

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 31/01/2022.

**CARCINOMA UROTELIAL: ESTUDO DE MODIFICAÇÕES PÓS-
TRANSCRICIONAIS E DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA**

ANDRÉ LUIZ VENTURA SÁVIO

BOTUCATU-SP
2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho” INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**CARCINOMA UROTELIAL: ESTUDO DE MODIFICAÇÕES PÓS-
TRANSCRICIONAIS E DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA**

ANDRÉ LUIZ VENTURA SÁVIO

Orientadora: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Co-orientador(a): Dra. Glenda Nicioli da Silva

Dr. Luiz Otavio F. Penalva

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Genética).

**BOTUCATU-SP
2019**

**“Faça o teu melhor, na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores, para
fazer melhor ainda” Mario Sérgio Cortella**

DEDICATÓRIA

A Deus

Aos meus queridos pais **Genivaldo Sávio** e **Vera Lúcia Ventura Sávio**, por serem exemplos de honestidade e caráter, por todo amor, orações e incentivo, por acreditarem e me fazerem acreditar na minha capacidade, pela compreensão pelos momentos de ausência e por não medirem esforços para que este sonho fosse concretizado. Vocês são os maiores mestres que tive e tenho em minha vida. Amo vocês!

A todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo, e a aqueles cujas amostras biológicas deram origem às linhagens celulares que utilizamos. Obrigado pela nobre atitude de doar um pouco de si em prol de outros pacientes.

“O pessimista vê dificuldades em todas as oportunidades. O otimista vê oportunidades em todas as dificuldades.” Winston Churchill

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori**, pela orientação e por acreditar em minha capacidade desde minha Iniciação Científica. Muito obrigado pelos conselhos, paciência e, principalmente, por me incentivar a buscar conhecimento e me tornar cada dia melhor. Obrigado por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava em minha capacidade. A “senhora” é, e sempre será, uma grande referência em minha vida.

Ao **Dr. Luiz Otávio Ferraz Penalva**, pela oportunidade em desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório na **UT Health San Antonio - USA**, e por acreditar e investir tempo em minha formação. Obrigado pelos momentos de discussão que enriqueceram minha formação e, principalmente, pela confiança durante minha estadia em San Antonio.

Vocês são referências de competência, profissionalismo e dedicação. Vocês foram fundamentais para a minha formação e crescimento profissional. Foi uma honra aprender e trabalhar com vocês.

**“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
em ombros de gigantes” Isaac Newton**

ACKNOWLEDGMENT

*I would like to thank **Mei Qiao** for all the assistance and patience during my time in the Penalva's laboratory. You are amazing! An example of a professional that I will carry throughout my life. I've learned a lot from you. I miss it!*

*Especially to **Suzanne Burns** (in memoriam), thanks for everything! Unfortunately, my coexistence with you was shorter than I expected. I still had a lot to learn from you. You were amazing! I will always have you in my heart. God protect you wherever you are. I miss you!!*

I would like to thank all Penalva's Lab members: Adam Kostli, Mitzli Velasco, Weijing Li and Cai Hong for the friendship and support.

感谢所有的朋友，感谢那些有趣的日子，感谢你们的支持，我想你们

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Pedro A. F. Galante** e toda sua equipe, obrigado pelas análises de bioinformática essenciais para o desenvolvimento desta Tese.

À **Dra. Glenda Nicioli da Silva**, pelo incentivo e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Dra. Kátia Ramos Moreira Leite** e ao **Dr. Renato Prado Costa** e toda equipe do Hospital Amaral Carvalho, pelo auxílio na obtenção das amostras biológicas.

À **Ana Laura Seneda**, por em tão pouco tempo demonstrar companheirismo e incentivo incondicional. Por acreditar e me fazer acreditar em minha capacidade. Obrigado por tudo!

Às minhas irmãs **Mariele Sávio** e **Aline Sávio**, ao meu cunhado **Caio Gianini**, e aos meus amados sobrinhos **Gabriel**, **Rafaela**, **Elis** e **Helena**, obrigado pelas palavras de incentivo, por estarem presentes em minha vida mesmo estando distantes. Vocês são a base de tudo. Muito obrigado!

Ao grande amigo/irmão que a pós-graduação me deu, **Fábio Henrique Fernandes** (extensivo à sua **Aline Vendrame Fernandes**). Obrigado por ser grande incentivador,

conselheiro e um verdadeiro irmão nessa estrada. Com certeza a caminhada teria sido muito mais difícil sem suas sábias palavras e paciência.

Aos meus amigos de San Antonio-TX, **Bruno, Stephanie, Alvaro, Renata, Luca, Fábio e Livia**. Vocês fizeram a diferença em minha vida. Obrigado por serem uma família a quilômetros de distância do Brasil. Muito obrigado pelo incentivo nos momentos de tristeza, angústia e alegria. Quando estava em San Antonio, sentia falta da família no Brasil, hoje, essa é mesma falta que sinto de vocês.

Aos amigos e colegas do **Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica: João Paulo de Castro Marcondes, Elaine Aparecida de Camargo, Kamila Sauer, Amanda Tanamashi, Juliana Lara, Tamara Gomes, Leonardo Menezes, Phillipe Franklin e Paulo Georgete** por todo companheirismo e apoio.

Ao querido amigo e professor **Pedro Pink** (*in memoriam*), um grande exemplo de mestre que tive desde o ensino médio e que me incentivou a aproveitar as oportunidades que surgissem, mesmo com medo e insegurança. Cada nova oportunidade que tenho me lembro de suas sábias palavras: “o trem passa com a porta aberta. Você pode escolher entrar e, no pior dos casos, voltar, ou, ainda, esperar pelo próximo que talvez nunca apareça”. Obrigado pela imensa contribuição em minha formação.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** (Proc. 2013/23279-0, BEPE 2016/05556-5, Auxílio Financeiro 2014/05386-7), ao **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa de estudo e apoio financeiro.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir” Augusto Cury

