



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



Isadora Oliveira Ansaloni Pereira

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL FUNCIONAL DO lncRNA *JHDMID-AS1* NA
QUIMIOTERAPIA COM GENCITABINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE
BEXIGA**

OURO PRETO

2022

Isadora Oliveira Ansaloni Pereira

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL FUNCIONAL DO lncRNA *JHDMID-AS1* NA
QUIMIOTERAPIA COM GENCITABINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE
BEXIGA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Co-orientadora: Dr. Ana Paula Braga Lima

OURO PRETO

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436i Pereira, Isadora Oliveira Ansaloni.
Investigação do papel funcional do lncRNA JHDM1D-AS1 na
quimioterapia com gencitabina em células de carcinoma de bexiga.
[manuscrito] / Isadora Oliveira Ansaloni Pereira. - 2022.
39 f.: il.: color..

Orientadora: Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva.
Coorientadora: Dra. Ana Paula Braga Lima.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. RNA Longo não Codificante. 2. Bexiga - Câncer. 3. Agentes
antineoplásicos. 4. Quimioterapia. I. Silva, Glenda Nicioli da. II. Lima, Ana
Paula Braga. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.2

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Isadora Oliveira Ansaloni Pereira

Investigação do papel funcional do lncRNA JHDM1D-AS1 na quimioterapia com gencitabina em células de carcinoma de bexiga

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de farmacêutico

Aprovada em 24 de junho de 2022

Membros da banca

Dra. Glenda Nicioli da Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Tamires Cunha Almeida - (Instituto Butantã)
Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira (Universidade Federal de Ouro Preto)

Glenda Nicioli da Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 28/06/2022



Documento assinado eletronicamente por **Glenda Nicioli da Silva, VICE-DIRETOR(A) DA ESCOLA DE FARMÁCIA**, em 28/06/2022, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0353742** e o código CRC **39E828F1**.

RESUMO

O câncer de bexiga é o décimo primeiro câncer mais comum no mundo, representando a 14ª causa de morte associada a câncer. Os tumores músculo-invasivos de bexiga são relacionados a um pior prognóstico, apresentando alto grau de recidiva e evolução a doença metastática, mesmo após cistectomia radical. A terapia neoadjuvante ou adjuvante a esse procedimento visa o tratamento de micrometástases que podem estar presentes no momento do diagnóstico, e um dos regimes terapêuticos com melhor eficácia e tolerabilidade é à base de Cisplatina e Gencitabina. A resistência quimioterápica é um grande empecilho à terapia, além dos efeitos tóxicos dos quimioterápicos. RNAs longos não codificantes (lncRNAs) possuem padrão de expressão altamente específico, possuindo ações desde a remodelação da cromatina, em nível nuclear, até regulação epigenética e níveis pós transcricionais. Níveis alterados de expressão dessas moléculas são encontrados em diversos tumores, e elas se envolvem na carcinogênese modulando a proliferação e migração celular, além de estarem relacionadas à resistência à quimioterapia. Estudos já demonstraram a expressão anormal do lncRNA *JHDMID-AS1* em tumores de bexiga, evidenciando sua relação com tumores de maior grau, porém, ainda não há estudos sobre o papel funcional deste lncRNA na modulação da sensibilidade à quimioterapia com gencitabina em células de carcinoma de bexiga de alto grau. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da combinação de concentrações de gencitabina aliadas ao silenciamento de *JHDMID-AS1* em duas linhagens de tumor de bexiga de alto grau (J82 e UM-UC-3), por meio de testes de citotoxicidade (XTT), sobrevivência clonogênica, morfologia celular e migração celular. Os resultados mostraram que o tratamento combinado levou a maior citotoxicidade, diminuição na formação de clones, alteração morfológica e diminuição da capacidade de migração das células em comparação com os tratamentos sozinhos. Conclui-se que o silenciamento de *JHDMID-AS1* aumenta a sensibilidade de células de tumor de bexiga de alto grau ao tratamento com gencitabina, podendo ser avaliado como uma estratégia para se atingir uma resposta terapêutica eficaz utilizando uma menor concentração de quimioterápico.

ABSTRACT

Bladder cancer is the eleventh most common cancer in the world, representing the 14th leading cause of cancer-associated death. Muscle-invasive bladder tumors are associated with a worse prognosis, with a high degree of recurrence and progression to metastatic disease, even after radical cystectomy. Neoadjuvant or adjuvant therapy for this procedure is aimed at treating micrometastases that may be present at the time of diagnosis, and one of the therapeutic regimens with better efficacy and tolerability is based on Cisplatin and Gemcitabine. Chemotherapy resistance is a major obstacle to therapy, in addition to the toxic effects of chemotherapy. Long non-coding RNAs (lncRNAs) have a highly specific expression pattern, having actions from chromatin remodeling, at the nuclear level, to epigenetic regulation and post-transcriptional levels. Altered levels of expression of these molecules are found in several tumors, and they are involved in carcinogenesis by modulating cell proliferation and migration, in addition to being related to chemotherapy resistance. Studies have already demonstrated the abnormal expression of lncRNA *JHDMID-ASI* in bladder tumors, evidencing its relationship with higher grade tumors. However, there are still no studies on the functional role of this lncRNA in modulating the sensitivity to chemotherapy with gemcitabine in carcinoma cells of the bladder. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the combination of gemcitabine concentrations with *JHDMID-ASI* silencing in two high-grade bladder tumor cell lines (J82 and UM-UC-3) using cytotoxicity tests (XTT), clonogenic survival, cell morphology and cell migration. The results showed that the combined treatment led to greater cytotoxicity, decrease in clone formation, morphological alteration and decrease in cell migration capacity compared to the treatments alone. It is concluded that the silencing of *JHDMID-ASI* increases the sensitivity of high-grade bladder tumor cells to treatment with gemcitabine, and can be evaluated as a strategy to achieve an effective therapeutic response using a lower concentration of chemotherapy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da GLOBOCAN, o câncer de bexiga é o décimo primeiro câncer mais comum no mundo, representando a 14^o causa de morte associada a câncer, e é até três vezes mais prevalente em indivíduos do sexo masculino. No Brasil, o câncer de bexiga é o nono câncer mais comum e representa um dos cinco tipos de câncer mais prevalentes em homens (FERLAY et al., 2021).

Noventa por cento dos casos de câncer de bexiga são de células transicionais especializadas que revestem a bexiga e o trato urinário, denominadas células uroteliais, sendo, destes, 75% tumores superficiais, de menor grau, e 25% tumores músculo-invasivos, de maior grau. Os tumores superficiais de células uroteliais são caracterizados por lesões superficiais, geralmente apresentando um bom prognóstico, enquanto os tumores músculo-invasivos podem atingir órgãos adjacentes e linfonodos pélvicos, dificultando o tratamento (SAGINALA et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2017; MUSHTAQ et al., 2019). A classificação patológica dos carcinomas de células uroteliais dá-se pela extensão do tumor primário e pelo grau de diferenciação histológica. Dentro da classificação do estadiamento tumoral encontram-se o tumor papilar, o carcinoma *in situ* (CIS), o tumor músculo-invasivo e os tumores metastáticos (CHESTER et al., 2004). Em relação ao grau de diferenciação celular, os tumores são classificados como baixo grau, que são tumores com células diferenciadas, e como alto grau, os tumores com células pouco diferenciadas (SAGINALA et al., 2020).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de bexiga podem ser hereditários (predisposição genética) ou adquiridos (exposição ambiental), e uma complexa interação entre estes fatores determina o desenvolvimento e progressão desses tumores (MUSHTAQ et al., 2019). O tabagismo é o fator ambiental mais importante associado ao desenvolvimento do carcinoma de bexiga, possuindo risco atribuível de 50% em homens e mulheres (FREEDMAN et al., 2011). Assume-se um período de 20 a 30 anos entre o início da exposição ao tabaco até o desenvolvimento do câncer de bexiga. A exposição ocupacional a aminas aromáticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e hidrocarbonetos clorados é a segunda causa mais comum desse tumor (MUSHTAQ et al., 2019). Condições inflamatórias crônicas, como infecções bacterianas e por *Schistosoma hematobium* (comuns na África do Norte) e radiação pélvica também estão relacionadas à predisposição a tumores de bexiga. A idade média de diagnóstico desse tipo de câncer é entre 70-84 anos, o que pode ser explicado como um efeito crônico da exposição aos carcinógenos anteriormente citados aliado a uma redução na habilidade de reparo do DNA (LENIS et al., 2020).

Heranças genéticas estão associadas a aproximadamente 7% dos casos de câncer de bexiga (AL-ZALABANI et al., 2016). Apesar disso, mutações somáticas em alguns genes que regulam o ciclo celular, como *FGFR3*, *RBI*, *HRAS*, *TP53*, *TSC1* e outros, são comumente encontradas nos tumores de bexiga (ZHANG; ZHANG, 2015). Alterações genéticas estão associadas ao grau, agressividade, progressão e potencial metastático dos tumores.

O gene *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), é um importante gene supressor tumoral, cujas funções regulatórias do ciclo celular, do reparo ao DNA e indução à apoptose o conferiram a denominação de “guardião do genoma” (FETT-CONTE, SALLES, 2002). Em resposta ao estresse celular, esse gene codifica a proteína p53, envolvida no controle transcricional (CORDON-CARDO et al., 1994). No câncer, as mutações em *TP53* são *missense* ou de perda função no domínio de ligação de p53 ao DNA, afetando a ativação transcricional de genes subsequentes a ele, como p21 (HUSSAIN, et al., 2013). Além disso, as mutações *missense* provavelmente podem conferir a p53 características de proto-oncogenes, por exemplo, ao formarem dímeros com a forma selvagem de p53, impedindo sua função (PETIJEAN et al., 2007, HUSSAIN, et al., 2013). O gene *TP53* é o gene mais mutado em cânceres humanos, sendo encontrado mutado em 50% deles. Alterações nesse gene são encontradas em 50% dos carcinomas de bexiga, sendo mais comuns em tumores invasivos e em tumores metastáticos (ATLAS, 2021). Além disso, mutações no gene *TP53* também se relacionam à progressão da doença de baixo grau para alto grau, maior risco de recorrência e pior prognóstico (AUDENET, et al., 2018, HUSSAIN, et al., 2013).

A cistoscopia com ressecção transuretral (RTU) é o método padrão para o diagnóstico, estadiamento e tratamento de tumores superficiais de bexiga, porém é comum os pacientes apresentarem alta taxa de recidiva, além de evolução para tumor músculo-invasivo. Assim, recomenda-se terapia intravesical adjacente, pós RTU, que consiste em imunoterapia com bacilo de Calmette-Guérin (BCG) ou quimioterapia, com a utilização de agentes citotóxicos como mitomicina C ou gencitabina (MEDEIROS, et al., 2018; MUSHTAQ et al., 2019; EAU GUIDELINES, 2021; CHANG, et al., 2016).

O tratamento do tumor de bexiga músculo-invasivo (MIBC) pode envolver terapia neoadjuvante com o esquema M-VAC (metotrexato, vimblastina, doxorubicina, cisplatina), PCG (paclitaxel, cisplatina e gencitabina) ou CG (cisplatina e gencitabina); radioterapia; cistectomia radical com linfadenectomia pélvica; quimioterapia adjuvante baseada em platina (cisplatina ou carboplatina) e radioterapia adjuvante (MEDEIROS, et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2017; MUSHTAQ et al., 2019). A cistectomia radical associada à linfadenectomia pélvica segue sendo o tratamento mais comum para casos de tumores de bexiga músculo-invasivos.

Um dos fatores alarmantes sobre o câncer de bexiga músculo-invasivo é seu grande potencial de evolução a tumor metastático. Aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com MIBC desenvolvem doença metastática após 2 anos, mesmo após cistectomia radical, o que se relaciona a uma sobrevida de aproximadamente 5% em 5 anos (LOBO et al, 2017; SAGINALA et al., 2020). Apesar da terapia à base de platina combinada, neoadjuvante a esse procedimento, apresentar significante melhora na sobrevida dos pacientes com tumores de alto grau, ela ainda é subutilizada na prática clínica (YIN et al., 2016). Assim, o objetivo da quimioterapia neoadjuvante é o tratamento de micrometástases que podem estar presentes no momento do diagnóstico (LOBO et al., 2017). Os dois regimes terapêuticos mais utilizados são o M-VAC e o CG, e são recomendados pelas diretrizes da *American Urological Association*, *European Association of Urology* e pelas Diretrizes Oncológicas brasileira para o tratamento neoadjuvante de carcinomas de bexiga músculo-invasivos (estádios II a IV, ou seja, com invasão da musculatura da bexiga, do tecido perivesical ou de estruturas adjacentes) (EAU GUIDELINES, 2021; CHANG, et al., 2017, MEDEIROS, et al., 2018).

