.12238

- Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A (2006) The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X *The Journal of biological chemistry* 281:38738-38747 doi:10.1074/jbc.M605959200
- Naumann I, Kappler R, von Schweinitz D, Debatin KM, Fulda S (2011) Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:3204-3218 doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2451
- Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes *Cell* 123:773-786 doi:10.1016/j.cell.2005.11.007
- Nolte S et al. (2012) BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly *Toxicol : official journal of the International Society on Toxicology* 59:81-85 doi:10.1016/j.toxicol.2011.10.012
- Ogawa T, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ohno M (2005) Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom *Toxicol : official journal of the International Society on Toxicology* 45:1-14 doi:10.1016/j.toxicol.2004.07.028
- Opferman JT (2015) Attacking cancer's Achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members *The FEBS journal* doi:10.1111/febs.13472
- Pandey MK et al. (2016) Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death *Pharmaceuticals* 9 doi:10.3390/ph9010011
- Pereira-Bittencourt M, Carvalho DD, Gagliardi AR, Collins DC (1999) The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation *Anticancer research* 19:4023-4025
- Ramakrishna S, Suresh B, Baek KH (2011) The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68:15-26 doi:10.1007/s00018-010-0504-6
- Sartim MA, Sampaio SV (2015) Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 21:35 doi:10.1186/s40409-015-0038-3
- Schwickart M et al. (2010) Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival *Nature* 463:103-107 doi:10.1038/nature08646
- Shi B, Tran T, Sobkoviak R, Pope RM (2009) Activation-induced degradation of FLIP(L) is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in macrophages *The Journal of biological chemistry* 284:14513-14523 doi:10.1074/jbc.M807918200
- Strasser A, Cory S, Adams JM (2011) Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases *The EMBO journal* 30:3667-3683 doi:10.1038/emboj.2011.307
- Sumantran VN (2011) Cellular chemosensitivity assays: an overview *Methods in molecular biology* 731:219-236 doi:10.1007/978-1-61779-080-5_19
- Tang B et al. (2015) Expression of USP22 and Survivin is an indicator of malignant behavior in hepatocellular carcinoma *International journal of oncology* 47:2208-2216 doi:10.3892/ijo.2015.3214
- Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG (2007) Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:5070-5075 doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2547
- Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S (2004) Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 7:345-358 doi:10.1016/j.drug.2004.11.002
- Voorhees PM, Orłowski RZ (2006) The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy *Annual review of pharmacology and toxicology* 46:189-213 doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141300
- Wertz IE et al. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling *Nature* 430:694-699 doi:10.1038/nature02794

- Wilkie-Grantham RP, Matsuzawa S, Reed JC (2013) Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein *The Journal of biological chemistry* 288:12777-12790 doi:10.1074/jbc.M112.431320
- Yau T, Dan X, Ng CC, Ng TB (2015) Lectins with potential for anti-cancer therapy *Molecules* 20:3791-3810 doi:10.3390/molecules20033791
- Yuan BZ, Chapman J, Ding M, Wang J, Jiang B, Rojanasakul Y, Reynolds SH (2013) TRAIL and proteasome inhibitors combination induces a robust apoptosis in human malignant pleural mesothelioma cells through Mcl-1 and Akt protein cleavages *BMC cancer* 13:140 doi:10.1186/1471-2407-13-140
- Zeestraten EC, Benard A, Reimers MS, Schouten PC, Liefers GJ, van de Velde CJ, Kuppen PJ (2013) The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry *Biomarkers in cancer* 5:13-29 doi:10.4137/BIC.S11475

6 DISCUSSÃO

Desde que BJcuL foi purificada pela primeira vez por Carvalho e cols. (1998), seus efeitos citotóxicos (Pereira-Bittencourt, Carvalho *et al.*, 1999; De Carvalho, Schmitmeier *et al.*, 2001; Nolte, De Castro Damasio *et al.*, 2012) e imunomodulatórios (Elifio-Esposito, Tomazeli *et al.*, 2011; Dias-Netipanyj, Boldrini-Leite *et al.*, 2016) têm sido relatados. Entretanto, a exemplo do que ocorre com muitos outros compostos derivados de venenos e toxinas animais, investigações mais aprofundadas para elucidar as vias de sinalização envolvidas em tais efeitos nunca foram realizadas.

Recentemente, BJcuL foi descrita como indutor de apoptose em células de CCR da linhagem HT29, baseando-se em sinais de citotoxicidade, como diminuição do metabolismo celular quantificado pelo método MTT, perda de adesão, aumento dos níveis das proteínas FADD, caspase-8 e Bax, além de liberação de citocromo c pela mitocôndria (Damasio, Nolte *et al.*, 2014). Estes resultados levaram à hipótese de que BJcuL exerceria algum efeito sobre a apoptose induzida por TRAIL. No presente trabalho, utilizando marcação por Anexina-V/7AAD (Fig. 1b) e ensaio clonogênico (Fig. 1d), nós demonstramos que BJcuL não afeta a viabilidade de células de CCR de ambas linhagens testadas, nem sensibiliza tais células à apoptose induzida por TRAIL, o que é suportado pela ausência de clivagem das caspases 8 e 3 e de Lamina A/C (Fig. 1e). Uma vez detectado que a apoptose não é finalizada como o esperado, apesar do aumento de FADD, Caspase-8 e da liberação de citocromo c pela mitocôndria, nós investigamos quais proteínas poderiam participar do estabelecimento dos efeitos anteriormente descritos (Damasio, Nolte *et al.*, 2014). Como resultado, descobrimos que BJcuL induz aumento dos níveis de proteínas anti-apoptóticas como c-FLIP, Bcl-2 e survivina em ambas linhagens celulares de CCR aqui estudadas (Fig. 2a e Fig. Suplementar IVa).

A liberação de citocromo c pela membrana mitocondrial externa após a indução da permeabilidade da MME pode ser considerada um ponto de não-retorno na apoptose. Entretanto, juntamente com o citocromo c, também é liberada a proteína anti-apoptótica survivina (Dohi, Beltrami *et al.*, 2004). Uma vez no citoplasma, survivina liga-se a XIAP, criando um complexo capaz de

ligar-se às caspases e inibir a apoptose mesmo após a permeabilização da MME, o que está relacionado à aquisição de resistência à apoptose, tumorigênese e mau prognóstico clínico (Deveraux, Roy *et al.*, 1998; Dohi, Okada *et al.*, 2004; Ouhtit, Matrougui *et al.*, 2007). O complexo anti-apoptótico survivina-XIAP é desestabilizado através da fosforilação de survivina no resíduo de serina 20 (Ser20) pela proteína quinase PKA, levando à ativação de caspase-9 e dando continuidade ao processo de apoptose (Dohi, Xia *et al.*, 2007). Neste trabalho, além do aumento da expressão de survivina induzido por BJcuL (Fig. 2), nós também observamos a falta de substrato fosforilado por PKA em resíduos de serina e treonina no local previsto para o peso molecular de survivina (Fig. suplementar V). Este resultado indica que o complexo anti-apoptótico survivina-XIAP está íntegro e funcional. Estes resultados estão alinhados com outra publicação que descreve BJcuL como uma ativadora de neutrófilos, capaz de causar atraso na apoptose espontânea destas células (Elifio-Esposito, Tomazeli *et al.*, 2011), fato que pode ser relacionado à indução de sobrevivência exercida pela survivina sobre neutrófilos ativados (Athanasoula, Gogas *et al.*, 2014). Juntos, estes dados suportam nossos achados de que BJcuL é capaz de induzir a superexpressão de survivina em células de CCR, interferindo no destino celular.

Como o aumento do nível de expressão das três proteínas anti-apoptóticas foi observado a partir de 10 minutos após a estimulação com BJcuL, tanto a 2.5 µg/mL quanto 20 µg/mL, nós consideramos se este aumento se deve à ativação transcricional destas proteínas ou a modificações pós-traducionais. Para analisar estas possibilidades, inicialmente investigamos a via do NFκB, cuja ativação culmina com a transcrição de c-FLIP (Micheau, Lens *et al.*, 2001) e também está envolvida na regulação da expressão de survivina (Lin, Guan *et al.*, 2010). NFκB está localizado no citoplasma, associado ao IκBα. Após estimulação por TNF-α, IκBα é fosforilado, ubiquitinado e direcionado à degradação proteossômica, permitindo a translocação de NFκB para o núcleo, onde estimula a transcrição de proteínas pró-inflamatórias e de sobrevivência celular (Karin e Lin, 2002). Nossos resultados mostram que BJcuL não induz ativação de NFκB, uma vez que IκBα não é degradado (Fig. 2), o que indica que BJcuL induz superexpressão de c-FLIP e survivina através de alguma outra via.