ÍNDICE

1. RESUMO	10
2. ABSTRACT	13
3. LISTA DE FIGURAS	15
4. LISTA DE TABELAS	19
5. LISTA DE SIGLAS	20
6. REVISÃO DA LITERATURA	23
6.1 Considerações gerais	23
6.2. Fatores epigenéticos associados à carcinogênese.....	27
6.2.1 Splicing alternativo de RNA mensageiro (mRNA)	27
6.2.2 RNAs longos não codificantes (lncRNA)	29
6.3 Proteínas de ligação ao RNA (RBPs) e câncer	31
7 - OBJETIVOS	34
7.1 Geral.....	34
7.2 Específicos	34
8. MANUSCRITO 1.....	35
GENOMIC ANALYSES OF UROTELIAL CARCINOMA SHOW RNA MEDIATED MECHANISMS AS NEW CONTRIBUTORS TO MALIGNANCY	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUCTION	37
MATERIAL AND METHODS.....	38
Human subjects	38
Tissue preparation and RNA isolation	39
Library preparation and sequencing	39
Expression and splicing analyses	39
Data Sources.....	39
Sequencing alignment and gene expression.....	39
Differential Expression Analysis	40
Alternative Splicing Analysis.....	40
Functional annotation.....	40
RESULTS	41
Novel mRNA expression markers in urothelial carcinoma	41
RNA processing revealed new candidate targets in urothelial carcinoma	44
DISCUSSION	47
FUNDING.....	50
COMPETING INTERESTS	50

REFERENCES	50
9. MANUSCRITO 2	57
Musashi-1 can promote bladder tumorigenesis by Wnt signaling pathway	57
ABSTRACT.....	58
1. INTRODUCTION	59
2. MATERIAL AND METHODS.....	61
2.1 TCGA data analysis	61
2.2 RBPs validation in human bladder cancer tissues.....	61
2.2.1 Tumor samples	61
2.2.2 Tissue preparation, RNA isolation and RTqPCR.....	61
2.3 <i>In vitro</i> functional assays	62
2.3.1 Cell growth, RBPs expression and transfection	62
2.3.2 Cell proliferation.....	62
2.3.3 Cell viability and caspases 3/7 activity assay	63
2.3.4 Colony formation assay	63
2.3.5 <i>In vitro</i> scratch assay	63
2.3.6 Migration and invasion – Boyden chamber.....	63
2.3.7 Treatment of MSI1 knockdown cells (KD) with cisplatin or ionizing radiation.....	64
2.3.8 RNA sequencing and analysis	65
2.3.9 Crooslinking immunoprecipitation (iCLIP)	65
2.3.10 Functional annotation	66
2.4 Cell treatment with luteolin and cisplatin or ionizing radiation	66
3. RESULTS	66
Several RBPs were aberrantly expressed in high grade bladder tumors	66
RBPs impacted on cancer relevant process.....	70
MSI1 oncogenic properties in high-grade bladder tumors	72
MSI1 knockdown affected gene expression.....	73
Musashi-1 targets were strongly associated with translation genes	76
Luteolin inhibited cell proliferation and increased sensitivity to cisplatin and radiation	77
4. DISCUSSION	78
RBPs are feasible molecular markers for high grade bladder tumors.....	78
Does <i>MSI1</i> behave as an oncogene in human urinary bladder carcinogenesis?	78
Musashi1 binding preferentially to 3'UTR and intronic region.....	80
Luteolin also impacts on cell proliferation and cancer therapeutic resistance	81
CONCLUSION.....	81
FUNDING.....	82
ACKNOWLEDGMENTS	82
COMPETING INTERESTS	82
REFERENCES	82

Supplementary figures	91
10. RESUMO DOS RESULTADOS	93
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
Quimiotaxia e epitélio mesenquimal de transição associados à progressão tumoral	94
Processamento do mRNA de proteínas ribossômicas e do RNA longo não codificador (lncRNA) GAS5 em tumores uroteliais de alto grau	96
Proteínas de ligação ao RNA envolvidas na carcinogênese urotelial	97
Musashi-1 como um novo candidato a biomarcador e alvo terapêutico em tumores uroteliais	97
Musashi-1 promove a carcinogênese urotelial por meio da via Wnt/ β -catenina	98
12. CONCLUSÃO	99
13. REFERÊNCIAS	100

1. RESUMO

O carcinoma urotelial representa um dos tipos mais comuns de neoplasias urinárias, apresentando altas taxas de recorrência, agressividade e progressão para doença músculo-invasiva. Devido à complexidade dos sistemas biológicos, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares responsáveis pelos carcinomas uroteliais. Nos últimos anos, a introdução de novas ferramentas de bioinformática permitiu identificar novas moléculas e mecanismos implicados na carcinogênese. Neste estudo foram feitas duas abordagens com o objetivo de identificar novos potenciais biomarcadores para tumores uroteliais de baixo e alto graus. Inicialmente, a partir de dados de sequenciamento de RNA, foram avaliados os níveis de expressão gênica e o perfil de *splicing* do mRNA em amostras tumorais obtidas do biorrepositório da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os dados mostraram que os tumores de baixo e alto graus, comparados com tecido saudável de bexiga, apresentavam alteração na expressão em genes da via do *TP53*, e de *splicing* de mRNA de genes relacionados a ciclo celular, adesão, migração e processamento do RNA. Os tumores de alto grau, comparados aos de baixo grau, apresentavam aumento da expressão de genes relacionados à quimiotaxia (*GREM1*, *S100A12*, *NR4A1*, *IL6*, *CCL20*, *CXCL8*, *S100A9*, *CXCL10*, *CXCL11* e *CCL7*) e a funções neuronais (*EPHB2*, *CNTNAP2*, *KCNQ3*, *TENM2*, *RDH12*, *DPF1*, *SHISA9*, *SLC30A3*, *MME* e *MSI1*). Além disso, foram identificadas, exclusivamente nos tumores de alto grau, modificações de *splicing* em fatores de transcrição (*GAS5*, *RPL10*, *RPL13A* e *RPL37A*), com potencial impacto na produção proteica. Na segunda abordagem, foi realizado estudo funcional referente ao papel das proteínas de ligação ao RNA (RBPs) na carcinogênese urotelial. Para isso, a partir de 405 casos de carcinomas uroteliais obtidos do *The Cancer Genome Atlas* - TCGA (384 alto e 21 baixo grau), foram mensurados os níveis de expressão de genes relacionados a 1.542 RBPs. No total, foram identificadas 236 RBPs com potencial atividade oncogênica nos tumores de alto grau, sendo 14 (*NOCT*, *CELF2*, *ENDOU*, *EXO1*, *EZH2*, *IFIT2*, *MOV10L1*, *MSI*, *PEG10*, *PTRF*, *TERT*,