Uma desvantagem encontrada no tratamento do tumor de bexiga é a alta toxicidade dos fármacos à base de platina. Dentre os principais efeitos tóxicos da terapia M-VAC destacam-se a supressão medular, náuseas, vômitos e estomatite. A GC é uma alternativa ao M-VAC, apresentando eficácia comparável e efeitos tóxicos mais brandos (ARAI et al., 2018). Sessenta e dois por cento dos pacientes tratados com o regime M-VAC apresentam efeitos adversos como neutropenia, anemia, trombocitopenia, náuseas /vômitos, mucosite e neutropenia febril. O tratamento com CG demonstrou redução significativa na neutropenia e mucosite, mas aumento no risco de trombocitopenia quando comparado ao tratamento com M-VAC (YU et al., 2018). Um grande estudo de fase III que comparou a eficácia e segurança de seis ciclos de regime M-VAC dose-densa com quatro doses de regime CG, encontrou que o braço ddM-VAC apresentou maior toxicidade gastrointestinal, anemia e astenia, porém uma discreta maior resposta patológica completa quando comparado ao braço CG (PFISTER et al., 2021).

A gencitabina, quimioterápico utilizado no protocolo CG, é um pró-fármaco análogo de nucleosídeo que deve ser metabolizado a sua forma ativa, o trifosfato de gencitabina (dFdCTP). Este quimioterápico exerce seu efeito antitumoral através da inibição da síntese de DNA que pode acontecer por: inibição fraca da DNA-polimerase, depleção das reservas de desoxirribonucleotídeos pela inibição estequiométrica da Ribonucleotídeo Redutase e interrupção da fita de DNA pela sua incorporação resistente ao reparo. Dentre seus efeitos tóxicos mais pronunciados estão a mielossupressão e hepatotoxicidade (BRUNTON, 2019).

Recentemente, estudos biomoleculares aumentaram o entendimento sobre o câncer de bexiga, permitindo a identificação de novos alvos tanto para seu tratamento quanto para sua estratificação, prognóstico e previsão de resposta ao tratamento (LOBO et al., 2017). Avanços nas tecnologias de sequenciamento genômico e transcriptômico revelaram que 85% do genoma humano é transcrito, apesar de uma parcela muito pequena de RNA ser traduzida em produtos proteicos. Isso sugere que a maioria do RNA transcrito é não codificante, podendo possuir papéis biológicos muito diversificados. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são classificados com base em seu tamanho em RNAs curtos, com menos de 200 nucleotídeos (miRNAs, snRNAs, snoRNAs, siRNAs, piRNAs e circRNAs), e em RNAs longos, com 200 nucleotídeos ou mais (FANG, FULLWOOD, 2016).

Estudos recentes vêm buscando elucidar a funcionalidade dos RNAs longos não codificantes (lncRNAs). Yao e colaboradores (2019) demonstraram que eles apresentam ações nucleares e citoplasmáticas, além de envolvimento em processos de regulação gênica, desde a organização da cromatina até regulação transcricional via mecanismos epigenéticos, em diferentes contextos celulares e processos biológicos. Essas moléculas possuem padrão de expressão espaço-temporal, tecidual e relacionado a tipos e linhagens celulares altamente específico (JARROUX et al., 2017). A classificação dos lncRNAs podem ser referentes à sua posição em relação a genes, em intergênicos (não se sobrepõem à transcritos de genes codificantes), intrônicos sense (com sítio de início de transcrição em íntrons e terminando antes de éxons), antisense (localizados dentro dos éxons e transcritos na direção oposta) ou bidirecionais (com sítio de início de transcrição antisense, mas geralmente localizados em até 1 kb da região promotora de uma porção codificante do mRNA) (AHADI, 2021).

Vários modelos de ação são propostos para os lncRNAs, tais como: sinalizadores, “isca”, “scaffold”, guia e RNAs potencializadores (FANG, FULLWOOD, 2017; CAO et al., 2021). Os lncRNAs sinalizadores regulam a expressão espaço-temporal dos genes alvo; os lncRNAs com função de “scaffold” atuam como adaptadores em complexos proteicos funcionais; os lncRNA guias ligam-se a proteínas específicas e conduzem a localização do complexo; os lncRNAs “iscas” impedem a ligação de outros RNAs ou de proteínas aos seus alvos (AHADI, 2021).

Durante muito tempo, os lncRNAs foram considerados “lixos transcricionais” devido a sua baixa expressão e ao desconhecimento de suas ações intracelulares (JARROUX et al., 2017). Nos últimos 10 anos, as publicações sobre os lncRNAs vêm aumentando expressivamente, demonstrando a relevância deste tema (Figura 1).

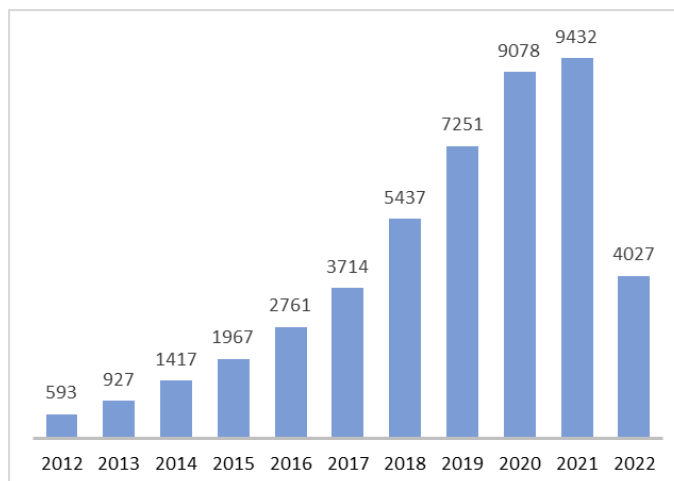


Figura 1: Número de artigos sobre lncRNAs publicados nos últimos 10 anos. Pesquisa realizada com o termo “lncRNA” na base de dados PubMed em junho/2022.

Dentre os processos fisiológicos nos quais os lncRNAs estão envolvidos ressaltam-se o desenvolvimento embrionário, a proliferação celular e a carcinogênese. Nesses processos, eles atuam ativando e inibindo a expressão de genes através da modelação da cromatina, causando modificações na transdução de sinal e alterações pós-traducionais (AHADI, 2021; FANG, FULLWOOD, 2016). Por exemplo, os lncRNAs podem atuar como ceRNAs (competing endogenous RNAs), interagindo com miRNAs por complementaridade, afetando sua ligação e função silenciadora de genes alvo, ou podem ativar regiões promotoras dos miRNAs, levando à sua superexpressão (GAO et al., 2020; XUAN et al., 2019). Diversos estudos demonstram que há uma regulação anormal de lncRNAs em vários tumores malignos e que eles desempenham um papel importante na carcinogênese, tanto com funções de oncogenes quanto de supressores tumorais (PORTEN, 2018).

No câncer de bexiga, além da heterogeneidade tumoral a níveis de subtipos, morfologia celular, expressão e mutações genéticas, a resistência aos quimioterápicos mais utilizados se configura como uma grande dificuldade à terapia (MEEKS et al., 2020). Os lncRNAs já foram associados à resistência das células tumorais a certos quimioterápicos por diversos mecanismos, como regulação de vias de sinalização de proliferação celular, pela melhoria dos mecanismos de reparo do DNA, modulação do ciclo celular, resistência à apoptose e, possivelmente, através dos mecanismos celulares de efluxo de drogas ou interferindo no metabolismo destas (NIKOLAOU, et al., 2018). O lncRNA *GHET1*, que se encontra superexpresso em carcinoma de bexiga, está envolvido na resistência de células tumorais à gencitabina ao regular positivamente a expressão de MRP1 (membro da superfamília de transportadores ABC, relacionada ao efluxo de drogas). Também observou-se um padrão de resistência à gencitabina

dose-dependente da superexpressão do lncRNA *FOXD2-AS1* em células de tumor de bexiga, sendo este mecanismo via regulação dos níveis de *ABCC3* e indução de genes relacionados à resistência a drogas. O lncRNA *CDKN2B-AS*, também superexpresso em câncer de bexiga, induz a resistência à gencitabina por ativação da via de sinalização WNT (ZANGOUEI et al., 2020).

Um dos lncRNAs mais conhecidos e estudados é o *UCA1* (Urothelial Cancer Associated 1), que se encontra superexpresso em uma gama de células e tecidos cancerígenos, tendo papel importante no crescimento tumoral, apoptose, invasão tumoral, resistência a quimioterápicos e metabolismo celular. Esse lncRNA possui forte relação com o câncer urotelial por sua interferência com diferentes genes e biomoléculas. No câncer de bexiga, o *UCA1* reprime o miR-143, que possui função supressora tumoral, levando a uma regulação aumentada da transição epitelial-mesenquimal (EMT), que resulta em invasão tumoral. Além disso, ele promove proliferação celular nas linhagens tumorais 5637 e T24 através do aumento da expressão do gene 7, que está relacionado à autofagia (*ATG7*). Em relação a resistência quimioterápica, o *UCA1* esteve relacionado com a diminuição da sensibilidade ao tratamento com cisplatina e gencitabina por meio da ativação de CREB por p-PKB e posterior aumento do miR-196a-5p na linhagem celular 5637 (XUAN et al., 2019; PAN et al., 2016).

Uma revisão sistemática encontrou vários lncRNAs superexpressos no câncer de bexiga que se associaram ao grau do tumor: *SPRY4-IT1*, *UBC1*, *ASAP1-IT1*, *PANDAR*, *ZEB1-AS1*, *ROR*, *MIT31HG*, *SUMO1P3*, *ABHD11-AS1*, *AATBC*, *CCAT2* e *HIF1A-AS2*. Todos, exceto *UBC1*, se relacionaram com o estágio do tumor. Além disso, os lncRNAs *SPRY4-IT1*, *UBC1* e *ROR* estão associados com metástase para os linfonodos adjacentes (QUAN et al., 2018). Outro lncRNA que se encontra superexpresso em câncer de bexiga é o *MALAT1* (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), cuja superexpressão é associada com estágio e grau histológico mais avançados de tumores de bexiga, além da metástase para os linfonodos. Sua relação com a progressão do carcinoma de bexiga é possivelmente através da supressão do miR-125b e ativação de genes alvo através do eixo “MALAT1-miR-125b-Bcl-2 / MMP-13” (CAO et al., 2020). Além disso, Liu e colaboradores (2019) demonstraram que, por meio da regulação de miR-101-3p, o lncRNA *MALAT1* se relaciona à resistência de células de carcinoma de bexiga à cisplatina. Isso demonstra que os lncRNAs podem ser importantes biomarcadores e ferramentas úteis para o estadiamento, prognóstico, avaliação de resposta à terapia e possíveis alvos terapêuticos para o tratamento do câncer de bexiga.

RNAs longos não codificantes também podem se envolver na carcinogênese ao participarem de processos relacionados à angiogênese via mecanismos inflamatórios. A histona

demetilase *JHDM1D* (também conhecida como KDM7A) se encontra superexpressa em células tumorais sob estresse nutricional, e se relaciona à supressão do crescimento do tumor por meio da diminuição da regulação de fatores pró-angiogênicos (OSAWA et al., 2011). Entretanto, um transcrito antisense desse gene, o lncRNA *JHDM1D-AS1*, também se encontra superexpresso em células e tecidos tumorais sob estresse nutricional, porém se relaciona ao crescimento tumoral ao estimular a angiogênese via ativação de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, ou seja, pode exercer ação sob o microambiente tumoral. Tanto *JHDM1D* quanto *JHDM1D-AS1* se encontram superexpressos em uma série de tumores (KONDO et al., 2017). Em células de tumor pancreático sob estresse nutricional, os níveis de *JHDM1D-AS1* se encontram elevados. Além disso, a análise de genes possivelmente modulados direta ou indiretamente por este lncRNA indica que ele e seus genes alvo se associam a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer, dentre eles, o carcinoma urotelial de bexiga (KONDO et al., 2017). A expressão aumentada de *JHDM1D-AS1* foi encontrada tanto em amostras clínicas quanto em linhagens celulares de câncer gástrico, e esteve associada à proliferação e migração celular, provavelmente através da regulação do eixo miR-450a-2-3p - PRAF2. Níveis aumentados de *JHDM1D-AS1* nesses tumores se associam a um maior grau e metástase linfonoidal (WU et al., 2021). Yao e colaboradores demonstraram que o lncRNA *JHDM1D-AS1* encontra-se superexpresso também em células e tecidos tumorais de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), associando-se à proliferação e invasão celulares nestes tumores, provavelmente através da interação com a proteína DHX15, que atua como oncogene em NSCLC. Os maiores níveis de *JHDM1D-AS1* nestes tumores também se associam a maior grau e metástase, além de menor sobrevida dos pacientes (YAO et al., 2019).