Considerando que tanto o *turnover* de c-FLIP, Bcl-2 e survivina é controlado pelo UPS através de um equilíbrio entre a ação de E3 ligases e DUBs (Chang, Kamata *et al.*, 2006; Chiu, Zhao *et al.*, 2009; Kaunisto, Kochin *et al.*, 2009; Shi, Tran *et al.*, 2009), nós levantamos a hipótese de que BJcuL interfere neste sistema, levando ao acúmulo de proteínas devido à inibição da degradação proteassômica. Esta hipótese é fundamentada pelo acúmulo de cadeias poliubiquitinadas (Fig. 3a) detectado nos lisados celulares de ambas as linhagens estimuladas com BJcuL, que é consistente com a superexpressão de c-FLIP, Bcl-2 e survivina (Fig. 2 e Fig. suplementar IVa).

A inibição da degradação proteassômica pode ocorrer diretamente no proteassomo, ou pode ocorrer por disfunção de E3 ligases ou DUBs (Sun, 2003; Voorhees e Orlowski, 2006; D'arcy, Wang *et al.*, 2015). No entanto, caso o efeito de BJcuL fosse resultado de inibição direta do proteassomo, seria esperado observar o típico arrasto nas proteínas acumuladas (Fig. 3a), por estarem poliubiquitinadas. Além disso, a inibição do proteassomo induz morte celular em células tumorais, inclusive naquelas resistentes ao TRAIL, como demonstrado por diferentes grupos (Naumann, Kappler *et al.*, 2011; Gillissen, Richter *et al.*, 2013; Yuan, Chapman *et al.*, 2013). Como estas características da inibição direta do proteassomo não foram observadas em c-FLIP nem survivina (Fig. 2), e não foi observada apoptose em resposta à BJcuL (Fig. 1b e e), nós avaliamos a possibilidade de BJcuL induzir ativação de DUBs. DUBs são proteases que removem as cadeias poliubiquitinadas de proteínas alvo, levando à inibição indireta da degradação proteassômica, o que resulta em acúmulo de proteínas, sem que estas apresentem o arrasto esperado no *immunoblotting* (Nijman, Luna-Vargas *et al.*, 2005). Além disso, a superexpressão de DUBs tem sido relacionada à aquisição de resistência à apoptose e malignidade em várias linhagens de células tumorais (Schwickart, Huang *et al.*, 2010; Ramakrishna, Suresh *et al.*, 2011; D'arcy, Wang *et al.*, 2015; Ding, Bao *et al.*, 2015; Hu, Yang *et al.*, 2015).

Nossos resultados obtidos pela estimulação de células HCT116 com o inibidor de DUBs WP1130 estão alinhados com tais características da ação destas enzimas. Nestes resultados, podemos observar a diminuição da expressão de survivina quando as células HCT116 são estimuladas inicialmente com o inibidor de DUBs WP1130 a 10 μ M por 30 minutos,

seguindo-se com a estimulação com BJcuL a 2.5 µg/mL por 60 minutos (Fig. 3b). Também foi observada uma diminuição menos intensa de IκBα em resposta ao WP1130, combinado ou não com BJcuL, quando comparada à diminuição da expressão de survivina, o que suporta o fato de BJcuL não promover ativação da via de NF-κB. Além de indicar que DUBs estão envolvidas na regulação de survivina em resposta à BJcuL, o fato da proteína ter sido degradada indica que BJcuL não induz a inibição do proteassoma.

A diminuição da expressão de survivina em resposta à inibição de DUBs tem sido descritas por outros grupos de pesquisa. A supressão da superexpressão de survivina ocorre quando a DUB USP22 é silenciada em células de carcinoma hepatocelular (Tang, Liang *et al.*, 2015). Karpel-Massler e colaboradores (2016) mostraram que WP1130 suprime a superexpressão de survivina em células de glioblastoma pela inibição da DUB USP9x, restaurando a sensibilidade à apoptose nestas células. USP9x também tem sido relacionada à deubiquitinação de Itch (Mouchantaf, Azakir *et al.*, 2006), uma E3 ligase que participa da ubiquitinação de c-FLIP (Chang, Kamata *et al.*, 2006). Este conjunto de informações, somado ao fato de USP9x ser a única DUB inibida por WP1130 que tem ação descrita sobre survivina (Kapuria, Peterson *et al.*, 2010), vem suportar as investigações futuras sobre a possibilidade da atividade de USP9x estar relacionada aos efeitos de BJcuL sobre os níveis de c-FLIP e survivina aqui demonstrados.

Embora Bcl-2 tenha sido a primeira proteína anti-apoptótica da família Bcl-2 a ser descrita (Strasser, Harris *et al.*, 1991), pouco se sabe sobre a influência do UPS sobre sua regulação. O controle do UPS sobre as proteínas da família Bcl-2 é melhor compreendido na regulação da proteína anti-apoptótica Mcl-1, a qual possui sítios de fosforilação e ubiquitinação bem descritos, assim como as E3 ligases e DUBs que participam do processo, inclusive USP9x (Domina, Vrana *et al.*, 2004; Zhong, Gao *et al.*, 2005; Inuzuka, Shaik *et al.*, 2011; Rooswinkel, Van De Kooij *et al.*, 2014).

A respeito da regulação do UPS sobre Bcl-2 especificamente, sabe-se apenas que a fosforilação dos resíduos de serina 87 (Ser87) e treonina 74 (Thr74) pela proteína quinase ERK protege Bcl-2 da ubiquitinação e degradação proteassômica, o que é revertido após estimulação por TNF-α (Dimmeler, Breitschopf *et al.*, 1999; Breitschopf, Haendeler *et al.*, 2000). Neste

trabalho, nós observamos níveis aumentados de pBcl-2 Ser87 após estimulação com BJcuL, mesmo em combinação com TNF- α (Fig. suplementar IVa). Esta observação, combinada com o aumento dos níveis de expressão de ERK nas células HCT116 estimuladas com BJcuL a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. IVb), sugere que BJcuL poderia proteger Bcl-2 da poliubiquitinação e degradação proteassômica através da fosforilação dos sítios específicos por ERK já citados. No entanto, o fato de termos avaliado apenas a expressão de ERK e não de fosfo-ERK, não prova que BJcuL esteja interferindo na atividade desta quinase e o acúmulo de pBcl-2 e ERK podem ser apenas mais uma evidência do efeito de BJcuL sobre o funcionamento do UPS. Até o momento, não se conhece qualquer relação da atividade de DUBs com o mecanismo de controle dos níveis de Bcl-2, o que expande as possibilidades de se aplicar BJcuL como uma ferramenta de investigação do *turnover* de proteínas envolvidas com as vias de morte celular.

Apesar dos resultados obtidos após a estimulação das células de CCR com WP1130 suportarem a hipótese de que BJcuL interfere na atividade de DUBs, a presença generalizada de proteínas poli-ubiquitinadas nos lisados de ambas as células estimuladas com esta lectina poderia depor contra esta ideia. No entanto, alguns pontos devem ser considerados a respeito dessa observação. Primeiro, algumas enzimas, como A20, podem agir simultaneamente como E3 ligases ou DUBs (Wertz, O'rourke *et al.*, 2004), levando ao acúmulo de proteínas poli-ubiquitinadas ao mesmo tempo em que outras proteínas são deubiquitinadas e resgatadas da degradação proteassômica. Segundo, DUBs são proteínas altamente específicas. Elas podem apresentar especificidade pelo domínio de ubiquitina, tendo como alvo proteínas mono-ubiquitinadas ou cadeias poliubiquitinadas do tipo K63 ou K48 (Haglund e Dikic, 2005); ou podem apresentar especificidade pela proteína alvo propriamente dita (Nijman, Luna-Vargas *et al.*, 2005). Logo, é possível que BJcuL regule alguma DUB capaz de agir especificamente sobre survivina ou cadeias do tipo K48-ligadas, uma vez que a estimulação por WP1130 induziu degradação de survivina, mas não de I κ B α (Fig. 3b). Desta maneira, outras proteínas podem permanecer no seu estado poli-ubiquitinado, sendo detectadas pelo anticorpo específico para ubiquitinas.