TRIM71, *WARS* e *YBX2*) associadas a pior prognóstico, e selecionadas para o estudo funcional. A validação dos níveis de expressão dessas RBPs revelou que 8/14 (*EXO*, *EZH2*, *NOCT*, *TERT*, *MOV10L1*, *MSI1*, *WARS* e *YBX2*) também apresentavam níveis de expressão aumentados nas amostras tumorais obtidas do biorrepositório da FMUSP. A análise funcional em três linhagens celulares (UMUC3, T24 e J82) mostrou que o silenciamento de cada gene codificador das RBPs (total de 14) resultou na diminuição da proliferação e viabilidade celular, e no aumento das taxas de apoptose. Especialmente o silenciamento do gene *MSI1* (Musashi-1) mostrou forte impacto na viabilidade, proliferação, migração e invasão celular e apoptose, e também na diminuição da resistência celular a quimio e radioterapias (*in vitro*). Além disso, a análise de sequenciamento de mRNAs após o silenciamento do *MSI1*, evidenciou alterações na expressão de genes relacionados à diferenciação de células epiteliais, via Wnt e quimiotaxia. A análise, por CLIP (*Crooslinking Immunoprecipitation*) dos alvos da musashi-1 mostrou que esta preferencialmente se liga à região 3'UTR e a regiões intrônicas de mRNAs relacionados à tradução, processamento do RNA e às vias Wnt, TP53, PDGF e CCKR. Em conjunto, as duas abordagens permitiram identificar um novo painel de genes candidatos a biomarcadores e um novo alvo terapêutico (musashi1) para tumores uroteliais de alto grau.

2. ABSTRACT

Urothelial carcinoma represents one of the most common types of urinary neoplasms, with high rates of recurrence, aggressiveness and progression to invasive muscular disease. Due to the complexity of the biological systems, little is known about the molecular mechanisms responsible for urothelial carcinomas. In recent years, the increase of bioinformatics tools has enabled the identification of new molecules and molecular mechanisms involved in carcinogenesis. In this study, two approaches were conducted aiming to identify new potential biomarkers for low and high grades urothelial tumors. Initially, data from RNA sequencing showed the levels of gene expression and splicing profile for urothelial tumors (low and high grades) and normal bladder tissues obtained from the biorepository of the University of São Paulo Medical School (FMUSP), Brazil. The gene expression profiling demonstrated modulated expression in genes related to the *TP53* pathway in both low and high grade tumors. In addition, the splicing data showed that the preferentially affected genes were those related to cell cycle, adhesion, migration and RNA processing. The high-grade tumors presented increased expression of genes related to chemotaxis (*GREM1*, *S100A12*, *NR4A1*, *IL6*, *CCL20*, *CXCL8*, *S100A9*, *CXCL10*, *CXCL11* and *CCL7*) and neuronal functions (*EPHB2*, *CNTNAP2*, *KCNQ3*, *TENM2*, *RDH12*, *DPF1*, *SHISA9*, *SLC30A3*, *MME* and *MSI1*). Furthermore, splicing modification in transcriptional factors (*GAS5*, *RPL10*, *RPL13A* and *RPL37A*) with potential impact on protein production were also identified, but, exclusively, in high-grade tumors. In the second approach, a functional study was conducted aiming to identify the role of RNA binding proteins (RBPs) in urothelial carcinogenesis. For this, the expression genes related to 1,542 RBPs were measured from 405 cases of urothelial carcinoma obtained from the TCGA (384 high and 21 low grade tumors). A total of 236 RBPs with oncogenic potential were identified in high-grade tumors, being 14 (NOCT, CELF2, ENDOU, EXO1, EZH2, IFIT2, MOV10L1, MSI, PEG10, PTRF, TERT, TRIM71, WARS and YBX2) also related to worse prognosis and, therefore, selected for the functional

study. The RBPs expression validation showed that 8/14 (EXO, EZH2, NOCT, TERT, MOV10L1, MSI1, WARS and YBX2) were also highly expressed in the tumors samples obtained from FMUSP, Brazil. Functional analysis in three cell lines (UMUC3, T24, and J82) showed that the silencing of each RBPs encoding gene (total of 14) resulted in decreased cell proliferation and viability, and increased rates of apoptosis. The *MSI1* (musashi-1 knockdown) demonstrated a strong impact on cell viability, proliferation, migration, invasion and apoptosis, and also resulted in decreased resistance to *in vitro* chemo and radiotherapies. Data from the RNA sequencing after *MSI1* knockdown showed impact on the expression of genes related to epithelial cell differentiation, Wnt-pathway and chemotaxis. The musashi-1 target analysis (by crosslinking immunoprecipitation- CLIP) showed that this RBP preferentially bound to the 3'UTR and intronic regions of mRNA related to translation, RNA processing and Wnt, TP53, PDGF, and CCKR pathways. Taken together, data from the two approaches allowed the identification of new panel of candidate biomarkers, and a new therapeutic target (musashi1) for urothelial high-grade tumors.

3. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa de incidência e mortalidade por câncer de bexiga para os próximos 20 anos, de acordo com levantamento realizado pelo Globocan (http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx). A) Incidência e mortalidade no Brasil; B) Incidência e mortalidade no mundo.....24

Figura 2: Estadiamento TNM (*tumour, node, metastasis*) dos tumores de bexiga (*Cancer Research UK*, adaptado). À direita, a nova classificação dos tumores de bexiga de acordo com a *WHO* (Organização Mundial de Saúde) e *ISUP* (*International Society of Urology and Pathology*).....25

Figura 3: Principais formas de *splicing* de RNAm: A - *splicing* constitutivo; B - salto de éxons; C - éxons mutuamente exclusivos; D - sítios 5' doadores de *splicing* alternativo; E - sítios 3' receptores de *splicing* alternativo; F - retenção de íntron.....28

Figura 4: lncRNA contribui para alguns hallmarks do câncer (adaptado de Hanagan & Weinberg, 2011 (55)). Exemplos de lncRNA e seus respectivos alvos moleculares ou genômicos relacionados a importantes efeitos na carcinogênese: proliferação, supressão do crescimento, motilidade, imortalidade, angiogênese e viabilidade.....30