Além disso, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, ainda não publicados, investigaram a possibilidade de se utilizar a análise da expressão de genes e/ou lncRNAs como um marcador molecular para ajudar na diferenciação de tumores de bexiga de alto e baixo grau. Encontrou-se uma superexpressão significativa de *JHDM1D* em amostras clínicas de tumor de bexiga de alto grau quando comparado com amostras clínicas de tumor de baixo grau. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística, houve uma maior expressão do lncRNA *JHDM1D-AS1*, acompanhando o aumento da expressão de *JHDM1D*, em tumores de alto grau. Somando-se a isso, a análise combinada da expressão de *JHDM1D* e *JHDM1D-AS1* demonstrou um aumento do valor de predição do diagnóstico.

O banco de dados “The Atlas of non-coding RNA in Cancer (TANRIC)” mostra que existe uma relação entre o *JHDM1D-AS1* e o carcinoma urotelial de bexiga. Pode-se observar na Figura 2 que tecidos tumorais de alto grau apresentam uma maior expressão do lncRNA em

comparação aos tecidos tumorais de baixo grau, indicando que o *JHDMID-AS1* pode estar envolvido com a progressão do tumor de bexiga. Além disso, a Figura 3 mostra que indivíduos que expressam altos níveis de *JHDMID-AS1* apresentam uma menor taxa de sobrevida.

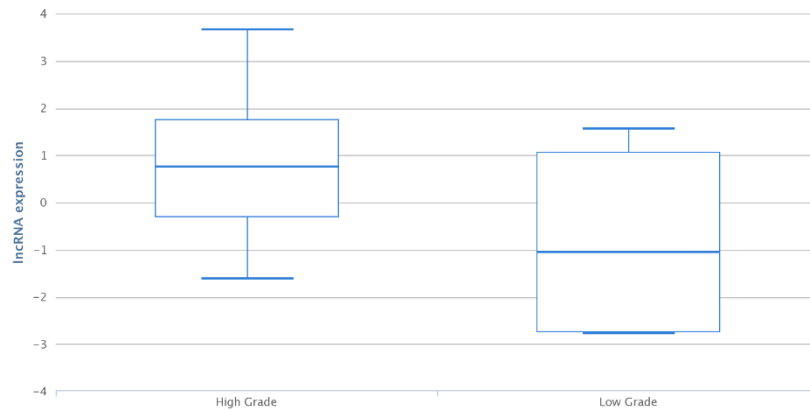


Figura 2: Relação entre a expressão de *JHDMID-AS1* e o grau tumoral de tecidos de carcinoma de bexiga. A diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,01824$) demonstra que a maior expressão de *JHDMID-AS1* está relacionada a tumores de maior grau (FONTE: The Atlas of non-coding RNA in Cancer - TANRIC).

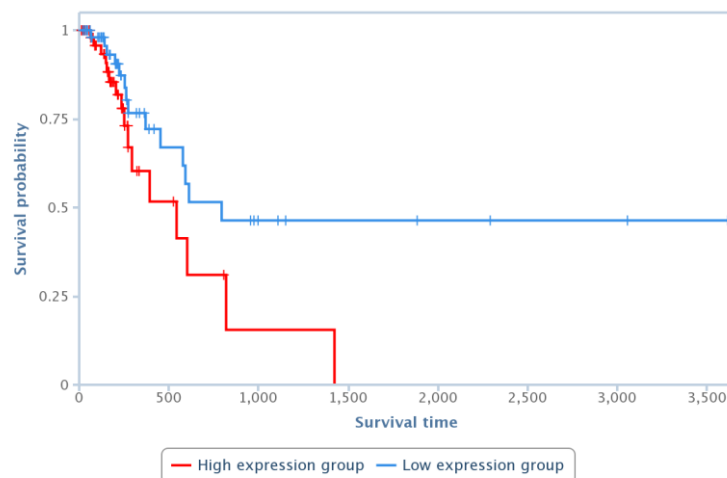


Figura 3: Relação entre a expressão de *JHDMID-AS1* e a probabilidade de sobrevivência de indivíduos com carcinoma urotelial de bexiga. A diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,048564$) demonstra que a maior expressão de *JHDMID-AS1* está relacionada a uma menor sobrevida dos pacientes (FONTE: The Atlas of non-coding RNA in Cancer - TANRIC).

O banco de dados “Cancer Cell Lines Encyclopedia (CCLE)” mostra que também há diferença na expressão do *JHDMID-AS1* em linhagens tumorais de bexiga com diferentes graus do tumor (Figura 4). A linhagem UM-UC-3 é derivada de carcinoma de tumor músculo-invasivo de células transicionais da bexiga. Apresenta uma mutação no códon 113 do éxon 4

(Phe (TTC) → Cys (TGC)) do gene TP53. A linhagem J82 é derivada de carcinoma de bexiga humano pouco diferenciado, invasivo (estágio T3) e com três mutações pontuais no gene *TP53* (duas no éxon 8 (códon 271: Glu (GAG) → Lys (AAG); códon 274 Val (GTT) → Phe (TTT)) e uma no éxon 9 (códon 320 Lys (AAG) → Asn (AAC)) (RIEGER, et al., 1995; O'TOOLE et al., 1978).

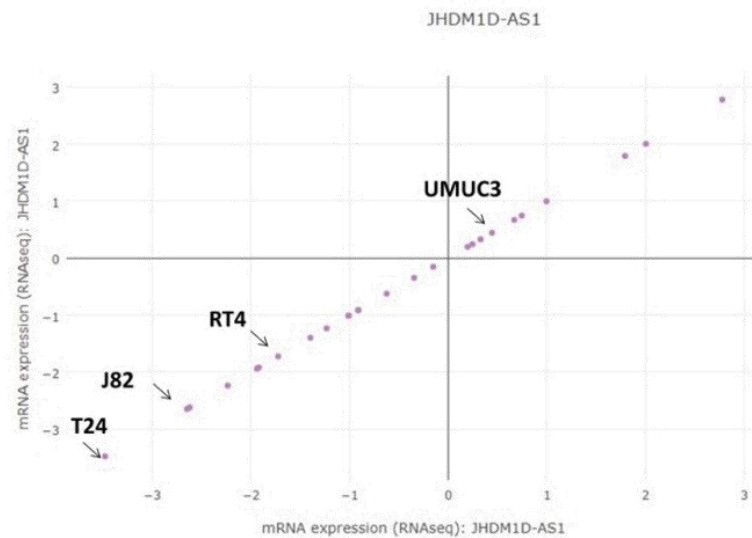


Figura 4: Expressão do lncRNAs *JHDM1D-AS1* em diferentes linhagens de tumor de bexiga, de acordo com o *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)*.

Apesar da expressão do lncRNA *JHDM1D-AS1* aparentar estar aumentada no câncer de bexiga e se associar a tumores de maior grau, ainda não há estudos que avaliem as ações deste lncRNA nesses tumores.

O *knockdown* (silenciamento) de lncRNAs tem sido estudado como uma estratégia terapêutica promissora para melhorar a eficácia dos regimes terapêuticos no tratamento de diversos tipos de câncer (GAO et al., 2019; VAN RHIJN et al., 2020). Através do *knockdown* é possível sugerir qual o papel funcional de um lncRNA no processo carcinogênico e identificar sua função na resistência quimioterápica. Nesse sentido, este trabalho objetiva gerar informações que possam contribuir para a elucidação do papel e da importância do *JHDM1D-AS1* no carcinoma urotelial de bexiga de alto grau e na modulação da sensibilidade à quimioterapia com gencitabina nesses tumores.

1.1 JUSTIFICATIVA

Evidências mostram que o lncRNA *JHDM1D-AS1* está superexpresso em tecidos e células de câncer de bexiga. Além disso, as alterações epigenéticas ocasionadas por RNAs longos não codificantes (lncRNA) mostram que eles estão estreitamente relacionados a processos carcinogênicos e de resistência à quimioterapia. No câncer de bexiga, não há estudos que demonstrem o papel funcional do *JHDM1D-AS1* na quimioterapia com gencitabina em células de carcinoma de bexiga de alto grau, justificando o desenvolvimento deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel funcional do lncRNA *JHDMID-ASI* na quimioterapia com gencitabina em células de carcinoma de bexiga de alto grau.

2.2 Objetivos específicos

- Silenciar o lncRNA *JHDMID-ASI* em células tumorais de bexiga concomitantemente ao tratamento com gencitabina;
- Avaliar o efeito do silenciamento do lncRNA *JHDMID-ASI* sobre a citotoxicidade da gencitabina;
- Estudar o efeito do silenciamento do lncRNA *JHDMID-ASI* e do tratamento com gencitabina sobre a formação de clones;
- Avaliar o efeito do silenciamento do lncRNA *JHDMID-ASI* e do tratamento com gencitabina sobre a morfologia celular;
- Analisar possíveis interferências na migração celular após o silenciamento do lncRNA *JHDMID-ASI* concomitante ao tratamento com gencitabina.
- Avaliar se o lncRNA *JHDMID-ASI* modula a sensibilidade de células de tumor de bexiga de alto grau ao tratamento com gencitabina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A gencitabina (Gemzar Eli Lilly do Brasil Ltda), o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio de cultura branco (DMEM sem vermelho de fenol), a penicilina G, a estreptomicina e a tripsina/EDTA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Anfotericina B foi adquirida de Cristália (Itapira, Brasil). O kit Cell Proliferation II (XTT) foi adquirido da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha). O kit para extração de RNA Quick-RNA™ MicroPrep Zymo-Spin™ IC Columns foi adquirido da Zymo Research (EUA). O kit High Capacity e os primers foram adquiridos da Applied Biosystems (Foster, Estados Unidos).

3.2 Linhagens celulares

Para conduzir o trabalho, duas linhagens celulares de carcinoma urotelial de bexiga humano foram utilizadas: i) J82, derivada de tumor de alto grau, músculo invasivo, com três mutações pontuais no gene *TP53* (duas no éxon 8 (códon 271: Glu (GAG) → Lys (AAG); códon 274 Val (GTT) → Phe (TTT)) e uma no éxon 9 (códon 320 Lys (AAG) → Asn (AAC)) e ii) UM-UC-3, derivada de tumor de alto grau, músculo invasivo, com uma mutação pontual em *TP53* (éxon 4, códon 113: Phe (TTG) → Cys (TCG)) (PANDEY et al., 2018; RIEGER, et al., 1995).

Para a realização dos ensaios, as duas linhagens celulares foram cultivadas em monocamadas usando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino e 100 U/mL de penicilina G, 100 U/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados com as células em crescimento exponencial.

3.3 Tratamento com gencitabina e *knockdown* do *JHDM1D-AS1*

A gencitabina foi solubilizada a uma concentração de 500 µM em água ultrapura e congelada em freezer -20 °C para ser usada posteriormente.

Para o silenciamento do *JHDMID-ASI*, as células foram transfectadas com *SMARTpool Lincode Human JHDMID-ASI* siRNA projetados contra *JHDMID-ASI* humano (Horison Discovery Ltda, EUA). Para a transfecção das células com siRNA, o reagente lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Life Technologies) foi utilizado seguindo o protocolo do fabricante. Paralelamente, células transfectadas com *lincode non-targeting control siRNAs* foram usadas como controle negativo. A capacidade do siRNA de inibir a expressão do gene alvo foi avaliada 72 horas após a transfecção, e o tempo de tratamento com siRNA foi definido em 48 horas.

3.4 Análise da expressão gênica

Para confirmar a expressão e o *knockdown* do RNA *JHDMID-ASI* nas células UM-UC-3 e J82, foi realizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Para isso, o RNA total foi extraído das células usando o kit Quick-RNA™ MicroPrep Zymo-Spin™ IC Columns e quantificado em NanoDrop®. A partir do RNA, foi confeccionado o cDNA, usando o kit High Capacity® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação quantitativa em tempo real foi realizada usando o corante SYBR green (Thermo Fisher Scientific). A normalização da expressão foi realizada utilizando-se o gene de referência GAPDH como controle endógeno.