A habilidade em modular os níveis de expressão de proteínas, impactando em diversas vias de sinalização e no destino celular, faz do UPS uma das mais importantes modificações pós-traducionais estudadas na atualidade, sendo considerada uma promissora fonte de pesquisa para a descoberta de novos alvos terapêuticos no tratamento do câncer e doenças neurodegenerativas (Edelmann, Nicholson *et al.*, 2011; Vucic, Dixit *et al.*, 2011; Liu, Shaik *et al.*, 2015). Considerando o tratamento do câncer, o desequilíbrio na expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas é a principal causa de aquisição de quimioresistência e mau prognóstico clínico (Strasser, Cory *et al.*, 2011; Pandey, Prasad *et al.*, 2016). O papel do UPS na regulação da apoptose torna os inibidores de E3 ligases e de DUBs interessantes agentes terapêuticos, uma vez que eles são capazes de ajustar a expressão proteica, melhorando os efeitos de quimioterápicos já utilizados na clínica (D'arcy, Wang *et al.*, 2015; Liu, Shaik *et al.*, 2015). Neste contexto, BJcuL vem a ser uma promissora ferramenta para fortalecer as investigações neste campo de pesquisa, auxiliando na identificação de DUBs relacionadas ao controle das cascatas de sinalização de morte celular.

O presente trabalho atribui um novo efeito biológico a CTLs obtidas de veneno de serpentes. Juntos, os resultados mostrados aqui indicam que BJcuL pode estabilizar a expressão de diferentes proteínas relacionadas ao destino celular, como FADD, c-FLIP, Bcl-2, ERK e survivina (Fig. 1a, 2 e suplementar IVa e b), através de interferência no UPS. A anulação deste efeito sobre a expressão de survivina após a estimulação com o inibidor de DUBs WP1130 (Fig. 3b) mostra que BJcuL aumenta a expressão de proteínas ao ativar a ação de DUBs e que esta lectina não inibe a degradação proteassômica.

A identificação de BJcuL como um composto derivado de veneno de serpente, capaz de exercer efeitos sobre o UPS, envolvendo atividade de DUBs, abre novas perspectivas para a busca e desenvolvimento de novas drogas derivadas de venenos e toxinas animais, bem como para a descoberta de novos marcadores moleculares envolvidos no estabelecimento de diferentes doenças. Sendo assim, BJcuL desponta como uma ferramenta em potencial para clarear o alto nível de complexidade inerente ao UPS.

7 CONCLUSÕES

BJcuL não induz apoptose em células de câncer colorretal das linhagens HT29 e HCT116, nem mesmo interfere na apoptose induzida por TRAIL, o que é reforçado pela ausência de clivagem de caspases e de lamina A/C nas análises por *immunoblotting*.

BJcuL estabiliza os níveis das proteínas anti-apoptóticas c-FLIP, Bcl-2 e survivina, além de inibir a degradação de I κ B α através de interferência no UPS, com a participação de deubiquitinases.

BJcuL é uma ferramenta em potencial para a investigação da regulação da apoptose pelo UPS.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. et al. Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 4, p. 751-61, Apr 2008. ISSN 1350-9047 (Print)
1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219321> >.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324-37, Feb 26 2007. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322918> >.
- ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. **EMBO J**, v. 20, n. 23, p. 6627-36, Dec 3 2001. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726499> >.
- ALTIERI, D. C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 1, p. 61-70, Jan 2008. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-1768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075512> >.
- ALWAN, H. A.; VAN LEEUWEN, J. E. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 3, p. 1658-69, Jan 19 2007. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121848> >.
- ARORA, V. et al. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. **J Biol Chem**, v. 282, n. 36, p. 26202-9, Sep 7 2007. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613533> >.
- ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 12, p. 1001-12, Dec 2008. ISSN 1474-1784 (Electronic)
1474-1784 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18989337> >.
- ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 19, n. 3-4, p. 325-31, Jun-Aug 2008. ISSN 1359-6101 (Print)
1359-6101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495520> >.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 255-260, 4/1/ 1999. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067499800349> >.
- ASHKENAZI, A. et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. **J Clin Invest**, v. 104, n. 2, p. 155-62, Jul 1999. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411544> >.
- ATHANASOULA, K. et al. Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. **Cancer Lett**, v. 347, n. 2, p. 175-82, Jun 1 2014. ISSN 1872-7980 (Electronic)
1872-7980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560928> >.
- BEG, A. A. et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 167-70, Jul 13 1995. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603567> >.
- BERNARDI, S.; SECCHIERO, P.; ZAULI, G. State of art and recent developments of anti-cancer strategies based on TRAIL. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 207-17, May 1 2012. ISSN 2212-3970 (Electronic)
2212-3970 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114983> >.

- BERTRAND, M. J. et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. **Mol Cell**, v. 30, n. 6, p. 689-700, Jun 20 2008. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570872> >.
- BREITSCHOPF, K. et al. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 5, p. 1886-96, Mar 2000. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669763> >.
- BROEMER, M.; MEIER, P. Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 3, p. 130-40, Mar 2009. ISSN 1879-3088 (Electronic) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217783> >.
- BURNS, T. F.; EL-DEIRY, W. S. Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. **J Biol Chem**, v. 276, n. 41, p. 37879-86, Oct 12 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486001> >.
- CARVALHO, D. D. et al. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 44, n. 5, 1998.
- CARVALHO, D. D. M., S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 44, n. 5, 1998.
- CEBALLOS-CANCINO, G. et al. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. **Oncogene**, v. 26, n. 54, p. 7569-75, Nov 29 2007. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546047> >.
- CHAI, J. et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. **Nature**, v. 406, n. 6798, p. 855-62, Aug 24 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972280> >.
- CHANG, L. et al. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 601-13, Feb 10 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469705> >.
- CHEN, X. et al. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **J Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314-23, 2016. ISSN 1837-9664 (Electronic) 1837-9664 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918045> >.
- CHIPUK, J. E. et al. The BCL-2 family reunion. **Mol Cell**, v. 37, n. 3, p. 299-310, Feb 12 2010. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159550> >.
- CHIU, Y. H.; ZHAO, M.; CHEN, Z. J. Ubiquitin in NF-kappaB signaling. **Chem Rev**, v. 109, n. 4, p. 1549-60, Apr 2009. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281271> >.
- COHEN, P.; TCHERPAKOV, M. Will the ubiquitin system furnish as many drug targets as protein kinases? **Cell**, v. 143, n. 5, p. 686-93, Nov 24 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111230> >.
- CUMMINS, J. M. et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 3006-8, May 1 2004. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126334> >.

D'ARCY, P.; LINDER, S. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 11, p. 1729-38, Nov 2012. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819849> >.

D'ARCY, P.; WANG, X.; LINDER, S. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. **Pharmacol Ther**, v. 147, p. 32-54, Mar 2015. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444757> >.

DAMASIO, C. et al. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicol**, v. 90, p. 299-307, Nov 2014. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194746> >.

DE CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of Bothrops jararacussu snake venom lectin. **J Protein Chem**, v. 21, n. 1, p. 43-50, Jan 2002. ISSN 0277-8033 (Print) 0277-8033 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902666> >.

DE CARVALHO, D. D. et al. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake Bothrops jararacussu) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicol**, v. 39, n. 10, p. 1471-6, Oct 2001. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478954> >.

DE MIGUEL, D. et al. Onto better TRAILs for cancer treatment. **Cell Death Differ**, v. 23, n. 5, p. 733-47, May 2016. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943322> >.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. **Genes Dev**, v. 13, n. 3, p. 239-52, Feb 1 1999. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990849> >.

DEVERAUX, Q. L. et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. **EMBO J**, v. 17, n. 8, p. 2215-23, Apr 15 1998. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545235> >.

DIAS-NETIPANYI, M. F. et al. BJcuL, a snake-venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro. **Toxicology in vitro**, 2016.

DIAS-NETIPANYI, M. F. et al. BjcL, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro. **Toxicol In Vitro**, v. 33, p. 118-24, Jun 2016. ISSN 1879-3177 (Electronic) 0887-2333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944802> >.

DIMMELER, S. et al. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. **J Exp Med**, v. 189, n. 11, p. 1815-22, Jun 7 1999. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359585> >.