Figura 5: Mecanismos de regulação pós-transcricional por proteínas de ligação ao RNA. **Capping:** adição de uma 7-metilguanossina à extremidade 5' do mRNA nascente, as RBPs se ligam à capa e promovem a estabilidade do mRNA. **Pre-mRNA splicing:** descreve a excisão de introns não codificantes de mRNA nascentes regulados por RBPs dentro do *spliceossomo* macromolecular. **Clivagem e poliadenilação na extremidade 3':** envolve a clivagem em local definido e a extremidade 3' do pre-RNAm transcrito, seguido pela adição de 150-200 resíduos de adenosina e facilitado por um complexo de RBPs. **Transporte de mRNA:** refere-se ao transporte de mRNAs maduros através do complexo de poros nucleares para o citoplasma, mediado pela associação da RBP com o transcrito. **Estabilidade do mRNA:** pode ser modulada por associações de transcritos com RBPs específicas, alterações na cauda poli (A) e *decapping*; frequentemente precedem a rápida degradação. **Tradução:** é orquestrada por um complexo de RBPs conhecido como polissomas; as RBPs também podem modular a tradução via degradação de exonuclease ou sequestro de transcritos em compartimentos citoplasmáticos protetores.....33

Manuscrito 1

Figure 1: Venn diagram of differentially mRNA expression and enriched GO terms (Revigo) analysis . **A)** Comparison between tumor (Low and High grade) vs. normal bladder. Overlaps were considered for events in the same direction. **B)** Up-regulated genes in tumor are related to cell cycle, cell division and mitotic division. **C)** Up-regulated genes and the respective GO terms.....43

Figure 2: Up-regulated genes in high grade tumor compared with low grade bladder tumor. Purple symbols represent genes related to cell chemotaxis; orange symbols represent neuronal genes; diamond symbols represent genes related with poor prognosis for bladder cancer (PrognScan data).....44

Figure 3: Venn diagram of splicing and enriched GO term (Revigo) analysis. **A)** Comparison between tumors (low and high grades) vs. normal bladder; green is the number of genes with splicing events; red represents number of splicing events. Overlaps were considered for events in the same direction. **B)** Genes with splicing modification in tumors (low and high grades) compared with normal bladder. **C)** Pathways of genes with splicing modification.....46

Figure 4: Splicing modification in high grade compared with low grade bladder tumors. **A)** Gene ontology pathway showing the strong association between genes with splicing modification in high grade tumor and RNA processing and translation. **B)** Ribossomal protein network with splicing events in high grade tumors.....47

Figure 1S: Up-regulated genes in tumors compared with normal bladder. Green symbols represents genes related to DNA replication; Purple represent genes related to cell cycle; Grey represents related to cell cycle, DNA replication, chromosome segregation and cell division...55

Figure 2S: RNA-seq read coverage of RPL10 for a control sample from bladder, low grade and high grade tumors. Shaded boxes mark introns that are most frequently retained in high grade tumors. #Exon that encodes a START codon. *Intron retained inside of open ready frames encodes new STOP codon.....55

Manuscripto 2

Figure 1. Study design. Differentially expressed RNA binding protein (RBP) genes in high-grade vs. low-grade tumors. The RBPs were evaluated regarding their association with poor prognosis. Their functional impact on bladder tumor was assayed by a set of functional assays.....70

Figure 2. mRNA levels of 14 RNA binding proteins in bladder tumor samples from Brazil..71

Figure 3. Functional results for the UMUC3 cell line. **A)** Proliferation assay showed reduced proliferation in *MSI1* knockdown cells (compared with *siControl*). Pictures 1 and 2 represent *siControl* (0 and 144 hours), 4 and 5 represent *MSI1* knockdown (0 and 144h) ($p < 0.05$; ANOVA). Yellow represents live cells. **B and C)** Caspases 3/7 and annexin V, respectively, showed increased activities after 24 h ($p < 0.05$; t-test). Pictures 3 and 6 represent *siControl* and *MSI1*-knockdown cells; green and red represent caspases 3/7 and annexin V activities, respectively; orange represents both activities together. **D)** Clonogenic assay after *MSI1* knockdown showed a decrease of colony formation (compared with *siControl*; $p < 0.05$; t-test). **E)** *In vitro* scratch assay showed a decrease of cell migration (compared to control after 8 hours; $p < 0.05$; ANOVA). **F)** Transwell migration and invasion assays: *MSI1* knockdown resulted in a reduced cell migration and invasion compared to control ($p < 0.05$; t-test). The dye absorbed by cells was dissolved in 33% acetic acid solution and quantified by absorbance at 560 nm. **G)** Photomicrograph of a transwell chamber migration and invasion cells. All results are representative of three independent experiments.....72

Figure 4. Graphs showing the synergistic effect between *MSI1* knockdown and chemical and radiation treatments (Coefficient of drug interaction < 0.9). UMUC3 *MSI1*- knockdown cells showed decreased resistance to cisplatin and radiation. **A)** Proliferation assay showed decreased proliferation of UMUC3 *MSI1* knockdown cells with the lower dose of cisplatin (compared to *siControl*). **B)** Clonogenic assay showed decreased colony formation in the UMUC3 *MSI1*-knockdown cells treated with 0.5 μ M of cisplatin. **C)** Proliferation assay after exposure to X-rays. UMUC3 *MSI1*- knockdown cells showed decreased cell proliferation after low doses of X-rays (1 and 2.5 Gy). **D)** Clonogenic assay after radiation showed decreased colony formation in UMUC3 *MSI1*- knockdown cells (dose response effect). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ANOVA, Tukey.....73

Figure 5: Main upregulated gene pathways after *MSI1* knockdown in UMUC3 cells.....75

Figure 6: Main downregulated gene pathways after *MSI1* knockdown in UMUC3 cells.....75

Figure 7. *MSI1* targets enrichment functional analysis. **A)** Musashi1 binding sites. **B)** Biological enrichment showed strong association with post-embryonic development, mRNA processing and protein phosphorylation. **C)** *MSI1* targets were associated with RNA processing, translation, DNA replication and repair. **D)** *MSI1* targets showed association with important pathways in carcinogenesis, such as *Wnt*, *TP53*, *PDGF* and *CCKR* signaling pathways and angiogenesis.....76