3.5 Teste de citotoxicidade

A atividade citotóxica da gencitabina foi determinada pelo teste do XTT (Cell Proliferation Kit II from ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany), a fim de definir três ou quatro concentrações do fármaco, que foram combinadas com o siRNA. Para a realização do teste, $1,0 \times 10^4$ células J82 e UM-UC-3 foram semeadas e tratadas com gencitabina (0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 20 μM) por 24 horas. Paralelamente, células não tratadas foram utilizadas como controle. Após o tratamento, foi realizado o teste do XTT e a viabilidade celular foi calculada.

Para analisar a atividade citotóxica da gencitabina após o *knockdown* do lncRNA *JHDMID-ASI*, as células foram tratadas com 1 pmol de siRNA combinado a quatro diferentes concentrações de gencitabina, definidas anteriormente. Paralelamente, células não tratadas e células tratadas com um controle negativo de siRNA foram utilizadas.

O tratamento combinado, neste e nos experimentos subsequentes, seguiu os seguintes tempos: tratamento com siRNA por 48h → tratamento com gencitabina por 24h.

Para a realização do teste do XTT, imediatamente após o tratamento as células foram lavadas com solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,04 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 8 g de NaCl, 1 g de glicose e 1 L de água ultrapura) e incubadas em estufa com o sal tetrazólio XTT (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany) por 5 horas (ALMEIDA et al. 2019). Após a incubação, leu-se a absorvância do corante em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, sendo o resultado proporcional ao número de células viáveis. O teste foi realizado em triplicata técnica e o cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi realizado utilizando a equação descrita abaixo:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média das absorvâncias}}{\text{média das absorvâncias do controle}} \times 100$$

3.6 Teste de sobrevivência clonogênica

A fim de se avaliar os efeitos do tratamento a longo prazo, foi realizado o ensaio clonogênico. Para tal, as células foram semeadas em placas de 12 poços (3 x 10⁵ células/poço para as duas linhagens) e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com 10 pmol de siRNA específico para *JHDM1D-AS1*, e três concentrações diferentes de gencitabina definidas no ensaio de citotoxicidade. Paralelamente, células não tratadas e células tratadas com siRNA sem atividade foram utilizadas como controles. Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, recolhidas e semeadas novamente em placas de 12 poços na densidade de 1 x 10³ células por poço para cada linhagem e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, por aproximadamente 10 dias. Após o controle de células não tratadas atingir confluência máxima para experimento de colônia, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução de Hanks e fixadas com solução de formaldeído 4%, por 20 minutos. Após a fixação, as células foram hidratadas com metanol 100%, por 20 minutos, e coradas com solução de cristal violeta 0,5% dissolvido em metanol 25%. O corante foi retirado com solução de ácido acético 33%, e o conteúdo das placas foi transferido para uma placa de 96 poços, que foi levada para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (HUANG et al., 2018). O teste foi realizado em triplicata técnica e o resultado foi obtido através do cálculo abaixo:

$$\% \text{ de colônias} = \frac{\text{média das absorvâncias}}{\text{média das absorvâncias do controle}} \times 100$$

3.7 Morfologia celular

Para avaliar os efeitos da gencitabina sobre a morfologia celular após o *knockdown* do lncRNA JHDM1D-AS1, 2×10^5 células/poço das linhagens UM-UC-3 e J82 foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com 10 pmol de siRNA e as três diferentes concentrações de gencitabina definidas com base nos resultados de citotoxicidade. Após o tratamento, as células foram observadas e fotografadas em microscópio óptico com contraste de fase, no aumento de 200 vezes (DA SILVA et al., 2012). Células não tratadas e células tratadas com siRNA sem atividade foram utilizadas como controle.

3.8 Migração Celular

Para avaliar o efeito da gencitabina em células com o lncRNA *JHDM1D-AS1* silenciado, 4×10^5 células/poço das linhagens UM-UC-3 e J82 foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com 10 pmol de siRNA e três diferentes concentrações de gencitabina. Imediatamente após o tratamento, foi feita uma raspagem (arranhadura) suavemente com uma ponta de pipeta de 200 μL em linha reta, no centro do poço, para destacar apenas as células centrais (LIMA et al., 2020). Células não tratadas e células tratadas com siRNA sem atividade foram utilizadas como controle. A leitura foi realizada em microscópio óptico com luz invertida em aumento de 40 x e a capacidade de migração celular foi avaliada com auxílio do software ImageJ[®].

4 RESULTADOS

4.1 Atividade citotóxica do siRNA

A fim de se avaliar o tempo de tratamento e a atividade citotóxica do siRNA para o lncRNA *JHDM1D-AS1*, foi realizado o teste XTT.

Primeiramente, células J82 e UM-UC-3 foram transfectadas com *lincode non-targeting control siRNAs* (NO). Não foi observado qualquer efeito sobre a viabilidade das células, demonstrando que o agente de transfecção não é citotóxico (Figura 5).

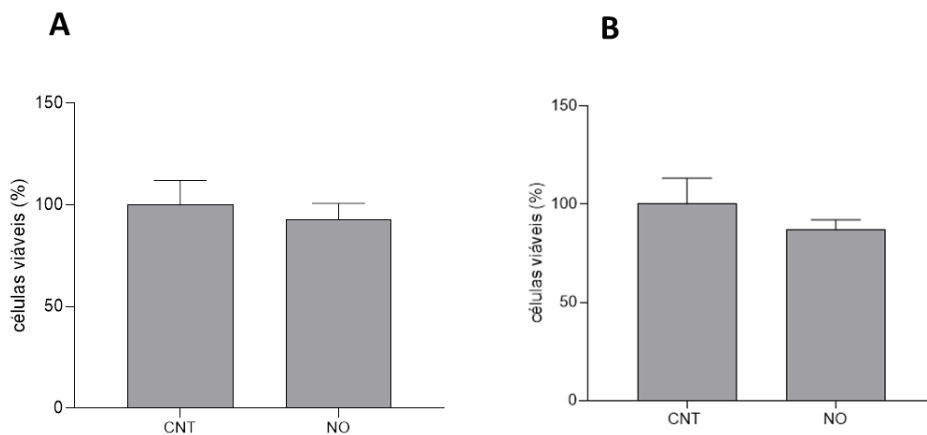


Figura 5 – Células J82 (A) e UM-UC-3 (B) transfectadas com *lincode non-targeting control siRNAs* foram usadas como controle negativo. CNT: Controle não tratado, NO: Células transfectadas com *lincode non-targeting control siRNAs*.

A atividade citotóxica do siRNA foi observada após 72 horas de tratamento (Figura 6). O tempo de tratamento com o inibidor de *JHDM1D-AS1* para os experimentos subsequentes foi definido em 48h, de modo que fosse possível avaliar os efeitos da gencitabina juntamente ao siRNA em uma quantidade significativa de células viáveis.

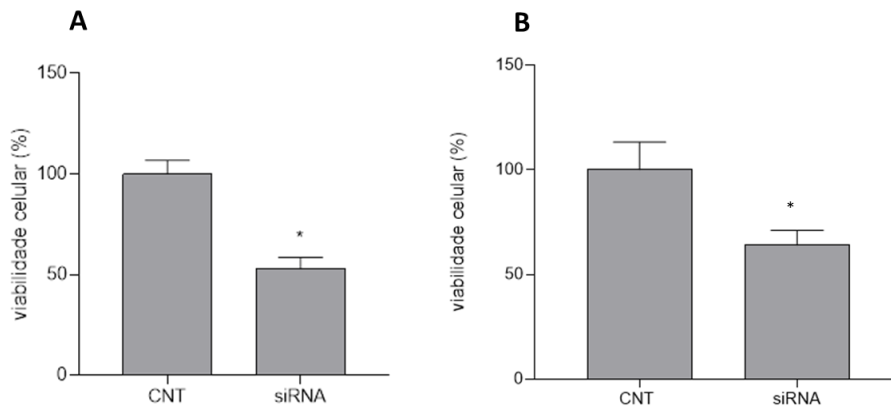


Figura 6 - Teste XTT mostrando diminuição da viabilidade celular nas duas linhagens após 72h de inibição com o siRNA. Porcentagem (escala linear) de células J82 (A) e UM-UC-3 (B) viáveis após tratamento com siRNA para o lncRNA *JHDMID-ASI*. CNT: Controle. * $p < 0,05$.

Os resultados obtidos através da RT-qPCR demonstraram a expressão de *JHDMID-ASI* nas células controles e comprovaram a inibição de sua expressão relativa após 72h do tratamento com siRNA nas duas linhagens, confirmando o *knockdown* (Figuras 7 (A) e 8 (A)). Além disso, através de fotomicrografias das células, observa-se que apenas o silenciamento de *JHDMID-ASI* foi suficiente para levar a alterações morfológicas e à diminuição da densidade celular tanto na linhagem J82 quanto em UM-UC-3 (Figuras 7 (B) e 8 (B)).

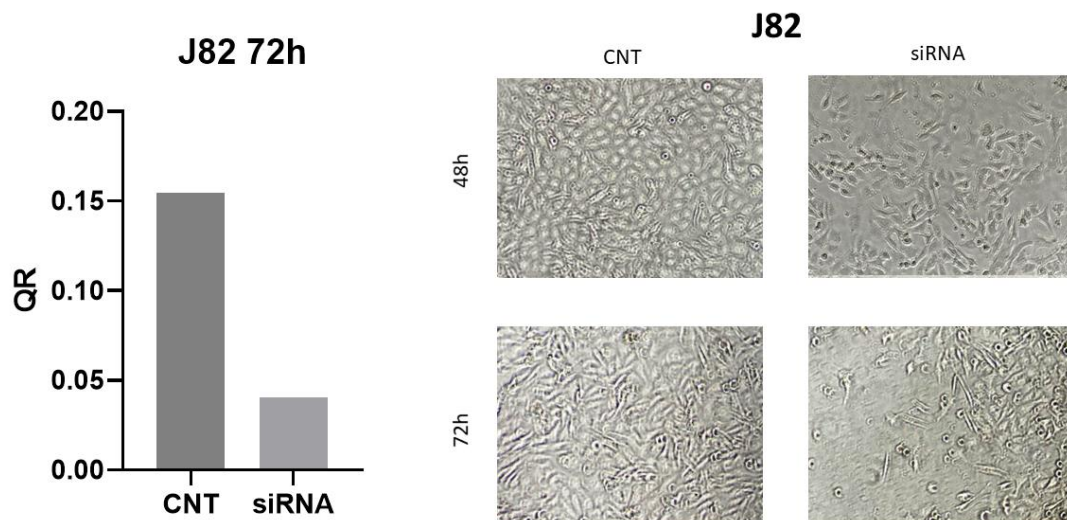


Figura 7 - (A) Expressão relativa do lncRNA *JHDMID-ASI* após 72h de tratamento com siRNA para *JHDMID-ASI* e (B) fotomicrografias das células após 48h e 72h de tratamento, ambas na linhagem celular J82.

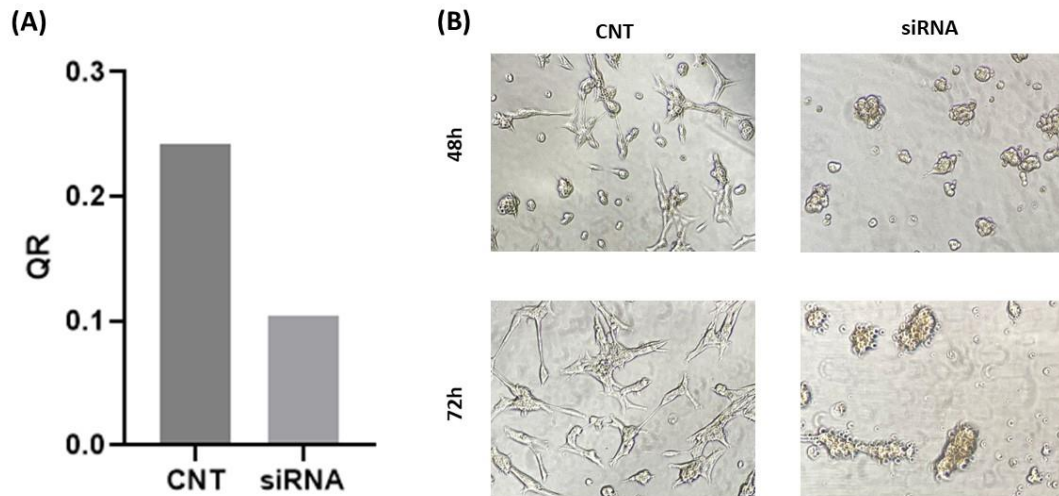


Figura 8 - (A) Expressão relativa do lncRNA *JHDMID-AS1* após 72h de tratamento com siRNA para *JHDMID-AS1* e (B) fotomicrografias das células após 48h e 72h de tratamento, ambas na linhagem celular UM-UC-3.