DING, F. et al. USP22 promotes NSCLC tumorigenesis via MDMX up-regulation and subsequent p53 inhibition. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 307-20, 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25547493> >.

DITZEL, M. et al. Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation. **Mol Cell**, v. 32, n. 4, p. 540-53, Nov 21 2008. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026784> >.

DOHI, T. et al. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 114, n. 8, p. 1117-27, Oct 2004. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489959> >.

- DOHI, T. et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. **J Biol Chem**, v. 279, n. 33, p. 34087-90, Aug 13 2004. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218035> >.
- DOHI, T.; XIA, F.; ALTIERI, D. C. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. **Mol Cell**, v. 27, n. 1, p. 17-28, Jul 6 2007. ISSN 1097-2765 (Print)
1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612487> >.
- DOMINA, A. M. et al. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. **Oncogene**, v. 23, n. 31, p. 5301-15, Jul 8 2004. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241487> >.
- DU, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 33-42, Jul 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929711> >.
- EA, C. K. et al. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. **Mol Cell**, v. 22, n. 2, p. 245-57, Apr 21 2006. ISSN 1097-2765 (Print)
1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603398> >.
- EDELMANN, M. J.; NICHOLSON, B.; KESSLER, B. M. Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases. **Expert Rev Mol Med**, v. 13, p. e35, 2011. ISSN 1462-3994 (Electronic)
1462-3994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22088887> >.
- EL-DEIRY, R. N. C. W. S. CASPASE-8 REGULATION OF TRAIL-MEDIATED CELL DEATH. **Experimental Oncology**, v. 34, n. September, p. 160-164, 2012.
- EL FAJOU, Z. et al. Oxaliplatin sensitizes human colon cancer cells to TRAIL through JNK-dependent phosphorylation of Bcl-xL. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 663-73, Aug 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic)
0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683075> >.
- ELIFIO-ESPOSITO, S. et al. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 782-799, 2007. ISSN 1678-9199.
- ELIFIO-ESPOSITO, S. et al. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunol**, v. 12, p. 10, 2011. ISSN 1471-2172 (Electronic)
1471-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266049> >.
- ELMALLAH, M. I.; MICHEAU, O. Marine Drugs Regulating Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). **Mar Drugs**, v. 13, n. 11, p. 6884-909, Nov 2015. ISSN 1660-3397 (Electronic)
1660-3397 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26580630> >.
- FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11** Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. 2013.
- FUKUSHIMA, H. et al. SCF(Fbw7) modulates the NFkB signaling pathway by targeting NFkB2 for ubiquitination and destruction. **Cell Rep**, v. 1, n. 5, p. 434-43, May 31 2012. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708077> >.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-811, Aug 7 2006. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892092> >.

- FULDA, S.; MEYER, E.; DEBATIN, K. M. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. **Oncogene**, v. 21, n. 15, p. 2283-94, Apr 4 2002. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948412> >.
- FULDA, S. et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. **Nat Med**, v. 8, n. 8, p. 808-15, Aug 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118245> >.
- GALBAN, S.; DUCKETT, C. S. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 1, p. 54-60, Jan 2010. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590513> >.
- GALLIGAN, L. et al. Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n. 12, p. 2026-36, Dec 2005. ISSN 1535-7163 (Print) 1535-7163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373718> >.
- GAO, Z. et al. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 30718-27, Oct 19 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724022> >.
- GERLACH, B. et al. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 591-6, Mar 31 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455173> >.
- GEWIES, A.; GRIMM, S. UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease. **Cancer Res**, v. 63, n. 3, p. 682-8, Feb 1 2003. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566314> >.
- GILLISSEN, B. et al. Targeted therapy of the XIAP/proteasome pathway overcomes TRAIL-resistance in carcinoma by switching apoptosis signaling to a Bax/Bak-independent 'type I' mode. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e643, 2013. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23703388> >.
- GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 373-428, Apr 2002. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917093> >.
- GRANER, E. et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 253-61, Mar 2004. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050917> >.
- HAGLUND, K.; DI FIORE, P. P.; DIKIC, I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 11, p. 598-603, Nov 2003. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607090> >.
- HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **EMBO J**, v. 24, n. 19, p. 3353-9, Oct 5 2005. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148945> >.
- HAIMERL, F. et al. Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 2 contributes to tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte survival. **J Biol Chem**, v. 284, n. 1, p. 495-504, Jan 2 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001362> >.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

- HARHAJ, E. W.; DIXIT, V. M. Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. **Immunol Rev**, v. 246, n. 1, p. 107-24, Mar 2012. ISSN 1600-065X (Electronic)
0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435550> >.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 425-79, 1998. ISSN 0066-4154 (Print)
0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759494> >.
- HERSHKO, A. et al. Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. **J Biol Chem**, v. 257, n. 23, p. 13964-70, Dec 10 1982. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6292216> >.
- HEYININCK, K.; BEYAERT, R. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 1, p. 1-4, Jan 2005. ISSN 0968-0004 (Print)
0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653317> >.
- HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 3, p. 195-201, Mar 2001. ISSN 1471-0072 (Print)
1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265249> >.
- HOELLER, D.; HECKER, C. M.; DIKIC, I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 10, p. 776-88, Oct 2006. ISSN 1474-175X (Print)
1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990855> >.
- HU, J. et al. USP22 promotes tumor progression and induces epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 88, n. 3, p. 239-45, Jun 2015. ISSN 1872-8332 (Electronic)
0169-5002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907317> >.
- HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1543-68, Sep 2007. ISSN 1360-8185 (Print)
1360-8185 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573556> >.
- INUZUKA, H. et al. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 104-9, Mar 3 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368833> >.
- IRMLER, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 190-5, Jul 10 1997. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217161> >.
- ITO, T. et al. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. **J Biol Chem**, v. 272, n. 18, p. 11671-3, May 2 1997. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115213> >.
- JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: a potent anticancer agent. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 4855-60, 2012. ISSN 1513-7368 (Print)
1513-7368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23244070> >.
- JEBALI, J. et al. Lebecin, a new C-type lectin like protein from *Macrovipera lebetina* venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. **Toxicon**, v. 86, p. 16-27, Aug 2014. ISSN 1879-3150 (Electronic)
0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814013> >.
- KAPURIA, V. et al. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. **Cancer Res**, v. 70, n. 22, p. 9265-76, Nov 15 2010. ISSN 1538-7445 (Electronic)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21045142> >.

- KARIN, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6867-74, Nov 22 1999. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602462> >.
- _____. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431-6, May 25 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724054> >.
- KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nat Immunol**, v. 3, n. 3, p. 221-7, Mar 2002. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875461> >.
- KARPEL-MASSLER, G. et al. Inhibition of deubiquitinases primes glioblastoma cells to apoptosis in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p. 12791-805, Mar 15 2016. ISSN 1949-2553 (Electronic)
1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26872380> >.
- KAUNISTO, A. et al. PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 9, p. 1215-26, Sep 2009. ISSN 1476-5403 (Electronic)
1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343040> >.
- KAWASAKI, H. et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 22, p. 5071-4, Nov 15 1998. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823313> >.
- KIM, H. R. et al. Etoposide sensitizes neuroblastoma cells expressing caspase 8 to TRAIL. **Cell Biol Int Rep** (2010), v. 19, n. 1, p. e00017, 2012. ISSN 2041-5346 (Electronic)
2041-5346 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124518> >.
- KIM, K. et al. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 2, p. 335-46, Feb 2000. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690508> >.
- KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opin Biol Ther**, v. 11, n. 11, p. 1469-84, Nov 2011. ISSN 1744-7682 (Electronic)
1471-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21939428> >.
- KLUCK, R. M. et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1132-6, Feb 21 1997. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027315> >.
- KOCAB, A. J.; DUCKETT, C. S. Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. **FEBS J**, v. 283, n. 2, p. 221-31, Jan 2016. ISSN 1742-4658 (Electronic)
1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26462035> >.
- KOVALENKO, A. et al. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 801-5, Aug 14 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917691> >.
- KRAPPMANN, D.; SCHEIDEREIT, C. A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. **EMBO Rep**, v. 6, n. 4, p. 321-6, Apr 2005. ISSN 1469-221X (Print)
1469-221X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809659> >.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia Básica**. 9a. edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. ISBN 978-85-352-6294-0.
- KUNDU, M. et al. A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. **Nat Immunol**, v. 10, n. 8, p. 918-26, Aug 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19597496> >.