Figure 8. Luteolin sensitizes bladder cancer cell UMUC3 to cisplatin and radiation. UMUC3 cells were treated with luteolin for 48 hours, then the cells were exposed to cisplatin from 1-1.5 μ M or radiation (x-ray) from 0-5 Gy. Treated cells were harvest and seed for proliferation assay. **A)** UMUC3 cell proliferation after treatment with luteolin were monitored over a period of 96-hours. **B)** UMUC3 cell proliferation assays after Luteolin and Cisplatin combined treatment. **C)** UMUC3 cell proliferation after Luteolin and X-ray combined treatment. **D)** The graph shows side-by-side differences in proliferation between single and combined treatment at 96 hours. All experiments were done in triplicate. The combination treatment of luteolin and 5 Gy radiation showed synergistic effect in proliferation, which was judged by the Combination Index (CI) ($CI < 1$). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and multiple t test.....77

4. LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Table I: Differentially mRNA expression analysis.....	42
Table II: Number of splicing events in bladder cancer.....	45
Table IS. Demographic and histopathological characterization of the study population.....	56

Manuscrito 2

Table I: RNA binding proteins (RBPs) up-regulated in High grade tumors and related to poor prognosis.....	68
Table II: Summary of <i>in vitro</i> assays results.....	70
Table III: Differentially expressed lncRNAs in MSI1 knockdown (KD) cells related to poor prognosis for bladder câncer.....	74

5.LISTA DE SIGLAS

Sigla	Significado
3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
5'UTR	<i>5' untranslated regio</i>
A3SS	<i>Alternative 3'Splice Site</i>
A5SS	<i>Alternative 5'Splice Site</i>
APCDD1	<i>Protein APCDD1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BC	<i>Bladder Cancer</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette Guérin</i>
BCL2	<i>Apoptosis regulator Bcl-2</i>
CCL20	<i>C-C motif chemokine 20</i>
CCTs	<i>Carcinoma de Células Transicionais</i>
CD44	<i>CD44 antigen</i>
CDI	<i>Coefficient of drug interaction</i>
CDKN2	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CESC	<i>Cervical squamous cell carcinoma and endocervical carcinoma</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CLIP	<i>Crosslinking-Immunoprecipitation</i>
CNTNAP2	<i>CONTACTIN-ASSOCIATED PROTEIN-LIKE 2</i>
CSH2	<i>Chorionic somatomammotropin hormone 2</i>
CTNNBIP1	<i>Beta-catenin-interacting protein 1</i>
CTSB	<i>Cathepsin B</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CXCL11	<i>C-X-C motif chemokine 11</i>
CXCL8	<i>Interleukin-8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
DPF1	<i>Zinc finger protein neuro-d4</i>
dsRBD	<i>double-stranded RNA-binding motifs</i>
E2F3	<i>Transcription factor E2F3</i>
EMT	<i>Epitélio mesenquimal de transição</i>
EPHB2	<i>Ephrin type-B receptor 2</i>
FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
FMUSP	<i>Faculdade de Medicina da USP</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GREM1	<i>Gremlin-1</i>
HER2	<i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</i>
HNSC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HOXA10	<i>Homeobox protein Hox-A10</i>
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>

<i>IL6</i>	<i>Interleukin-6</i>
<i>IMP3</i>	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3</i>
<i>IMP3</i>	<i>U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3</i>
<i>IR</i>	<i>Intron Retention</i>
<i>ISUP</i>	<i>Sociedade internacional de urologia e patologia</i>
<i>KCNG1</i>	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily G member 1</i>
<i>KCNQ3</i>	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3</i>
<i>KH</i>	<i>hnRNP K homology domains</i>
<i>LGG</i>	<i>low grade glioma</i>
<i>LIHC</i>	<i>low hepatocellular carcinoma</i>
<i>LIPG</i>	<i>Endothelial lipase</i>
<i>LM</i>	<i>Leucemia Mielóide</i>
<i>lncRNA</i>	<i>RNA longo não codificante</i>
<i>LRP</i>	<i>Leucine-responsive regulatory protein</i>
<i>LUAD</i>	<i>lung adenocarcinoma</i>
<i>LUSC</i>	<i>lung squamous cell carcinoma</i>
<i>miRNAs</i>	<i>MicroRNAs</i>
<i>MME</i>	<i>Macrophage metalloelastase</i>
<i>MOV10L1</i>	<i>RNA helicase Mov10l1</i>
<i>mRNA</i>	<i>RNA mensageiro</i>
<i>MSI1</i>	<i>RNA-binding protein Musashi homolog 1</i>
<i>MVAC</i>	<i>Metotrexato, Vinblastina, Doxorubicina e Cisplatina</i>
<i>MYBL2</i>	<i>Myb-related protein B</i>
<i>NFE2</i>	<i>Transcription factor NF-E2 45 kDa subunit</i>
<i>NHUCs</i>	<i>Células uroteliais humanas normais</i>
<i>NOCT</i>	<i>Nocturnin</i>
<i>NR4A1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1</i>
<i>NRAS</i>	<i>GTPase NRas</i>
<i>OV</i>	<i>ovarian serous cystadenocarcinoma</i>
<i>p53</i>	<i>Proteína p53</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PCR2</i>	<i>Polycomb repressive complex2</i>
<i>PDK1</i>	<i>[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial</i>
<i>PL</i>	<i>Pancreatic triacylglycerol lipase</i>
<i>PLD1</i>	<i>Phospholipase D1</i>
<i>PPR</i>	<i>Pentatricopeptide repeat</i>
<i>PTTG1</i>	<i>Securin</i>
<i>PUF</i>	<i>Pumilo repeats</i>
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
<i>RBM3</i>	<i>RNA-binding protein 3</i>
<i>RBP</i> s	<i>Proteínas de ligação ao RNA</i>
<i>RDH12</i>	<i>Retinol dehydrogenase 12</i>

RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucléico</i>
RP	<i>Ribossomal Protein</i>
<i>RPL10</i>	<i>60S ribosomal protein L10</i>
<i>RPL13A</i>	<i>60S ribosomal protein L13a</i>
<i>RPL37A</i>	<i>60S ribosomal protein L37a</i>
<i>RRM</i>	<i>RNA-recognition motif</i>
<i>RTqPCR</i>	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
<i>S100A12</i>	<i>Protein S100-A12</i>
<i>S100A8</i>	<i>Protein S100-A8</i>
<i>S100A9</i>	<i>Protein S100-A9</i>
SA	<i>Splicing Alternativo</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)</i>
SE	<i>Skipped exon</i>
<i>SERPINE1</i>	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
<i>SHISA9</i>	<i>Protein shisa-9</i>
<i>siRNA</i>	<i>RNA pequeno de interferência</i>
<i>siTarget</i>	<i>Small interferência RNA Target</i>
<i>SLC30A3</i>	<i>Zinc transporter 3</i>
<i>SMAD3</i>	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
snRNA	<i>RNA nuclear pequeno</i>
<i>SPHK1</i>	<i>Sphingosine kinase 1</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<i>TENM2</i>	<i>Teneurin-2</i>
<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TNM	<i>Tumor, node, metastase</i>
<i>TP53</i>	<i>Cellular tumor antigen p53</i>
UCC	<i>Urothelial Cell Carcinoma</i>
UCEC	<i>uterine corpus endometrioid</i>
WARS	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>
WHO	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
Wnt	<i>Wingless int</i>
<i>YBX2</i>	<i>Y-box-binding protein 2</i>
<i>ZnF</i>	<i>zinc-binding domains</i>