4.2 Atividade citotóxica das combinações de gencitabina e siRNA

Os resultados de citotoxicidade, avaliados através do teste XTT após os tratamentos com gencitabina isolada e combinada ao siRNA por 24h, são apresentados nas Figuras 9 e 10. Como observado anteriormente, tanto na linhagem J82 quanto em UM-UC-3, o silenciamento de *JHDMID-AS1* (siRNA para *JHDMID-AS1*) por si só levou à diminuição do número de células viáveis quando comparado ao controle. Na linhagem J82 (Figura 9), as duas primeiras combinações de gencitabina com o siRNA levaram à diminuição significativa da viabilidade celular quando comparadas com o composto isolado. Além disso, todas as combinações diminuíram significativamente a viabilidade celular quando comparadas com o grupo tratado apenas com siRNA para *JHDMID-AS1*.

Na linhagem UM-UC-3 (Figura 10) não foi observada diferença estatística no número de células viáveis entre os grupos tratados com as combinações de gencitabina + siRNA comparados com os grupos tratados com o composto sozinho ou com siRNA para *JHDMID-AS1*. A diminuição da viabilidade celular observada para o tratamento com siRNA sozinho se assemelha à encontrada para o tratamento com gencitabina e para o tratamento combinado.

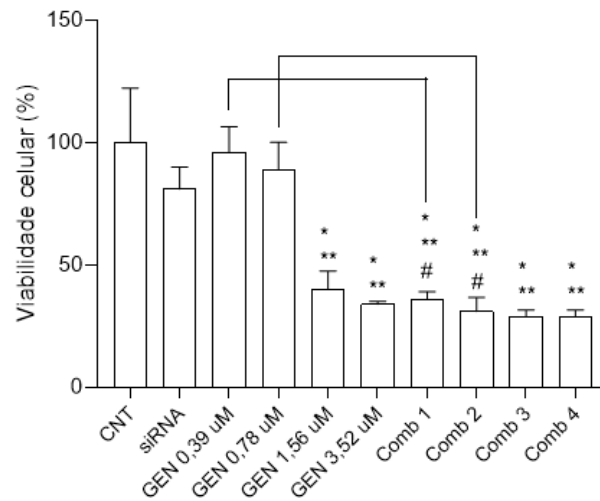


Figura 9 – Porcentagens (escala linear) de células J82 viáveis após tratamento de 24 h com gencitabina isolada ou em combinação com siRNA para o lncRNA *JHDMID-AS1*. O tratamento com o siRNA foi de 48 h. Gencitabina: Comb 1: 0,39 μM , Comb 2: 0,78 μM , Comb 3 1,56 μM e Comb 4: 3,52 μM . Cada ponto representa o valor médio obtido de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o CNT. ** $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com siRNA para *JHDMID-AS1*. # $p < 0,05$ comparado com a concentração do composto sozinho. CNT: Controle não tratado.

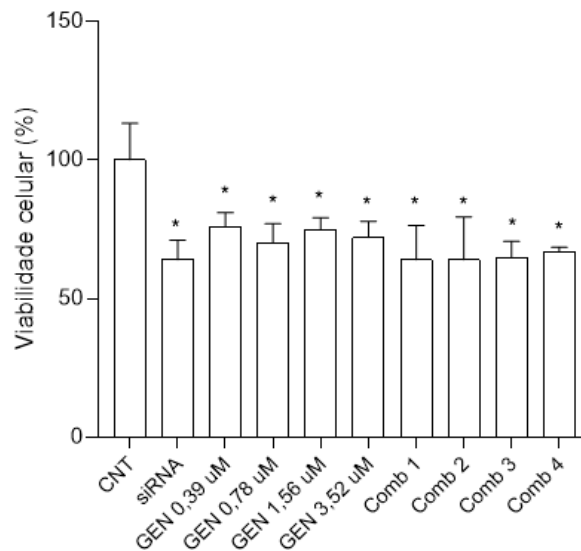


Figura 10 – Porcentagens (escala linear) de células UM-UC-3 viáveis após tratamento de 24 h com gencitabina isolada ou em combinação com siRNA para o lncRNA *JHDMID-AS1*. O tratamento com o siRNA foi de 48 h. Gencitabina: Comb1: 0,39 μM , Comb 2: 0,78 μM , Comb 3 1,56 μM e Comb 4: 3,52 μM . Cada ponto representa o valor médio obtido de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o CNT. CNT: Controle não tratado.

4.3 - Inibição da formação de clones (Sobrevivência Clonogênica)

Os resultados do teste de sobrevivência clonogênica para o tratamento com gencitabina isolada e combinada ao siRNA nas linhagens J82 e UM-UC-3 são apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Nas duas linhagens, o tratamento apenas com siRNA-*JHDMID-AS1* diminuiu significativamente a formação de clones quando comparado ao controle não tratado.

Nas células J82 (Figura 11), concentrações isoladas de gencitabina e combinadas ao siRNA levaram à diminuição na formação de clones quando comparadas ao CNT. Duas combinações de gencitabina com o siRNA levaram à diminuição da formação de clones quando comparadas com o composto isolado, e todas as combinações diminuíram o número de colônias formadas quando comparadas ao tratamento com siRNA.

Na linhagem UM-UC-3 (Figura 12), todas as concentrações e combinações de gencitabina diminuíram a formação de clones quando comparadas ao controle. Além disso, todas as combinações do composto com o siRNA levaram à diminuição significativa da formação de clones quando comparadas ao composto isolado e ao tratamento apenas com siRNA.

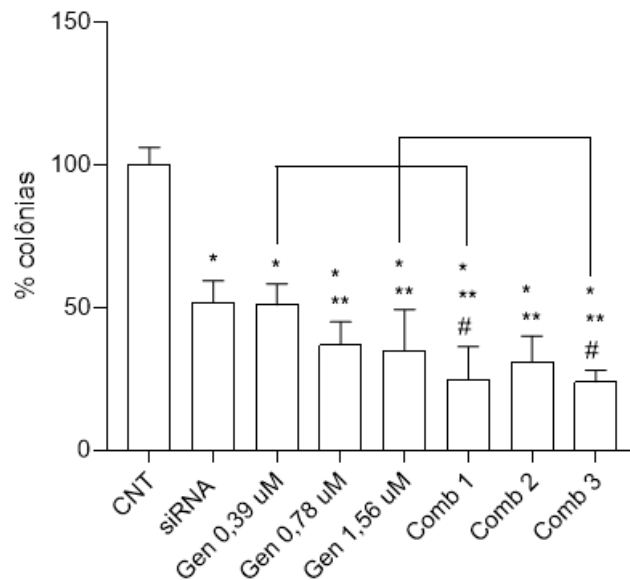


Figura 11 – Porcentagens (escala linear) de formação de colônias de células J82 após tratamento de 24 h com gencitabina isolada ou em combinação com o siRNA para o lncRNA *JHDMID-AS1*. O tratamento com o siRNA foi de 48 h. Gencitabina: Comb 1: 0,39 µM, Comb 2: 0,78 µM, Comb 3: 1,56. Cada ponto representa o valor médio obtido de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o CNT. ** $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com siRNA para *JHDMID-AS1*. # $p < 0,05$ comparado com a respectiva concentração do composto sozinho. CNT: Controle não tratado.

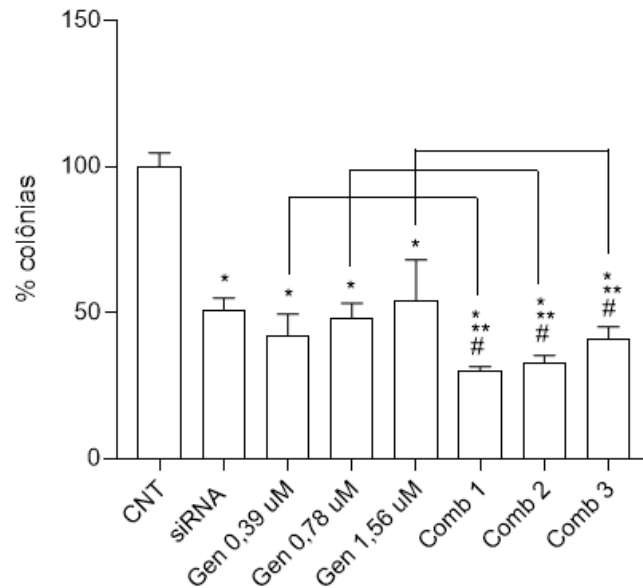


Figura 12 – Porcentagens (escala linear) de formação de colônias de células UM-UC-3 após tratamento de 24 h com gencitabina isolada ou em combinação com o siRNA para o lncRNA *JHDM1D-AS1*. O tratamento com o siRNA foi de 48 h. Gencitabina: Comb1: 0,39 μ M, Comb 2: 0,78 μ M, Comb 3: 1,56 μ M. Cada ponto representa o valor médio obtido de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o CNT. ** $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com siRNA para *JHDM1D-AS1*. # $p < 0,05$ comparado com a respectiva concentração do composto sozinho. CNT: Controle não tratado.

4.4 - Morfologia celular

As Figuras 13 e 14 mostram que os tratamentos com o siRNA isolado ou em combinação com as concentrações de gencitabina reduziram significativamente a densidade de células J82 e UM-UC-3 em comparação com células não tratadas. Além disso, as fotomicrografias de contraste de fase revelaram que as combinações (mais do que os compostos isoladamente) induziram mudanças na morfologia das células, que incluíram extensões celulares longas, aparência irregular, células arredondadas e células mortas.

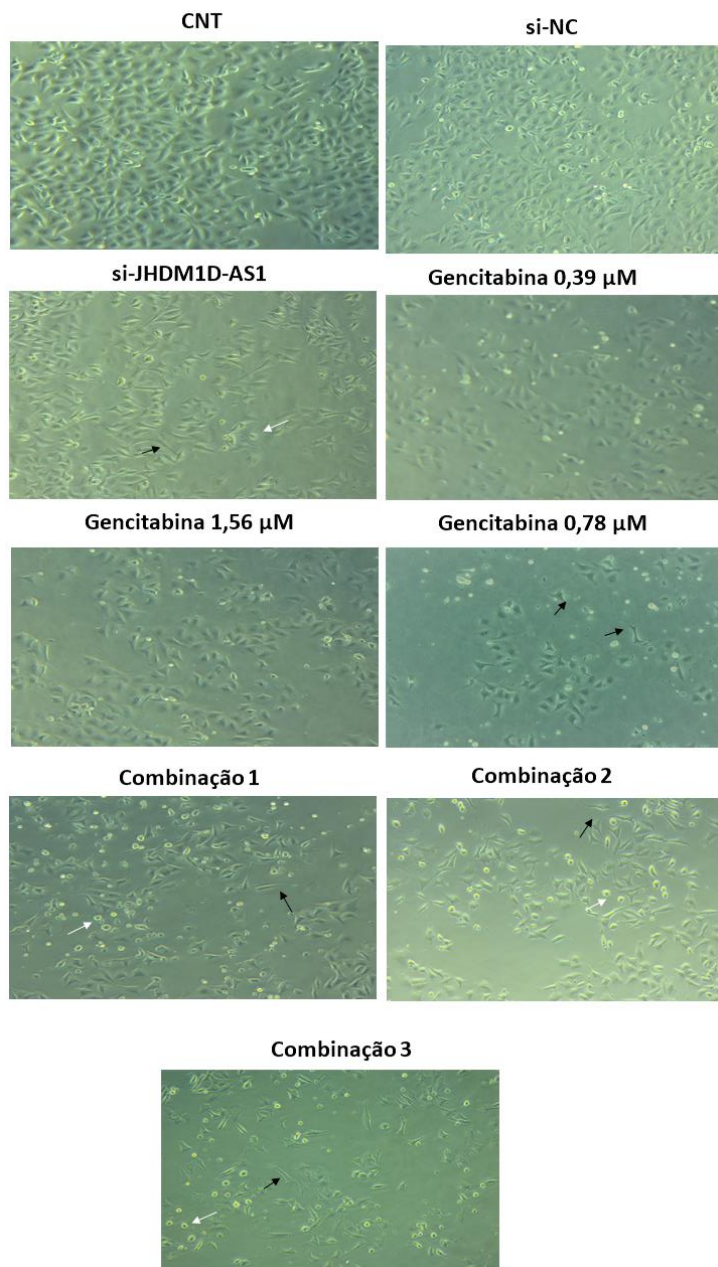


Figura 13 - Fotomicrografias de células J82 após tratamento de 24 h com a gencitabina isolada ou em combinação com siRNA para o lncRNA *JHDM1D-AS1*. Gencitabina: Comb 1: 0,39 µM, Comb 2: 0,78 µM, Comb 3: 1,56 µM. Setas pretas: células alongadas. Setas brancas: células arredondadas. Todos os grupos tratados: menor densidade celular. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento de 200x.