- LACASSE, E. C. et al. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6252-75, Oct 20 2008. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931692> >.
- LACOUR, S. et al. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. **Cancer Res**, v. 61, n. 4, p. 1645-51, Feb 15 2001. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245478> >.
- LACOUR, S. et al. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. **Oncogene**, v. 22, n. 12, p. 1807-16, Mar 27 2003. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660816> >.
- LAI, D.; VISSER-GRIEVE, S.; YANG, X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. **Biosci Rep**, v. 32, n. 4, p. 361-74, Aug 2012. ISSN 1573-4935 (Electronic) 0144-8463 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22762204> >.
- LEIST, M. et al. The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. **Mol Med**, v. 2, n. 1, p. 109-24, Jan 1996. ISSN 1076-1551 (Print) 1076-1551 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900539> >.
- LI, T. et al. HSCARG downregulates NF-kappaB signaling by interacting with USP7 and inhibiting NEMO ubiquitination. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1229, 2014. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24832601> >.
- LIN, J. et al. Inhibitor of differentiation 1 contributes to head and neck squamous cell carcinoma survival via the NF-kappaB/survivin and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 1, p. 77-87, Jan 1 2010. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028744> >.
- LIU, C. C. et al. Biotoxins for cancer therapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 12, p. 4753-8, 2014. ISSN 1513-7368 (Print) 1513-7368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998537> >.
- LIU, J. et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. **Biochim Biophys Acta**, v. 1855, n. 1, p. 50-60, Jan 2015. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481052> >.
- LIU, Y. et al. The Proapoptotic F-box Protein Fbx17 Regulates Mitochondrial Function by Mediating the Ubiquitylation and Proteasomal Degradation of Survivin. **J Biol Chem**, v. 290, n. 19, p. 11843-52, May 8 2015. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25778398> >.
- LIU, Y. B. et al. Ubiquitin-proteasomal degradation of antiapoptotic survivin facilitates induction of apoptosis in prostate cancer cells by pristimerin. **Int J Oncol**, v. 45, n. 4, p. 1735-41, Oct 2014. ISSN 1791-2423 (Electronic) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175770> >.
- LONGLEY, D. B. et al. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. **Oncogene**, v. 25, n. 6, p. 838-48, Feb 9 2006. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247474> >.
- LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307-15, Nov 18 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549092> >.

- MARCINKIEWICZ, C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 9, p. 1974-86, Sep 2013. ISSN 1878-5875 (Electronic)
1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23811033> >.
- MARTINEZ-FORERO, I. et al. Lysine 63 polyubiquitination in immunotherapy and in cancer-promoting inflammation. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 22, p. 6751-7, Nov 15 2009. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19887490> >.
- MCLORNAN, D. P. et al. Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 13, p. 3442-51, Jul 1 2010. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570920> >.
- METZGER, M. B.; HRISTOVA, V. A.; WEISSMAN, A. M. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 3, p. 531-7, Feb 1 2012. ISSN 1477-9137 (Electronic)
0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389392> >.
- MICHEAU, O. et al. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 16, p. 5299-305, Aug 2001. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463813> >.
- MICHEAU, O.; SHIRLEY, S.; DUFOUR, F. Death receptors as targets in cancer. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 8, p. 1723-44, Aug 2013. ISSN 1476-5381 (Electronic)
0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638798> >.
- MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 181-90, Jul 25 2003. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887920> >.
- MIYAMOTO, S. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I kappa B alpha is a signal for its degradation but not dissociation from NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 26, p. 12740-4, Dec 20 1994. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809113> >.
- MOORE, D. J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. **Neuromolecular Med**, v. 4, n. 1-2, p. 95-108, 2003. ISSN 1535-1084 (Print)
1535-1084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528055> >.
- MORIZANE, Y. et al. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. **J Biochem**, v. 137, n. 2, p. 125-32, Feb 2005. ISSN 0021-924X (Print)
0021-924X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749826> >.
- MOUCHANTAF, R. et al. The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. **J Biol Chem**, v. 281, n. 50, p. 38738-47, Dec 15 2006. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038327> >.
- MULLARD, A. Pioneering apoptosis-targeted cancer drug poised for FDA approval. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 3, p. 147-9, Mar 2016. ISSN 1474-1784 (Electronic)
1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26931080> >.
- NAUMANN, I. et al. Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 10, p. 3204-18, May 15 2011. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459798> >.

- NDOZANGUE-TOURIGUINE, O. et al. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. **Oncogene**, v. 27, n. 46, p. 6012-22, Oct 9 2008. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18560353> >.
- NIJMAN, S. M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 773-86, Dec 2 2005. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325574> >.
- NOBELPRIZE.ORG. The Nobel Prize in Chemistry 2004. 2004. Disponível em: < www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004 >. Acesso em: 25 Apr 2016.
- NOGUEIRA-FERREIRA, R. et al. Exploring the role of post-translational modifications on protein-protein interactions with survivin. **Arch Biochem Biophys**, v. 538, n. 2, p. 64-70, Oct 15 2013. ISSN 1096-0384 (Electronic) 0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938875> >.
- NOLTE, S. et al. BJcuL, a lectin purified from Bothrops jararacussu venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicol**, v. 59, n. 1, p. 81-5, Jan 2012. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079298> >.
- O'DONNELL, M. A. et al. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling. **Curr Biol**, v. 17, n. 5, p. 418-24, Mar 6 2007. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306544> >.
- O'DONNELL, M. A.; TING, A. T. NFkappaB and ubiquitination: partners in disarming RIPK1-mediated cell death. **Immunol Res**, v. 54, n. 1-3, p. 214-26, Dec 2012. ISSN 1559-0755 (Electronic) 0257-277X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22477525> >.
- OGAWA, T. et al. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicol**, v. 45, n. 1, p. 1-14, Jan 2005. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581677> >.
- OPFERMAN, J. T. Attacking cancer's Achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members. **FEBS J**, Aug 21 2015. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26293580> >.
- _____. Attacking cancer's Achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members. **FEBS J**, v. 283, n. 14, p. 2661-75, Jul 2016. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26293580> >.
- OUHTIT, A. et al. Survivin is not only a death encounter but also a survival protein for invading tumor cells. **Front Biosci**, v. 12, p. 1260-70, 2007. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127378> >.
- OZEKI, Y. et al. C-type galactoside-binding lectin from Bothrops jararaca venom: comparison of its structure and function with those of botroctetin. **Arch Biochem Biophys**, v. 308, n. 1, p. 306-10, Jan 1994. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8311467> >.
- OZOREN, N.; EL-DEIRY, W. S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. **Neoplasia**, v. 4, n. 6, p. 551-7, Nov-Dec 2002. ISSN 1522-8002 (Print) 1476-5586 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407450> >.
- PANDEY, M. K. et al. Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 9, n. 1, 2016. ISSN 1424-8247 (Electronic) 1424-8247 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26927133> >.

- PANNER, A. et al. Ubiquitin-specific protease 8 links the PTEN-Akt-AIP4 pathway to the control of FLIPS stability and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme. **Cancer Res**, v. 70, n. 12, p. 5046-53, Jun 15 2010. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484045> >.
- PANUNTO, P. C. et al. Biological activities of a lectin from Bothrops jararacussu snake venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 21-31, Jan 2006. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309723> >.
- PARK, M. H. et al. Snake venom toxin from Vipera lebetina turanica sensitizes cancer cells to TRAIL through ROS- and JNK-mediated upregulation of death receptors and downregulation of survival proteins. **Apoptosis**, v. 17, n. 12, p. 1316-26, Dec 2012. ISSN 1573-675X (Electronic) 1360-8185 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007278> >.
- PEREIRA-BITTENCOURT, M. et al. The effect of a lectin from the venom of the snake, Bothrops jararacussu, on tumor cell proliferation. **Anticancer Res**, v. 19, n. 5B, p. 4023-5, Sep-Oct 1999. ISSN 0250-7005 (Print) 0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628348> >.
- PITTI, R. M. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. **J Biol Chem**, v. 271, n. 22, p. 12687-90, May 31 1996. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663110> >.
- PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integr Biol (Camb)**, v. 3, n. 4, p. 279-96, Apr 2011. ISSN 1757-9708 (Electronic) 1757-9694 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340093> >.
- POPOV, N. et al. Fbw7 and Usp28 regulate myc protein stability in response to DNA damage. **Cell Cycle**, v. 6, n. 19, p. 2327-31, Oct 1 2007. ISSN 1551-4005 (Electronic) 1551-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873522> >.
- POPOV, N. et al. The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 7, p. 765-74, Jul 2007. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558397> >.
- POUKKULA, M. et al. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. **J Biol Chem**, v. 280, n. 29, p. 27345-55, Jul 22 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886205> >.
- RAMAKRISHNA, S.; SURESH, B.; BAEK, K. H. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 1, p. 15-26, Jan 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20730552> >.
- RAVI, R. et al. Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. **Cancer Res**, v. 64, n. 24, p. 9105-14, Dec 15 2004. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604280> >.
- ROOSWINKEL, R. W. et al. Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. **Blood**, v. 123, n. 18, p. 2806-15, May 1 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622325> >.
- SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **J Mol Recognit**, v. 27, n. 3, p. 117-23, Mar 2014. ISSN 1099-1352 (Electronic) 0952-3499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446375> >.
- SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 35, 2015. ISSN 1678-9199 (Electronic) 1678-9180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26413085> >.