6. REVISÃO DA LITERATURA

6.1 Considerações gerais

Atualmente, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, acometendo cerca de 8 milhões de habitantes por ano. O câncer de bexiga, ou carcinoma urotelial, representa a quinta neoplasia mais comum em homens e a décima terceira entre as mulheres, sendo 12.918 novos casos previstos para o ano de 2020 no Brasil (Figura 1A). No mundo, a neoplasia de bexiga representa a nona mais comum e a décima terceira causa de morte por câncer, sendo estimados 535.316 novos casos e aproximadamente 205.024 óbitos para o ano de 2020 (Figura 1 B) (1). Além disso, para um futuro próximo, é estimado o dobro de novos casos e mortes causadas por essa neoplasia, fenômeno explicado pelo aumento da expectativa de vida da população mundial (2). Aproximadamente metade dos casos de câncer de bexiga é causada pelo tabagismo (3); outros fatores etiológicos incluem o uso prolongado de analgésicos do tipo fenacetina, a exposição ao antineoplásico ciclofosfamida e o consumo de alimentos e água contaminada com arsênico (4–6).

Os carcinomas de células transicionais (CCTs) de bexiga correspondem a 90% dos tumores malignos nesse órgão e podem apresentar-se como pequenas papilas ou lesões extensivamente invasivas. Os demais tipos de carcinomas são representados pelos carcinomas de células escamosas (7%), pelos adenocarcinomas (2%) e pelos sarcomas (<1%) (7). Histopatologicamente, os carcinomas de células transicionais de bexiga são classificados pela extensão do tumor primário (estadiamento) e pelo grau de diferenciação histológica, podendo ser tumor papilar, carcinoma *in situ* (CIS), tumor músculo-invasivo, doença avançada e doença metastática (8).

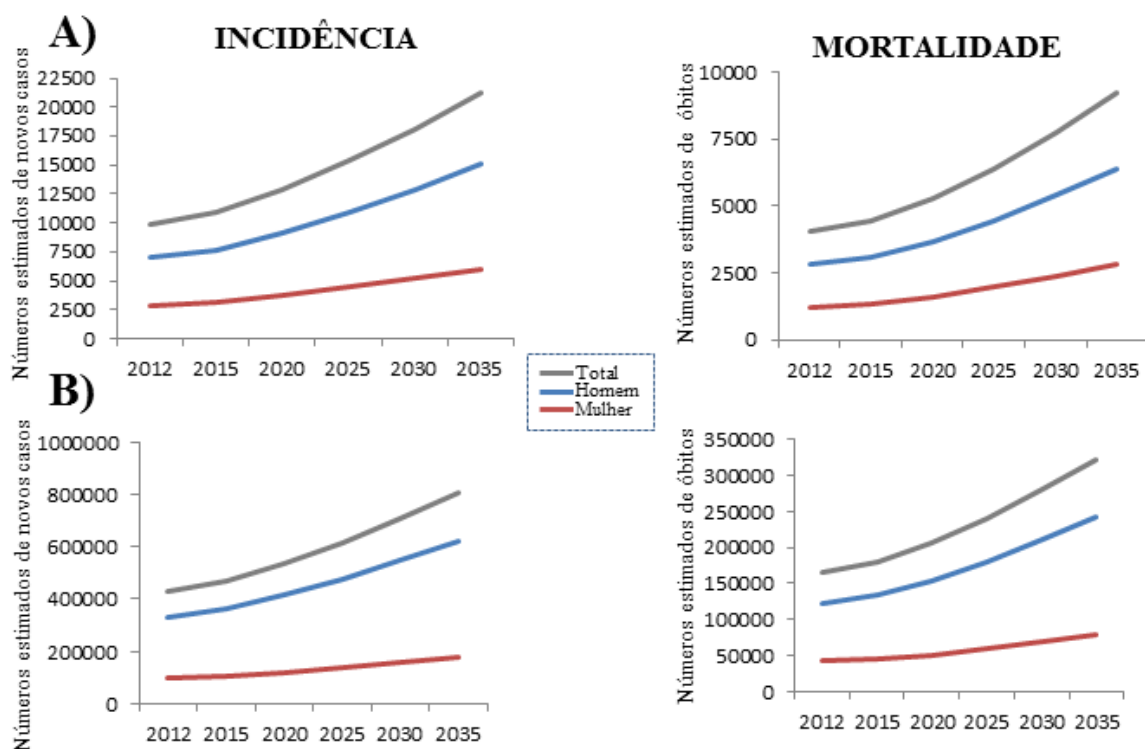


Figura 1: Estimativa de incidência e mortalidade por câncer de bexiga para os próximos 20 anos, de acordo com levantamento realizado pelo Globocan (http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx). A) Incidência e mortalidade no Brasil; B) Incidência e mortalidade no mundo.

Os CCTs são superficiais quando atingem, no máximo, a lâmina própria do epitélio vesical (TA e T1), e profundos, quando invadem a camada muscular superficial e profunda (T2), tecido perivesical (T3) e tecido adiposo (T4) [Figura 2-Adaptado de (9)]. A principal característica clínica dos tumores vesicais não invasivos é o seu alto índice de recorrência, com indiferenciação progressiva e aumento da agressividade (9). Apesar da alta taxa de recorrência, esses tumores têm baixa taxa de progressão para doença músculo-invasiva (10%-20%) e uma pequena proporção progride para alto grau. Por outro lado, 20% dos pacientes têm câncer de bexiga músculo-invasivo que se desenvolve a partir de lesões displásicas de alto grau e carcinomas *in situ*, com comportamento agressivo e altas taxas de progressão e metástases. A taxa de sobrevida de cinco anos para estes pacientes é de 50% (7).