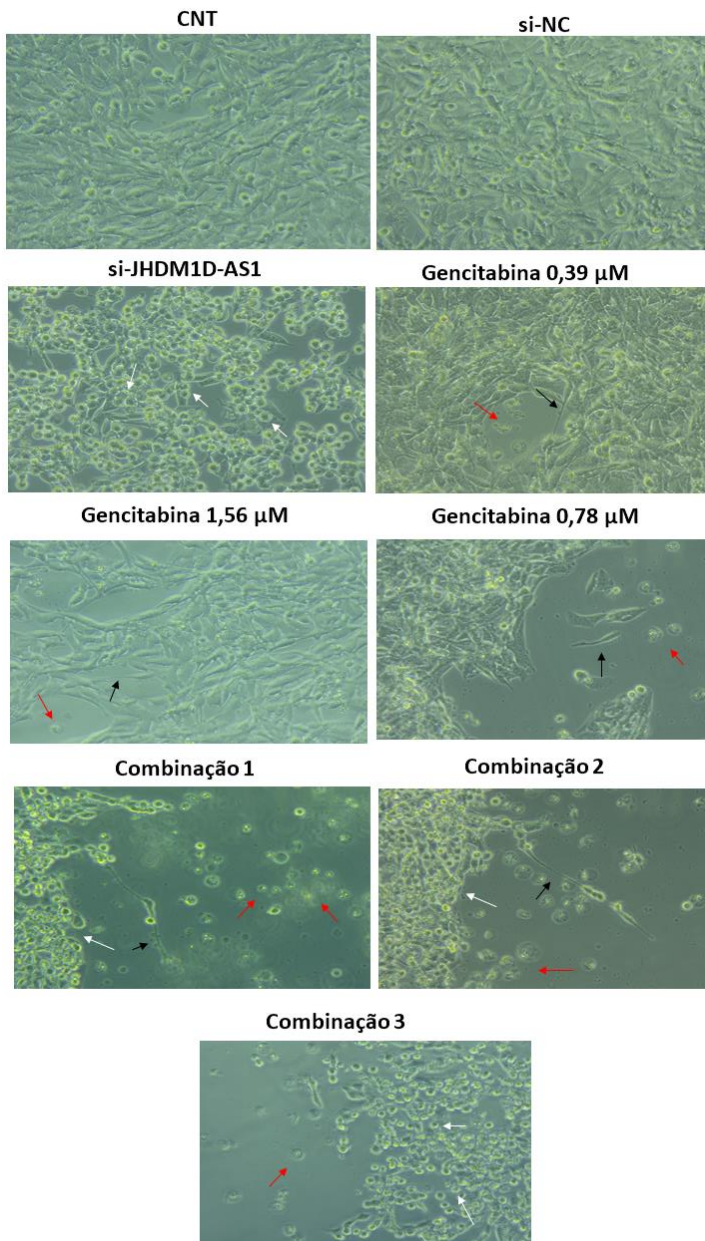


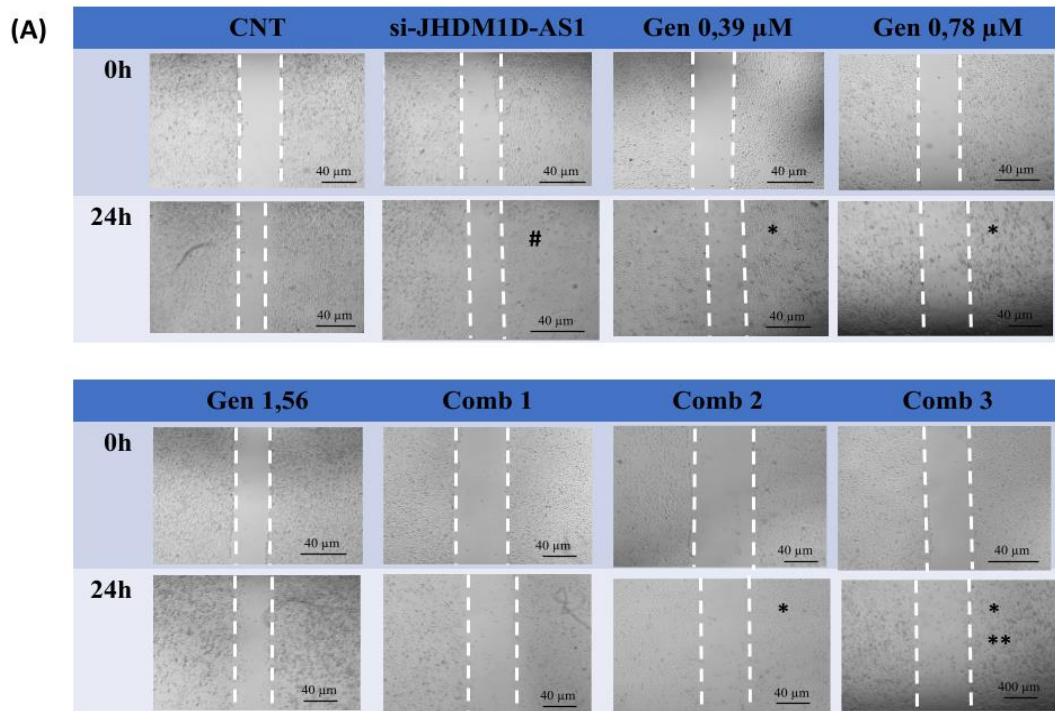
Figura 14 - Fotomicrografias de células UM-UC-3 após tratamento de 24 h com gencitabina isolada ou em combinação com siRNA para o lncRNA *JHDM1D-AS1*. Gencitabina: Comb 1: 0,39 μM , Comb 2: 0,78 μM , Comb 3: 1,56 μM . Setas pretas: células alongadas. Setas brancas: células arredondadas. Setas vermelhas: células mortas. Todos os grupos tratados: menor densidade celular. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento de 200x.

4.5 - Migração celular

Nos testes de migração celular (Figuras 16 e 17) foi possível observar que, após 24 e 48h de tratamento, o silenciamento de *JHDM1D-AS1* (siRNA) foi capaz de diminuir a migração para as duas linhagens testadas quando comparado ao CNT.

Após 24h de tratamento na linhagem J82, as duas maiores concentrações de gencitabina isolada ou em combinação com o inibidor diminuíram a migração celular quando comparadas ao siRNA e apenas a combinação com a maior concentração de gencitabina levou à diminuição significativa da capacidade migratória das células quando comparada ao composto isolado. Após 48h de tratamento, todas as combinações de gencitabina e siRNA-*JHDM1D-AS1* diminuíram a migração celular quando comparadas ao tratamento com siRNA e às suas respectivas concentrações de gencitabina isolada.

Na linhagem celular UM-UC-3, após 24h de tratamento, as duas maiores combinações de gencitabina diminuíram a migração celular quando comparadas ao siRNA, enquanto as duas primeiras levaram à diminuição significativa da migração celular quando comparadas ao composto isolado. Após 48h de tratamento, as três combinações de gencitabina com o inibidor afetaram a capacidade migratória das células quando comparada ao siRNA e aos tratamentos com o composto isolado.



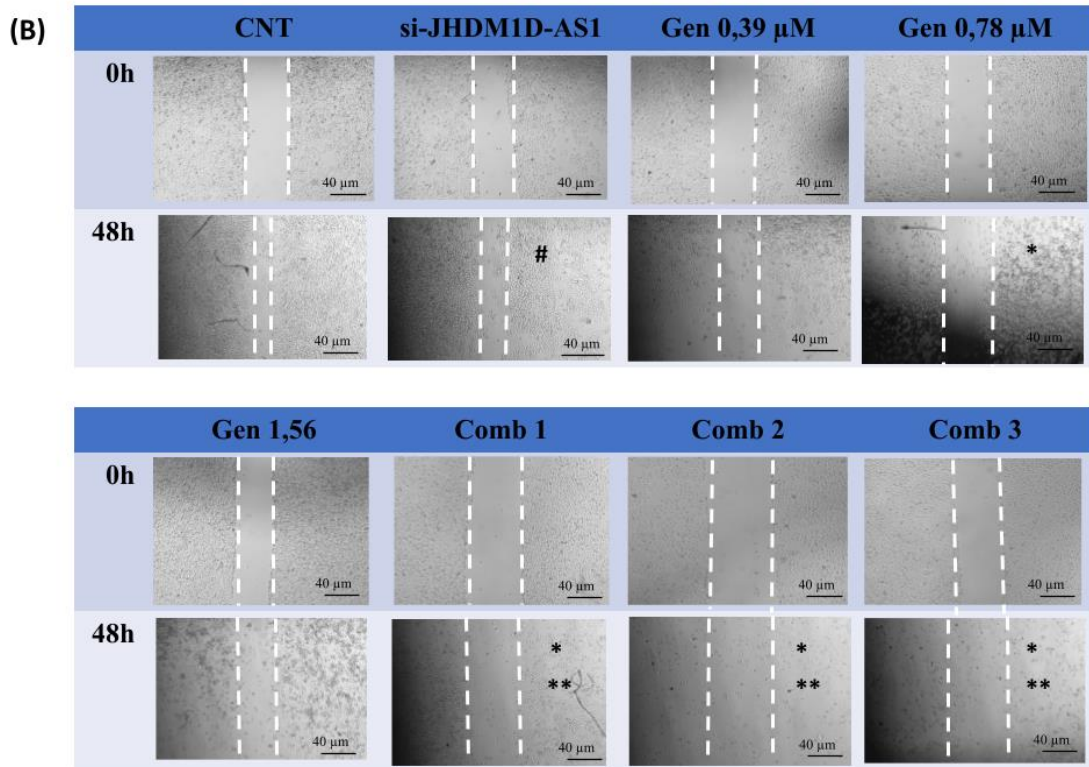


Figura 16: Fotomicrografias das fendas formadas na monocamada celular de células J82 antes e após o tratamento de 24h (A) e 48h (B) com siRNA-*JHDM1D-AS1* e gencitabina. # $p < 0,05$ comparado ao CNT. * $p < 0,05$ comparado ao siRNA. ** $p < 0,05$ comparado ao tratamento com as respectivas concentrações isoladas de gencitabina. CNT: controle de células não tratadas.