SAYERS, T. J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 8, p. 1173-80, Aug 2011. ISSN 1432-0851 (Electronic) 0340-7004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626033> >.

SCHILE, A. J.; GARCIA-FERNANDEZ, M.; STELLER, H. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. **Genes Dev**, v. 22, n. 16, p. 2256-66, Aug 15 2008. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708583> >.

SCHILITZH, A. et al. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA 2015.

SCHWICKART, M. et al. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. **Nature**, v. 463, n. 7277, p. 103-7, Jan 7 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023629> >.

SENFTLEBEN, U. et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1495-9, Aug 24 2001. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520989> >.

SHI, B. et al. Activation-induced degradation of FLIP(L) is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in macrophages. **J Biol Chem**, v. 284, n. 21, p. 14513-23, May 22 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339247> >.

SHIOZAKI, E. N. et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. **Mol Cell**, v. 11, n. 2, p. 519-27, Feb 2003. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620238> >.

SHIRLEY, S.; MORIZOT, A.; MICHEAU, O. Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v. 6, n. 3, p. 311-23, Sep 2011. ISSN 2212-3970 (Electronic) 1574-8928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21756247> >.

SIDDIQUI, W. A.; AHAD, A.; AHSAN, H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. **Arch Toxicol**, v. 89, n. 3, p. 289-317, Mar 2015. ISSN 1432-0738 (Electronic) 0340-5761 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618543> >.

SPENCER, E.; JIANG, J.; CHEN, Z. J. Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. **Genes Dev**, v. 13, n. 3, p. 284-94, Feb 1 1999. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990853> >.

STOLFI, C. et al. 2-methoxy-5-amino-N-hydroxybenzamide sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating death receptor 5 and survivin expression. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 10, p. 1969-81, Oct 2011. ISSN 1538-8514 (Electronic) 1535-7163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21817114> >.

STRASSER, A.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, Sep 14 2011. ISSN 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21863020> >.

STRASSER, A.; HARRIS, A. W.; CORY, S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. **Cell**, v. 67, n. 5, p. 889-899, 11/29/ 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867491903623> >.

SUMANTRAN, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. **Methods Mol Biol**, v. 731, p. 219-36, 2011. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516411> >.

- SUN, H. et al. Design, synthesis, and characterization of a potent, nonpeptide, cell-permeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP. **J Am Chem Soc**, v. 129, n. 49, p. 15279-94, Dec 12 2007. ISSN 1520-5126 (Electronic) 0002-7863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17999504> >.
- SUN, S. C. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 71-85, Jan 2011. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173796> >.
- SUN, W. et al. USP11 negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by targeting on IkappaBalpha. **Cell Signal**, v. 22, n. 3, p. 386-94, Mar 2010. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874889> >.
- SUN, Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 6, p. 623-9, Nov-Dec 2003. ISSN 1538-4047 (Print) 1538-4047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688465> >.
- SUN, Y. E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. **Neoplasia**, v. 8, n. 8, p. 645-54, Aug 2006. ISSN 1476-5586 (Electronic) 1476-5586 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16925947> >.
- SUZUKI, Y. et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 29, p. 27058-63, Jul 20 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359776> >.
- SUZUKI, Y.; NAKABAYASHI, Y.; TAKAHASHI, R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 15, p. 8662-7, Jul 17 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447297> >.
- TAMM, I. et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res**, v. 58, n. 23, p. 5315-20, Dec 1 1998. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850056> >.
- TANG, B. et al. Expression of USP22 and Survivin is an indicator of malignant behavior in hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol**, v. 47, n. 6, p. 2208-16, Dec 2015. ISSN 1791-2423 (Electronic) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497847> >.
- TROMPOUKI, E. et al. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 793-6, Aug 14 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917689> >.
- ULLENHAG, G. J. et al. Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 17, p. 5070-5, Sep 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785559> >.
- VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 693-733, 2009. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302050> >.
- VAN 'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-6, Jan 31 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823860> >.
- VAN ANTWERP, D. J. et al. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 787-9, Nov 1 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864120> >.

- VAN GEELEN, C. M.; DE VRIES, E. G.; DE JONG, S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 6, p. 345-58, Dec 2004. ISSN 1368-7646 (Print)
1368-7646 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790545> >.
- VARFOLOMEEV, E. et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. **Cell**, v. 131, n. 4, p. 669-81, Nov 16 2007. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022362> >.
- VERHAGEN, A. M. et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 43-53, Jul 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929712> >.
- VOGLER, M. et al. Small molecule XIAP inhibitors enhance TRAIL-induced apoptosis and antitumor activity in preclinical models of pancreatic carcinoma. **Cancer Res**, v. 69, n. 6, p. 2425-34, Mar 15 2009. ISSN 1538-7445 (Electronic)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258513> >.
- VOORHEES, P. M.; ORLOWSKI, R. Z. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p. 189-213, 2006. ISSN 0362-1642 (Print)
0362-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402903> >.
- VUCIC, D.; DIXIT, V. M.; WERTZ, I. E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 7, p. 439-52, Jul 2011. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697901> >.
- WANG, C. et al. Melittin, a Major Component of Bee Venom, Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis by Activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and Inhibiting IκBα Kinase-NFκB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 6, p. 3804-3813, February 6, 2009 2009. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/284/6/3804.abstract> >.
- WANG, Z. et al. Decreased H2B monoubiquitination and overexpression of ubiquitin-specific protease enzyme 22 in malignant colon carcinoma. **Hum Pathol**, v. 46, n. 7, p. 1006-14, Jul 2015. ISSN 1532-8392 (Electronic)
0046-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971547> >.
- WERTZ, I. E. et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 694-9, Aug 5 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258597> >.
- WILKIE-GRANTHAM, R. P.; MATSUZAWA, S.; REED, J. C. Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein. **J Biol Chem**, v. 288, n. 18, p. 12777-90, May 3 2013. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519470> >.
- WU, G. et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. **Nature**, v. 408, n. 6815, p. 1008-12, Dec 21-28 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11140638> >.
- WU, J. et al. Over-expression of survivin is a factor responsible for differential responses of ovarian cancer cells to S-allylmercaptocysteine (SAMC). **Exp Mol Pathol**, v. 100, n. 2, p. 294-302, Feb 16 2016. ISSN 1096-0945 (Electronic)
0014-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26896649> >.
- XIAO, C. et al. Inhibition of CaMKII-mediated c-FLIP expression sensitizes malignant melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. **Exp Cell Res**, v. 304, n. 1, p. 244-55, Mar 10 2005. ISSN 0014-4827 (Print)

0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707589> >.

XU, G. et al. Ubiquitin-specific peptidase 21 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor kappaB activation via binding to and deubiquitinating receptor-interacting protein 1. **J Biol Chem**, v. 285, n. 2, p. 969-78, Jan 8 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910467> >.

YADA, M. et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. **EMBO J**, v. 23, n. 10, p. 2116-25, May 19 2004. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103331> >.

YAU, T. et al. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3791-810, 2015. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25730388> >.

YUAN, B. Z. et al. TRAIL and proteasome inhibitors combination induces a robust apoptosis in human malignant pleural mesothelioma cells through Mcl-1 and Akt protein cleavages. **BMC Cancer**, v. 13, p. 140, 2013. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517112> >.