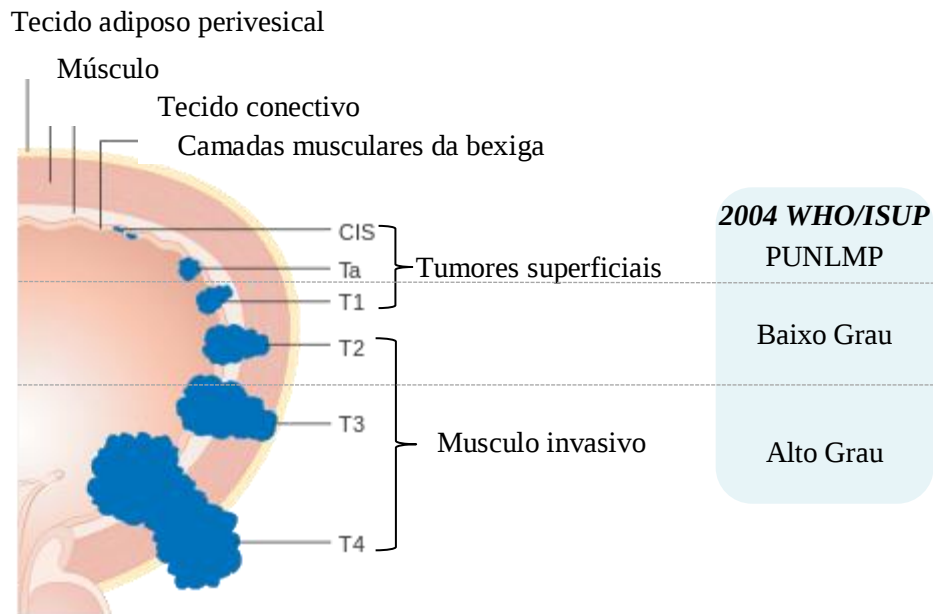


Figura 2: Estadiamento TNM (*tumour, node, metastasis*) dos tumores de bexiga (*Cancer Research UK*, adaptado). À direita, a nova classificação dos tumores de bexiga de acordo com a *WHO* (Organização Mundial de Saúde) e *ISUP* (*International Society of Urology and Pathology*) (10).

Conhecer o estágio da doença é fundamental para o estabelecimento da estratégia de tratamento para o câncer de bexiga. Diferentes tipos de tratamento estão disponíveis, incluindo cirurgia, terapia biológica, radioterapia e quimioterapia. Os procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma doença altamente mórbida. Os pacientes submetidos a tais procedimentos são considerados grupo de risco para o desenvolvimento neoplásico *de novo* e são também mais susceptíveis a recorrências, possivelmente devido à instabilidade genética urotelial (11–13). Além da cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são também utilizadas para este tipo de câncer. Kotwal et al. (14) observaram que o índice de sobrevivência entre os pacientes com tumores invasivos submetidos à radioterapia é equivalente ao daqueles submetidos à cistectomia, porém com a vantagem da preservação do órgão. No caso da quimioterapia, são vários os protocolos utilizados, e envolvem combinações de drogas como metotrexato, vinblastina, doxorrubicina e cisplatina (protocolo conhecido como MVAC) e também a combinação de

gencitabina e cisplatina. Os sinais primários da ação desses fármacos são alterações no DNA que podem resultar em bloqueio na progressão do ciclo celular e apoptose, e respostas essenciais para a manutenção da integridade genética da célula normal. A terapia com BCG (*Bacillus Calmette Guérin*) tem também apresentado resultados promissores como tratamento adjuvante para pacientes com riscos intermediário e alto para tumor de bexiga superficial (15), mostrando reduzir a taxa de recorrência e o risco de progressão para doença músculo-invasiva (16).

Estudos recentes mostram que os carcinomas uroteliais apresentam como características alterações genéticas heterogênicas, sem um evento patognomônico (17,18). Aproximadamente, 80% dos tumores uroteliais de baixo grau apresentam mutações de ponto no gene *FGFR3* (19), sendo, essas, um dos principais eventos genéticos subjacentes a tumorigênese urotelial (20). Mutações no gene *FGFR3* podem ativar a via RAS-MPAK e fosfolipases C γ (PL C γ), levando ao aumento da sobrevivência e proliferação de células uroteliais humanas normais (NHUCs) (21). Em alguns casos de carcinoma urotelial ocorre a exacerbação dessas vias, mesmo sem mutações de ponto no gene *FGFR3* (22). Entretanto, devido à complexidade do mecanismo de regulação, os níveis de expressão do *FGFR3* não o configuram como bom marcador de prognóstico para o carcinoma urotelial (23). No caso dos tumores de alto grau, estes apresentam uma série de alterações genéticas e epigenéticas como, por exemplo, a inativação dos genes *TP53*, *RB1* e *CDKN2*, as quais estão associadas a pior prognóstico (19-22). Recentemente, o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) demonstrou a presença de mutação no gene *TP53* em 49% dos tumores uroteliais de alto grau, e que aproximadamente 76% apresentavam inativação na função da p53 devido ao aumento da expressão do gene *MDM2* (antagonista do *TP53*) (28). Modificações na via do retinoblastoma (*RB1*) representam outro importante evento nos tumores invasivos de alto grau. A amplificação e superexpressão do *E2F3*, o qual é normalmente reprimido pelo *RB1*, têm sido

associadas à perda da função do *RB1* em tumores de alto grau e relacionadas ao aumento da proliferação celular em linhagens uroteliais normais (29, 30). Em conjunto, o *TP53* e o *RB1* representam importantes vias em tumores de alto grau, atuando na progressão do ciclo e sobrevivência celular (31).

6.2. Fatores epigenéticos associados à carcinogênese

Nos últimos anos, os sequenciamentos em larga escala do genoma revelaram novos fatores genéticos e epigenéticos associados à carcinogênese, como por exemplo, modificações pós-transcricionais resultantes de alterações em processos de *splicing* alternativo de RNAm, RNAs longos não codificantes e proteínas de ligação ao RNA.