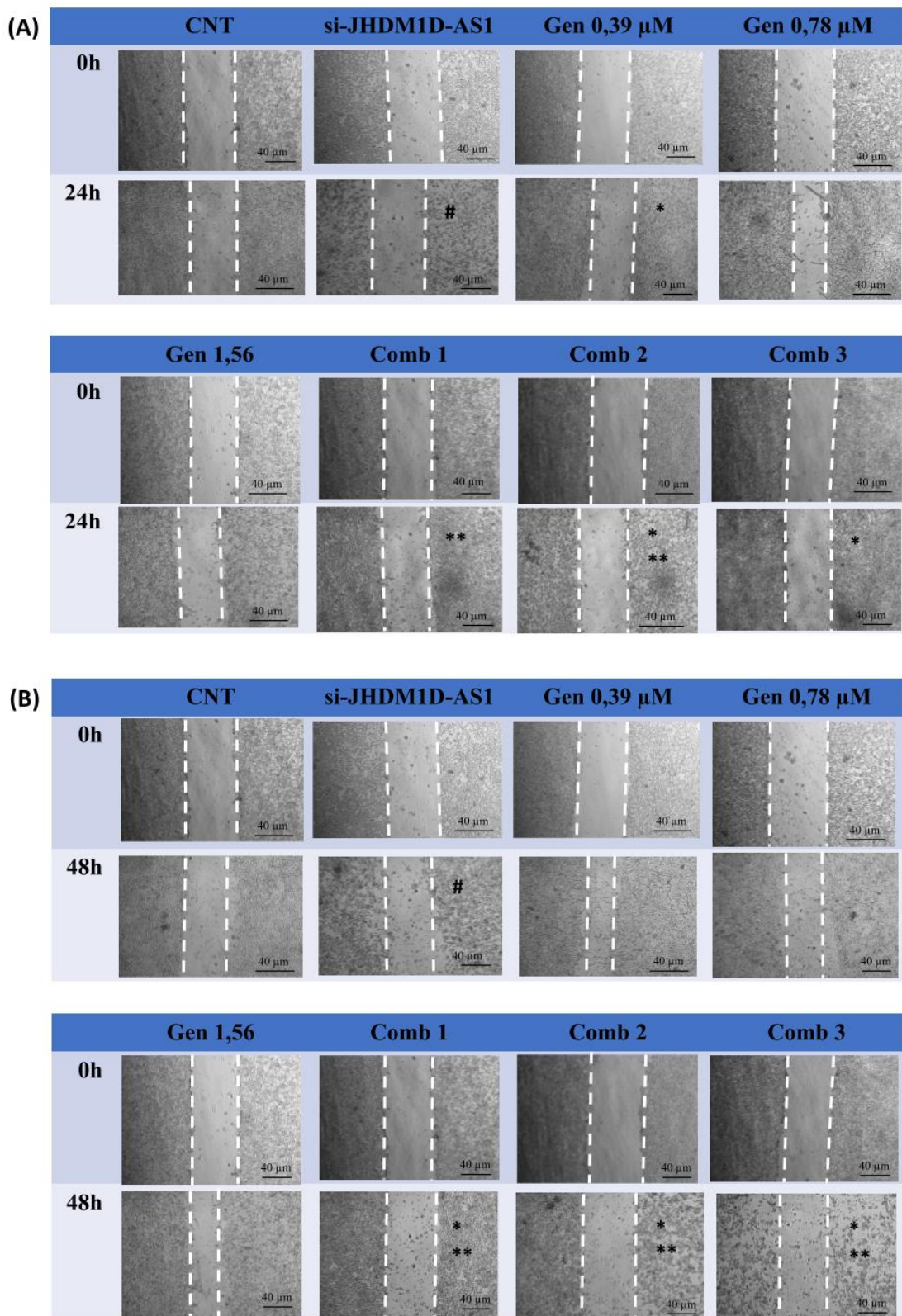


Figura 17: Fotomicrografias da migração celular através das fendas formadas na monocamada celular de células UM-UC-3 antes e após o tratamento de 24h (A) e 48h (B) com siRNA-*JHDM1D-AS1* e gencitabina. # $p < 0,05$ comparado ao CNT. * $p < 0,05$ comparado ao siRNA. ** $p < 0,05$ comparado ao tratamento com as respectivas concentrações isoladas de gencitabina. CNT: controle de células não tratadas.

5 DISCUSSÃO

RNAs longos não codificantes exercem papéis importantes na carcinogênese, progressão tumoral e resistência a quimioterápicos. Estudos demonstraram que o lncRNA *JHDMID-AS1* encontra-se superexpresso no adenocarcinoma pancreático e relaciona-se com a progressão do câncer gástrico e com o crescimento e metástase do câncer de pulmão de células não pequenas, podendo estar associado a um pior prognóstico nestes casos (KONDO, et al., 2017, WU, et al., 2021, YAO et al., 2019). Informações do banco de dados “The Atlas of non-coding RNA in Cancer (TANRIC)” demonstram a relação entre *JHDMID-AS1* e o carcinoma urotelial de bexiga, acrescentando que sua expressão se encontra aumentada em tumores de maior grau e relaciona-se a um pior prognóstico.

A resistência quimioterápica configura-se como um grande empecilho ao tratamento do câncer, diminuindo drasticamente a eficácia do tratamento e relacionando-se fortemente à progressão e recidiva tumoral (MALEK et al., 2014). Diversos estudos vêm demonstrando a influência de lncRNAs na modulação de vias celulares envolvidas na quimiorresistência, inclusive no câncer de bexiga, dentre eles os lncRNAs *UCA1*, *FOXD2-AS1* e *GHET1* (LIU et al., 2018; JIANG et al., 2020; PAN et al., 2016; AN et al., 2018; LI et al., 2019). Apesar de níveis aumentados do lncRNA *JHDMID-AS1* serem encontrados em células de câncer de bexiga, não há estudos que avaliem o papel deste lncRNA nestes tumores. Assim, avaliamos como o tratamento com o siRNA específico para *JHDMID-AS1* combinado a concentrações de gencitabina pode alterar a sensibilidade de linhagens celulares de tumor de bexiga de alto grau ao quimioterápico.

Inicialmente, o efeito da inibição da expressão de *JHDMID-AS1*, utilizando-se um siRNA, foi avaliado. O *knockdown* desse lncRNA esteve associado à diminuição do número de células viáveis, morte celular e diminuição da proliferação em células tumorais de bexiga.

Posteriormente, através do teste XTT, que avalia a citotoxicidade do tratamento a curto prazo, foram observadas que as combinações de gencitabina + siRNA diminuíram a viabilidade de células J82, mas não de células UM-UC-3 quando comparadas ao composto isolado. Adicionalmente, o ensaio de sobrevivência clonogênica foi realizado a fim de se determinar os efeitos a longo prazo do tratamento combinado do siRNA para *JHDMID-AS1* junto à gencitabina. A avaliação da formação de clones, ou seja, da capacidade reprodutiva das células, é um dos mais importantes testes para se avaliar o efeito de um quimioterápico sobre células tumorais, uma vez que células que perdem a capacidade de se dividirem e formarem colônias viáveis são consideradas mortas, ou seja, incapazes de proliferarem (TANNOCK, LEE, 2001;

MUNSHI et al., 2005). Tanto em J82 quanto em UM-UC-3, o *knockdown* de *JHDMID-ASI* levou à diminuição significativa da formação de clones, demonstrando o papel deste lncRNA sobre a progressão tumoral. Nas duas linhagens estudadas, as combinações de gencitabina com o siRNA para *JHDMID-ASI* levaram à diminuição da capacidade proliferativa das células quando comparadas ao composto isolado e ao tratamento apenas com o siRNA. Esses dados demonstram que o silenciamento de *JHDMID-ASI* aumentou a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia. Cabe ressaltar que, nas duas linhagens, o tratamento apenas com o siRNA ou com as combinações levou a uma redução da formação de colônias, maior que a redução na viabilidade celular observada através do teste XTT. Esses resultados mostram que o efeito do tratamento envolve mecanismos derivados de dano sustentado ao DNA, afetando a integridade reprodutiva das células. De fato, resultados prévios de Da Silva e colaboradores (2010) mostraram que, em linhagens celulares de câncer de bexiga, a gencitabina leva a efeitos genotóxicos, citostáticos (independentes do *status* de TP53) e à apoptose tardia em células com *TP53* mutado (DA SILVA et al., 2010; DA SILVA et al., 2010) que parecem mais pronunciados após a inibição do lncRNA. Entretanto, as vias celulares através das quais *JHDMID-ASI* aumenta a sensibilidade de células tumorais de bexiga aos efeitos citotóxicos e antiproliferativos da gencitabina ainda não são conhecidas.

Corroborando com os resultados anteriores, foram observadas alterações morfológicas sugestivas de perda de adesão e morte celular, tais como células com formas irregulares, arredondadas e presença de debris celulares, após o tratamento com siRNA-*JHDMID-ASI* e após o tratamento combinado de gencitabina + siRNA. Observou-se também diminuição da densidade celular. Essas alterações foram mais evidentes após o tratamento combinado quando comparado aos tratamentos com os compostos isolados.

A migração de células tem papel essencial na invasão e metástase de tumores, e pode ser avaliada através da observação da migração celular, após o tratamento, por uma fenda na monocamada de células (RIahi et al, 2102). A relação entre RNAs longos não codificantes e a metástase de células tumorais já foi relatada por DHAMIJA et al. (2016). Essas moléculas participam da modulação do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) e atuam sobre a invasividade e migração celular *in vitro*, além de modularem a regulação de genes relacionados à metástase (DHAMIJA, DIEDERICHS, 2016). Além disso, o lncRNA *JHDMID-ASI* já foi associado ao crescimento e metástase do câncer de pulmão de células não pequenas e à proliferação e migração de células de câncer gástrico (YAO et al., 2019; WU et al., 2021). No presente trabalho, o silenciamento de *JHDMID-ASI* levou à diminuição da migração celular nas duas linhagens quando comparado ao controle não tratado. Além disso, as

concentrações de gencitabina combinadas ao silenciamento de *JHDMID-ASI* levou à diminuição da migração celular quando comparada ao tratamento com gencitabina isolada ou com o siRNA nas duas linhagens, com efeitos mais pronunciados após 48h de tratamento. Desse modo, sugere-se que o lncRNA *JHDMID-ASI* se relaciona ao processo metastático e potencializa os efeitos antimigratórios da gencitabina em células de carcinoma de bexiga de alto grau.

6 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados demonstram que o RNA longo não codificante *JHDMID-ASI* está associado à proliferação e migração de células de tumor de bexiga de alto grau. Além disso, o silenciamento deste lncRNA junto a concentrações de gencitabina leva à maior citotoxicidade do tratamento, maiores taxas de morte celular e diminuição da capacidade de migração das células quando comparado ao tratamento com os compostos isolados. Desse modo, sugere-se que o silenciamento de *JHDMID-ASI* aumente a sensibilidade de células de tumor de bexiga de alto grau ao tratamento com gencitabina. A inibição desse lncRNA pode ser avaliada em estudos futuros como uma estratégia para se atingir uma resposta terapêutica eficaz utilizando uma menor concentração de gencitabina, para que haja diminuição de efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHADI, Alireza. Functional roles of lncRNAs in the pathogenesis and progression of cancer. **Genes & Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 424-437, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2020.04.009>.
- ALMEIDA, T. C. et al. Antiproliferative and toxicogenomic effects of resveratrol in bladder cancer cells with different TP53 status. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 60, n. 8, p.740-751, maio 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/em.22297>>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- AL-ZALABANI, Abdulmohsen H.; STEWART, Kelly F. J.; WESSELIUS, Anke; SCHOLS, Annemie M. W. J.; ZEEGERS, Maurice P.. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. **European Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 31, n. 9, p. 811-851, 21 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10654-016-0138-6>.
- ARAI, Satoko; HARA, Tomohiko; MATSUI, Yoshiyuki; KOIDO, Keiichi; HASHIMOTO, Hironobu; SHINODA, Yasuo; KOMIYAMA, Motokiyo; FUJIMOTO, Hiroyuki; TERAKADO, Hiroyuki. Tolerability and Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy with a Tri-Weekly Interval Methotrexate, Doxorubicin, Vinblastine, and Cisplatin Regimen for Patients with Locally Advanced Bladder Cancer. **Case Reports In Oncology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 450-460, 5 jul. 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000490458>.
- ATLAS OF GENETICS AND CYTOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY. **Bladder: Urothelial carcinomas**. 2010. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/bladID5001.html>. Acesso em: 25 jul. 2021.
- AUDENET, François; ATTALLA, Kyrollis; SFAKIANOS, John P.. The evolution of bladder cancer genomics: what have we learned and how can we use it?. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 313-320, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.02.017>.
- CAO, Yuepeng; TIAN, Tian; LI, Weijian; XU, Hanzi; ZHAN, Chuanfei; WU, Xuhong; WANG, Chao; WU, Xiaoli; WU, Wanke; ZHENG, Shuyun. Long non-coding RNA in bladder cancer. **Clinica Chimica Acta**, [S.L.], v. 503, p. 113-121, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.008>.
- CHANG, Sam S.; BOORJIAN, Stephen A.; CHOU, Roger; CLARK, Peter E.; DANESHMAND, Siamak; KONETY, Badrinath R.; PRUTHI, Raj; QUALE, Diane Z.; RITCH, Chad R.; SEIGNE, John D.. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: aua/suo guideline. **Journal Of Urology**, [S.L.], v. 196, n. 4, p. 1021-1029, out. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2016.06.049>.
- CHANG, Sam S.; BOORJIAN, Stephen A.; CHOU, Roger; CLARK, Peter E.; DANESHMAND, Siamak; KONETY, Badrinath R.; PRUTHI, Raj; QUALE, Diane Z.; RITCH, Chad R.; SEIGNE, John D.. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: aua/suo guideline. **Journal Of Urology**, [S.L.], v. 196, n. 4, p. 1021-1029, out. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2016.06.049>.

CHESTER, John D; HALL, Geoffrey D; FORSTER, Martin; PROTHEROE, Andrew s. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer – current controversies and future directions. **Cancer Treatment Reviews**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 343-358, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.12.005>.

CORDON-CARDO, Carlos; DALBAGNI, Guido; SAEZ, Guillermo T.; OLIVA, Maria R.; ZHANG, Zuo-Feng; ROSAI, Juan; REUTER, Victor E.; PELLICER, Angel. P53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 347-353, 1 fev. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910560309>.

DHAMIJA, Sonam; DIEDERICHS, Sven. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, emt and metastasis. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 139, n. 2, p. 269-280, 2 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.30039>.

EAU Guidelines. Arnhem, The Netherlands: EAU Guidelines Office, 2021. ISBN 978-94-92671-13-4. Disponível em: <http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/>

FANG, Yiwen; FULLWOOD, Melissa J.. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 42-54, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.006>.