ZAMBELLI, V. O. et al. Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. **Pharmacol Res**, Jan 27 2016. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826284> >.

ZEESTRATEN, E. C. et al. The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry. **Biomark Cancer**, v. 5, p. 13-29, 2013. ISSN 1179-299X (Electronic)

1179-299X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24179395> >.

ZHAO, J. et al. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. **J Cell Sci**, v. 113 Pt 23, p. 4363-71, Dec 2000. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069780> >.

ZHONG, Q. et al. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 1085-95, Jul 1 2005. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989957> >.

ZHU, H. et al. The synergistic effects of low-dose irinotecan and TRAIL on TRAIL-resistant HT-29 colon carcinoma in vitro and in vivo. **Int J Mol Med**, v. 30, n. 5, p. 1087-94, Nov 2012. ISSN 1791-244X (Electronic)

1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922573> >.

APÊNDICE 1 – RESULTADOS SUPLEMENTARES

I - EFEITOS DE BJcuL SOBRE OS NÍVEIS DE BCL-2

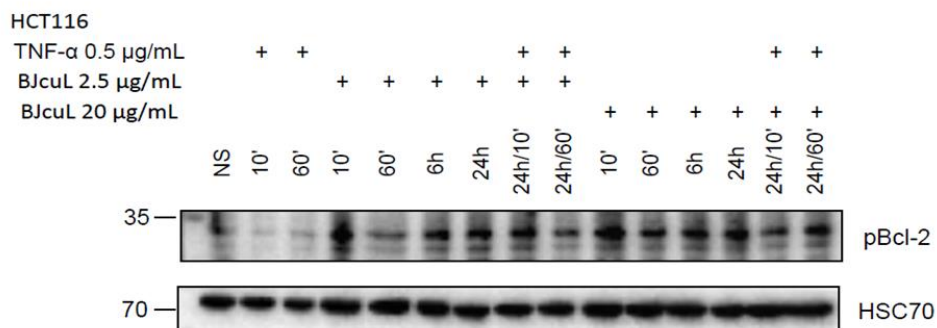
Nós avaliamos os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 fosforilada no resíduo de serina 87. A fosforilação neste sítio é promovida pela proteína quinase ERK e está relacionada à estabilidade de Bcl-2, prevenindo sua ubiquitinação e degradação proteossômica. TNF- α induz desfosforilação deste sítio, promovendo a degradação de Bcl-2, favorecendo a apoptose (Breitschopf, Haendeler *et al.*, 2000). A figura IVa mostra que, em ambas linhagens de CCR aqui estudadas, a estimulação com TNF- α diminui os níveis de pBcl-2 Ser87. Entretanto, após estimulação com BJcuL, pBcl-2 Ser87 se acumula em ambas as linhagens, o que é mais evidente nas células HCT116. Após 24h da estimulação com BJcuL, seguida por TNF- α por 10 e 60 minutos, a forma fosforilada de Bcl-2, entretanto, não pe tão evidente quanto a estimulação por TNF- α somente. Além disso, foi observado que a estimulação das células HCT116 com BJcuL a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induz aumento da expressão de ERK em todos os tempos testados (Fig. IVb).

II - EFEITOS DE BJcuL SOBRE OS NÍVEIS DE SURVIVINA

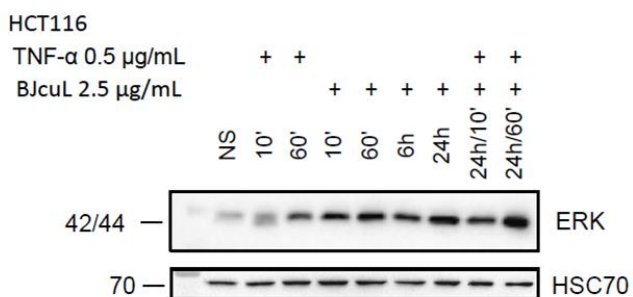
Para checar a integridade do complexo anti-apoptótico survivina-XIAP (Dohi, Xia *et al.*, 2007), nós utilizamos um anticorpo específico para substratos de PKA fosforilados em resíduos de serinas e treoninas. Nenhuma fosforilação foi observada na região da membrana correspondente ao peso molecular presumido de fosfo-survivina (16.5 kDa), indicando a integridade do complexo anti-apoptótico (Figura V).

FIGURA IV – BJCuL ESTABILIZA OS NÍVEIS DE BCL-2

A

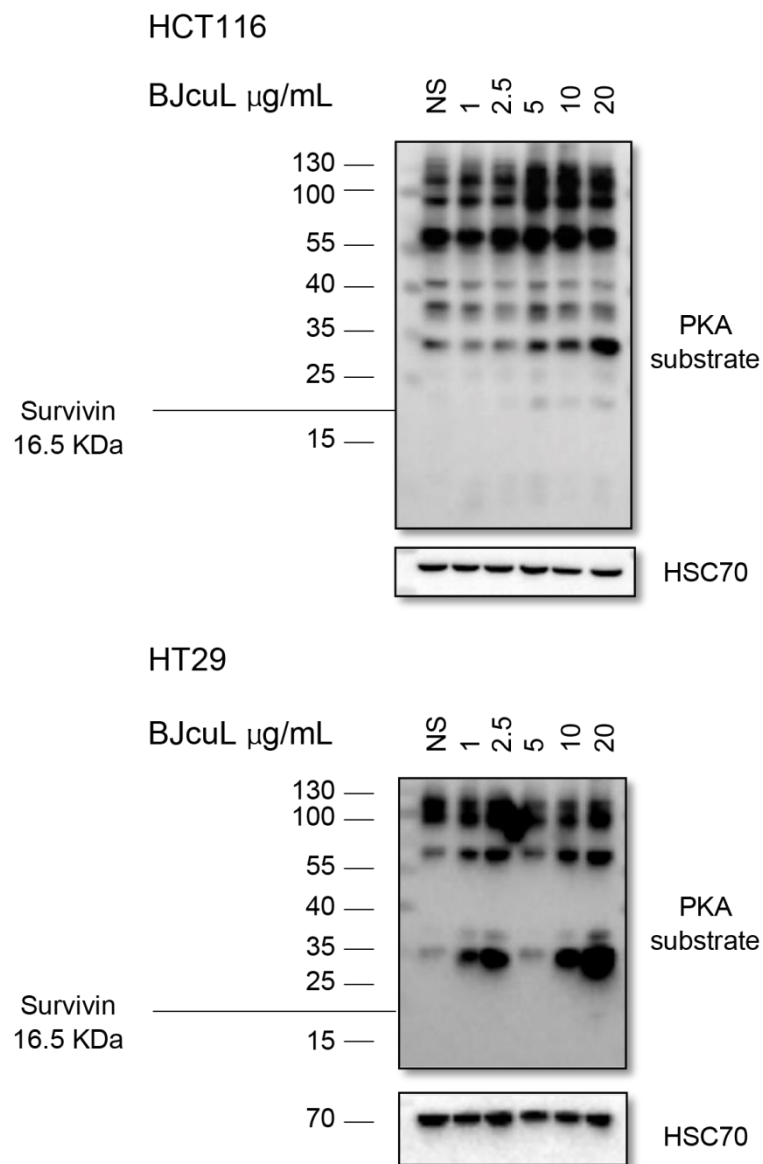


B



As células da linhagem de CCR HCT116 foram estimuladas com TNF- α a 0.5 μ g/mL por 10 ou 60 minutos ou BJcuL nas concentrações de 2.5 μ g/mL e 20 μ g/mL, por tempos que variaram de 10 minutos a 24h, na presença ou ausência de TNF- α . A – A estimulação com TNF- α diminui os níveis de pBcl-2 Ser87 enquanto BJcuL induz aumento desta proteína. B – BJcuL induz aumento dos níveis de ERK a partir de 10 minutos de estimulação a 2.5 μ g/mL

FIGURA V – ANÁLISE DE SUBSTRATOS FOSFORILADOS POR PKA EM RESÍDUOS DE SERINA E TREONINA



As células de CCR das linhagens HT29 e HCT116 foram estimuladas com BJcuL em concentrações que variaram entre 1 $\mu\text{g/mL}$ e 20 $\mu\text{g/mL}$ por 24h. Não são observados substratos fosforilados por PKA na região do peso molecular previsto para survivina.