FERLAY, Jacques; COLOMBET, Murielle; SOERJOMATARAM, Isabelle; PARKIN, Donald M.; PIÑEROS, Marion; ZNAOR, Ariana; BRAY, Freddie. Cancer statistics for the year 2020: an overview. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 149, n. 4, p. 778-789, 22 abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.33588>.

FETT-CONTE, Agnes C.; SALLES, Andréa B. C. F.. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 85-89, abr. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842002000200004>.

FREEDMAN, Neal D.. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. **Jama**, [S.L.], v. 306, n. 7, p. 737, 17 ago. 2011. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2011.1142>.

GAO, Fangyuan; FENG, Jing; YAO, Hairong; LI, Yanying; XI, Jie; YANG, Jun. LncRNA SBF2-AS1 promotes the progression of cervical cancer by regulating miR-361-5p/FOXM1 axis. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 776-782, 11 mar. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2019.1577883>.

GAO, Na; LI, Yueheng; LI, Jing; GAO, Zhengfan; YANG, Zhenzhen; LI, Yong; LIU, Hongtao; FAN, Tianli. Long Non-Coding RNAs: the regulatory mechanisms, research strategies, and future directions in cancers. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 10, 18 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.598817>.

HUANG, Yanjun; ZHOU, Sichun; HE, Caimei; DENG, Jun; TAO, Ting; SU, Qiongli; DARKO, Kwame Oteng; PENG, Mei; YANG, Xiaoping. Phenformin alone or combined with gefitinib inhibits bladder cancer via AMPK and EGFR pathways. **Cancer Communications**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 50, 27 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1186/s40880-018-0319-7>.

HUSSAIN, Turki O. Al; AKHTAR, Mohammed. Molecular Basis of Urinary Bladder Cancer. **Advances In Anatomic Pathology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 53-60, jan. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pap.0b013e31827bd0ec>.

JARROUX, Julien; MORILLON, Antonin; PINSKAYA, Marina. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, [S.L.], p. 1-46, 2017. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3_1.

KONDO, Ayano; NONAKA, Aya; SHIMAMURA, Teppei; YAMAMOTO, Shogo; YOSHIDA, Tetsuo; KODAMA, Tatsuhiko; ABURATANI, Hiroyuki; OSAWA, Tsuyoshi. Long Noncoding RNA JHDM1D-AS1 Promotes Tumor Growth by Regulating Angiogenesis in Response to Nutrient Starvation. *Molecular And Cellular Biology*, [S.L.], v. 37, n. 18, 15 set. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00125-17>.

L., B. L. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman. São Paulo: AMGH Editora LTDA, 2019. 9788580556155. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580556155/>. Acesso em: 27 jul. 2021.

LENIS, Andrew T; LEC, Patrick M; CHAMIE, Karim. Bladder Cancer: A Review. *Jama*, [S.L.], c. 324, n. 19, p. 1930, 17 nov. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.17598>.

LIMA, Ana Paula Braga; ALMEIDA, Tamires Cunha; BARROS, Tatiane Martins Barcelos; ROCHA, Lorrana Cachuite Mendes; GARCIA, Camila Carriao Machado; SILVA, Glenda Nicioli da. Toxicogenetic and antiproliferative effects of chrysin in urinary bladder cancer cells. *Mutagenesis*, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 361-371, 13 ago. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geaa021>.

LIU, Peihua; LI, Xiaozhou; CUI, Yu; CHEN, Jinbo; LI, Chao; LI, Qiaqia; LI, Huihuang; ZHANG, Xiangyang; ZU, Xiongbing. LncRNA-MALAT1 mediates cisplatin resistance via miR-101-3p/VEGF-C pathway in bladder cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, Shanghai, v. 11, n. 51, p. 1148-1157, 23 out. 2019. China Science Publishing & Media Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmz112>.

LOBO, Niyati; MOUNT, Chloe; OMAR, Kawa; NAIR, Rajesh; THURAIRAJA, Ramesh; KHAN, Muhammad Shamim. Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 565-574, 4 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2017.82>.

MEDEIROS, Rodrigo Bovolin de; CHAVES, Nayara Rosina; VILELA, Ricardo de Alencar; CRUZ, Diego Alves. Câncer de bexiga. In: DIRETRIZES ONCOLÓGICAS. *Diretrizes Oncológicas 2018*. 2. ed. S.L.: Doctor Press Científica, 2018. p. 367-376. Disponível em: https://diretrizesoncologicas.com.br/wp-content/uploads/2018/10/Diretrizes-oncol%C3%B3gicas-2_Parte25.pdf. Acesso em: 10 jul. 2021.

MEEKS, Joshua J.; AL-AHMADIE, Hikmat; FALTAS, Bishoy M.; TAYLOR, John A.; FLAIG, Thomas W.; DEGRAFF, David J.; CHRISTENSEN, Emil; WOOLBRIGHT, Benjamin L.; MCCONKEY, David J.; DYRSKJØT, Lars. Genomic heterogeneity in bladder cancer: challenges and possible solutions to improve outcomes. *Nature Reviews Urology*, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 259-270, 31 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41585-020-0304-1>.

MUSHTAQ, Jameel; THURAIRAJA, Ramesh; NAIR, Rajesh. Bladder cancer. *Surgery (Oxford)*, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 529-537, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.07.003>.

NIKOLAOU, Michail; PAVLOPOULOU, Athanasia; GEORGAKILAS, Alexandros G.; KYRODIMOS, Efthymios. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 309-318, abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10585-018-9903-0>.

OSAWA, Tsuyoshi; MURAMATSU, Masashi; WANG, Feng; TSUCHIDA, Rika; KODAMA, Tatsuhiko; MINAMI, Takashi; SHIBUYA, Masabumi. Increased expression of histone demethylase JHDM1D under nutrient starvation suppresses tumor growth via down-regulating angiogenesis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 51, p. 20725-20729, 5 dez. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1108462109>.

O'TOOLE, C; PRICE, Z H; OHNUKI, Y; UNSGAARD, B. Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 64-76, jul. 1978. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1978.164>.

PAN, Jingjing; LI, Xu; WU, Wenjing; XUE, Mei; HOU, Huilian; ZHAI, Wen; CHEN, Wei. Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 382, n. 1, p. 64-76, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.015>.

PANDEY, Sony; BOURN, Jennifer; CEKANOVA, Maria. Mutations of p53 decrease sensitivity to the anthracycline treatments in bladder cancer cells. **Oncotarget**, [S.L.], v. 9, n. 47, p. 28514-28531, 19 jun. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25530>.

PETITJEAN, A; ACHATZ, M I W; BORRESEN-DALE, A L; HAINAUT, P; OLIVIER, M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, [S.L.], v. 26, n. 15, p. 2157-2165, abr. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210302>.

PFISTER, Christian; GRAVIS, Gwenaelle; FLÉCHON, Aude; SOULIÉ, Michel; GUY, Laurent; LAGUERRE, Brigitte; MOTTET, Nicolas; JOLY, Florence; ALLORY, Yves; HARTER, Valentin. Randomized Phase III Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin, or Gemcitabine and Cisplatin as Perioperative Chemotherapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer. Analysis of the GETUG/AFU V05 VESPER Trial Secondary Endpoints: chemotherapy toxicity and pathological responses. **European Urology**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 214-221, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2020.08.024>.

PORTEN, Sima P.. Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. **Current Urology Reports**, [S.L.], v. 19, n. 12, 24 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11934-018-0861-5>.

QUAN, Jing; PAN, Xiang; ZHAO, Liwen; LI, Zuwei; DAI, Kangfu; YAN, Fangli; LIU, Suyue; MA, Hongfei; LAI, Yongqing. LncRNA as a diagnostic and prognostic biomarker in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotargets And Therapy**, [S.L.], v. 11, p. 6415-6424, out. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ott.s167853>.

RIAHI, Reza; YANG, Yongliang; ZHANG, Donna D.; WONG, Pak Kin. Advances in Wound-Healing Assays for Probing Collective Cell Migration. **Slas Technology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 59-65, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1177/2211068211426550>.

RIEGER, Km; LITTLE, Af; SWART, Jm; KASTRINAKIS, Wv; FITZGERALD, Jm; HESS, Dt; LIBERTINO, Ja; SUMMERHAYES, Ic. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 683-690, set. 1995. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1995.394>.

RODRIGUEZ, Roberto Hugo Martinez; RUEDA, Oscar Buisan; IBARZ, Luis. Tumor vesical: presente y futuro. **Medicina Clínica**, [S.L.], v. 149, n. 10, p. 449-455, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.06.009>.

SAGINALA, Kalyan; BARSOUK, Adam; ALURU, John Sukumar; RAWLA, Prashanth; PADALA, Sandeep Anand; BARSOUK, Alexander. Epidemiology of Bladder Cancer. **Medical Sciences**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 15, 13 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medsci8010015>.

SILVA, Glenda Nicioli da; CAMARGO, Elaine Aparecida de; SALVADORI, Daisy Maria Favero. Toxicogenomic activity of gemcitabine in two TP53-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 10373-10382, 9 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-1916-1>.

SILVA, Glenda Nicioli da; MARCONDES, João Paulo de Castro; CAMARGO, Elaine Aparecida de; PASSOS JÚNIOR, Geraldo Aleixo da Silva; SAKAMOTO-HOJO, Elza Tiemi; SALVADORI, Daisy Maria Fávero. Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 235, n. 7, p. 814-824, jul. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/ebm.2010.009322>.

THE UNIVERSITY OF TEXAS MD ANDERSON CANCER CENTER. The Atlas of non-coding RNA in Cancer (TANRIC). Disponível em: <<https://ibl.mdanderson.org/tanric/design/basic/main.html>>. Acesso em: 04 jul. 2021.

VAN RHIJN, Bas W.G.; MERTENS, Laura S.; MAYR, Roman; BOSTROM, Peter J.; REAL, Francisco X.; ZWARTHOFF, Ellen C.; BOORMANS, Joost L.; ABAS, Cheno; VAN LEENDERS, Geert J.L.H.; GÖTZ, Stefanie. FGFR3 Mutation Status and FGFR3 Expression in a Large Bladder Cancer Cohort Treated by Radical Cystectomy: implications for anti-fgfr3 treatment? . **European Urology**, [S.L.], v. 78, n. 5, p. 682-687, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2020.07.002>.

WU, Min; LIU, Yi; PU, Yan-Song; MA, Yu; WANG, Jian-Hua; LIU, En-Qi. JHDM1D-AS1 aggravates the development of gastric cancer through miR-450a-2-3p-PRAF2 axis. **Life Sciences**, [S.L.], v. 265, p. 118805, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118805>.

XUAN, Wei; YU, Hongyu; ZHANG, Xiaoling; SONG, Dandan. Crosstalk between the lncRNA UCA1 and microRNAs in cancer. **Febs Letters**, [S.L.], v. 593, n. 15, p. 1901-1914, 10 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.13470>.

YAO, Guodong; CHEN, Kexin; QIN, Yu; NIU, Yangyang; ZHANG, Xuefang; XU, Shidong; ZHANG, Chi; FENG, Meiyan; WANG, Kuan. Long Non-coding RNA JHDM1D-AS1 Interacts with DHX15 Protein to Enhance Non-Small-Cell Lung Cancer Growth and Metastasis. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S.L.], v. 18, p. 831-840, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2019.09.028>.

YAO, Run-Wen; WANG, Yang; CHEN, Ling-Ling. Cellular functions of long noncoding RNAs. **Nature Cell Biology**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 542-551, maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>.

YIN, Ming; JOSHI, Monika; MEIJER, Richard P.; GLANTZ, Michael; HOLDER, Sheldon; HARVEY, Harold A.; KAAG, Matthew; PUTTE, Elisabeth E. Fransen van de; HORENBLAS, Simon; DRABICK, Joseph J.. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: a systematic review and two :step meta :analysis. **The Oncologist**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 708-715, 6 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0440>.

YU, Cui; HEQUN, Chen; JINBO, Chen; FENG, Zeng; XIONGBING, Zu. Gemcitabine/cisplatin versus methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin for muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1260-1265, out. 2018. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.188434>.

ZANGOUEI, Amir Sadra; RAHIMI, Hamid Reza; MOJARRAD, Majid; MOGHBELI, Meysam. Non coding RNAs as the critical factors in chemo resistance of bladder tumor cells. **Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 15, n. 1, 12 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13000-020-01054-3>.

ZHANG, Xiaoying; ZHANG, Yangde. Bladder Cancer and Genetic Mutations. **Cell Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 65-69, 10 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-015-0574-z>.