APÊNDICE 2 – DOUTORADO-SANDUÍCHE (*FELLOW*) REALIZADO DURANTE O PERÍODO



Ministério da Educação - MEC
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
CEP 70040-020 - Brasília, DF

Prezado (a) Senhor (a),
LUCIANA DE FATIMA CHAVES DE MELLO ZISCHLER
RUA PROFESSOR IGNÁCIO ALVES DE SOUZA FILHO, 309
PILARZINHO
Curitiba - Paraná
Brasil
82.110-450

4 de Maio de 2016

Processo: PDSE 99999.004938/2014-03

DECLARAÇÃO DE EX-BOLSISTA

Prezado(a) Ex-bolsista,

Declaramos, para os devidos fins, que o(a) interessado(a) foi bolsista da Capes e realizou Doutorado Sanduíche no exterior, conforme os dados abaixo:

PERÍODO DA BOLSA: 10/2014 a 30/09/2015

INSTITUIÇÃO DE ENSINO: UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

PAÍS: França

Atenciosamente,

Adi Balbinot Junior

Coordenador (a) Geral de Acompanhamento e Monitoramento de Resultados
Esta assinatura independe de reconhecimento de firma, por se tratar de documento público
- Art. 19, Inciso II - Constituição Federal do Brasil

APÊNDICE 3 – PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

THE LECTIN BJCUL INDUCES APOPTOSIS THROUGH TRAIL EXPRESSION, CASPASE CASCADE ACTIVATION, AND MITOCHONDRIAL MEMBRANE PERMEABILITY IN A HUMAN COLON ADENOCARCINOMA CELL LINE

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114002918>



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line



Danusa de Castro Damasio^a, Stefanie Nolte^a, Leonardo Puchetti Polak^a, Anna Paula Brandt^b, Natália Borges Bonan^a, Luciana Zischler^a, Patrícia M. Stuelp-Campelo^a, Silvia Maria S.C. Cadena^b, Lúcia de Noronha^a, Selene L. Elifio-Esposito^a, Andréa Novais Moreno-Amaral^{a,*}

^a Pós-graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2014

Received in revised form 12 August 2014

Accepted 14 August 2014

Available online 3 September 2014

Keywords:

Lectin BJcuL

TRAIL expression

Colon adenocarcinoma

Apoptosis

Mitochondria activity

Caspase cascade

ABSTRACT

It has been demonstrated that the cytotoxic effect of BJcuL, the lectin isolated from *Bothrops jararacussu* venom, on human gastric carcinoma is accompanied by the inhibition of extracellular matrix adhesion, cytoskeleton disassembly and apoptosis induction. The present study aimed to evaluate the apoptosis mechanisms triggered by the BJcuL interaction with specific glycans on the surface of HT29 human colon adenocarcinoma cells. The results demonstrated that BJcuL interacts with glycoligands targets on the cell, which were inhibited in the presence of *D*-galactose. It shows a dose-dependently cytotoxic effect that is inhibited in the presence of *D*-galactose. A dose-dependent cell aggregation decrease was also observed for the HT29 cells. Analysis of cell proliferation inhibition was assessed by anti-PCNA and demonstrated that lectin diminishes PCNA expression when compared with untreated cells. Differences in apoptotic marker expression estimated by immunohistochemistry revealed that the lectin promotes an increase in TRAIL expression, leading to an increase in the expression of FADD, caspase-8 and Bax. Besides the increased expression of apoptosis-related proteins, our results revealed that the lectin promotes a mitochondrial respiration decrease and a 75% increase in the amount of cytochrome c released. Together these results suggest that the cytotoxicity of BJcuL can sensitize pro-apoptotic proteins in the cytoplasm and mitochondria, leading to the apoptotic cascade.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lectins are molecules that are considered to be of great scientific and pharmacological importance because of their role in many biological phenomena such as the induction of platelet aggregation (Ozeki et al., 1994),

hemagglutination (Mastro et al., 1986), the activation of lymphocyte proliferation, cell growth regulation (Knibbs et al., 1994), cell adhesion (Barondes, 1984; Sharon and Lis, 1989) and apoptosis activation (Perillo et al., 1998). These multifunctional lectin abilities are due to its characteristic recognition of carbohydrates in solution and on the cell surface (Sharon and Lis, 2004). The lectin purified from *Bothrops jararacussu* snake venom (BJcuL) comprises two subunits of approximately 15 kDa and demonstrates a

* Corresponding author. Tel./fax: +55 41 3271 2285.
E-mail address: andrea.moreno@puqr.br (A.N. Moreno-Amaral).

APÊNDICE 4 – PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

DEATH RECEPTOR INDUCED-APOPTOSIS SIGNALING REGULATION BY EZRIN IS CELL TYPE-DEPENDENT AND OCCURS IN A DISC-INDEPENDENT MANNER IN COLON CANCER CELLS

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126526>

RESEARCH ARTICLE

Death Receptor-Induced Apoptosis Signalling Regulation by Ezrin Is Cell Type Dependent and Occurs in a DISC-Independent Manner in Colon Cancer Cells

Elisabetta Iessi^{1,2}, Luciana Zischler^{1,3}, Aurélie Etringer^{1,2}, Marlon Bergeret^{1,2}, Aymeric Morlé^{1,2}, Guillaume Jacquemin^{1,2}, Alexandre Morizot^{1,2}, Sarah Shirley^{1,2}, Najoua Lalaoui^{1,2}, Selene L. Eliffo-Esposito³, Stefano Fais⁴, Carmen Garrido^{1,2,7}, Eric Solary^{5,6}, Olivier Micheau^{1,2,7*}

1 INSERM, U866, Dijon, F-21079, France, **2** UFR des Sciences de Santé, Univ. Bourgogne, Dijon, F-21079, France, **3** Pós-graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil, **4** Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Antitumor Drugs Section, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, Rome, Italy, **5** INSERM, U1009, Villejuif, F-94805, France, **6** Institut Gustave Roussy, Univ. Paris XI, Villejuif, F-94805, France, **7** Centre Georges-François Leclerc, Dijon, F-21000, France

* olivier.micheau@insERM.fr



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Iessi E, Zacher L, Etringer A, Bergeret M, Morlé A, Jacquemin G, et al. (2015) Death Receptor-Induced Apoptosis Signalling Regulation by Ezrin Is Cell Type Dependent and Occurs in a DISC-Independent Manner in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* 10(5): e0126526. doi:10.1371/journal.pone.0126526

Academic Editor: Shi-Yong Sun, Emory University, UNITED STATES

Received: January 7, 2015

Accepted: April 3, 2015

Published: May 26, 2015

Copyright: © 2015 Iessi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the European Community (ApoTrain Marie Curie RTN), the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021-01-UPSTIC Labex, the University of Bourgogne, the Conseil Régional de Bourgogne, the INCa (Institut National du Cancer, PCLYCOM-174), the Cancéropôle Grand-Est, the Ligue Nationale contre le Cancer, ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), and Ministry of

Abstract

Ezrin belongs to the ERM (ezrin-radixin-moesin) protein family and has been demonstrated to regulate early steps of Fas receptor signalling in lymphoid cells, but its contribution to TRAIL-induced cell death regulation in adherent cancer cells remains unknown. In this study we report that regulation of FasL and TRAIL-induced cell death by ezrin is cell type dependent. Ezrin is a positive regulator of apoptosis in T-lymphoma cell line Jurkat, but a negative regulator in colon cancer cells. Using ezrin phosphorylation or actin-binding mutants, we provide evidence that negative regulation of death receptor-induced apoptosis by ezrin occurs in a cytoskeleton- and DISC-independent manner, in colon cancer cells. Remarkably, inhibition of apoptosis induced by these ligands was found to be tightly associated with regulation of ezrin phosphorylation on serine 66, the tumor suppressor gene WWOX and activation of PKA. Deficiency in WWOX expression in the liver cancer SK-HEP1 or the pancreatic Mia PaCa-2 cell lines as well as WWOX silencing or modulation of PKA activation by pharmacological regulators, in the colon cancer cell line SW480, abrogated regulation of TRAIL signalling by ezrin. Altogether our results show that death receptor pro-apoptotic signalling regulation by ezrin can occur downstream of the DISC in colon cancer cells.

Introduction

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL or Apo2L) induces cell death in a wide variety of cancer cells, but not in normal cells. This peculiarity renders TRAIL and TRAIL