6.2.1 Splicing alternativo de RNA mensageiro (mRNA)

O processo de *splicing* possibilita que um mesmo gene codifique diferentes proteínas com diferentes funções (32). O *splicing*, inicialmente considerado um mecanismo de controle de expressão restrito a algumas dezenas de genes de mamíferos, atualmente é visto como fundamental na interface transcrição/tradução, regulando cerca de 95% dos genes, e levando a modificação da cromatina e transdução de sinal (33). O *splicing* é executado pelo *spliceossoma* (complexo ribonucleoproteico que reconhece cada local de junção de uma sequência consenso) (34) e pode ocorrer de duas maneiras: *splicing* constitutivo e *splicing* alternativo. O *splicing* constitutivo consiste na retirada de todos os íntrons e união de todos os éxons que compõem o pré-mRNA. Por outro lado, no *splicing* alternativo ocorre a retirada dos íntrons e a ligação de diferentes combinações de éxons, resultando em várias formas de mRNA maduro (Figura 3) (35).

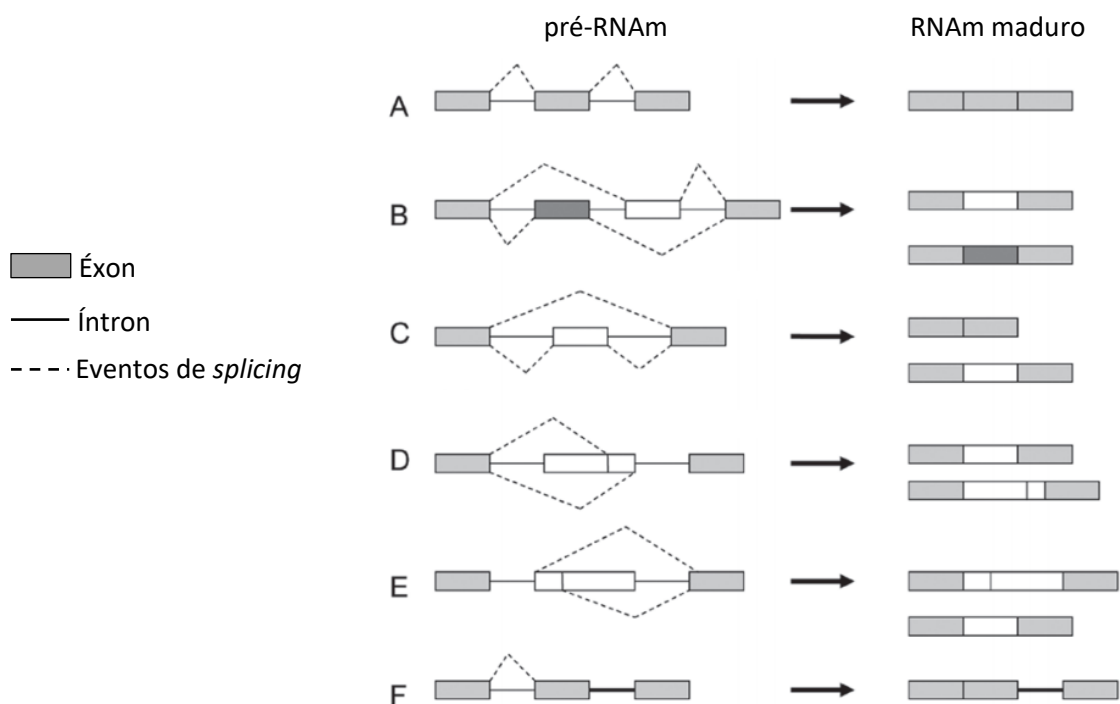


Figura 3: Principais formas de *splicing* de RNAm: A - *splicing* constitutivo; B - salto de éxons; C - éxons mutuamente exclusivos; D - sítios 5' doadores de *splicing* alternativo; E - sítios 3' receptores de *splicing* alternativo; F - retenção de íntron.

Mutações em sequências regulatórias que afetam o *splicing* alternativo são causas comuns de doença hereditária humana e câncer. Isoformas específicas de *splicing* podem também contribuir para resistência à terapia, diagnóstico e prognóstico de diferentes tipos tumorais (36). Recentes estudos sugerem que o *splicing* alternativo (SA) aberrante é um mecanismo molecular que pode levar ao desenvolvimento do câncer (36,37). A mutação no gene *U2AF1*, importante no processo de *splicing*, foi descrito em adenocarcinoma de pulmão e leucemia mieloide (LM) (38); o SA do gene *FGFR2*, que resulta na alteração das isoformas IIIb para IIIc, foi associado à transformação maligna em câncer de próstata (39); eventos de SA em *MLH* (*mutl homolog 1*) e membros da via Wnt (*Wingless int*) foram relacionados ao desenvolvimento do câncer de colón (40,41).

6.2.2 RNAs longos não codificantes (lncRNA)

Os RNAs longos não codificantes (lncRNA), possuem mais de 200 nucleotídeos e são classificados de acordo com seu tamanho, função e localização gênica (42). Inicialmente, os lncRNA eram considerados como produtos secundários da transcrição, sem nenhuma função biológica. Entretanto, nos últimos anos, centenas de estudos demonstraram que os lncRNA são capazes de interagir com moléculas de DNA, RNA e com fatores de transcrição, participando de vários processos biológicos, como metilação do DNA, modificações de histonas e remodelamento da cromatina, resultando na regulação positiva ou negativa de genes alvos (43). Alguns lncRNAs podem também atuar como “esponjas” de microRNAs (miRNA), afetando a expressão dessas moléculas (44), ou como reguladores pós-transcricionais, influenciando o processo de *splicing* alternativo de RNAm precursores, precursores de pequenos RNAs, estabilizadores de RNAm (45) e, ainda, como moléculas sinalizadoras com especificidade tecidual (46) (Fig. 4).

Há estudos que mostram a interação entre lncRNA e proteínas de ligação ao RNA, como o *polycomb repressive complex 2* (PRC2) que compete com proteínas de ligação ao RNA de genes alvos ou *miRNAs*, modificando a estrutura do RNAm (47,48). Como consequência dessas modificações ocorre a desregulação de importantes processos celulares relacionados à carcinogênese, como proliferação celular, apoptose, migração e invasão celular (49,50). O aumento da expressão do lncRNA UCA1 (*urothelial cancer associated-1*), normalmente expresso em tecidos embrionários, tem sido relacionado à gênese dos carcinomas uroteliais (51). Além desse, a expressão do MALAT1 (*metastasis associated lung cancer*), inicialmente indicado como biomarcador de metástases de câncer de pulmão de células pequenas, tem sido também associada ao estadiamento tumoral e metástase dos tumores uroteliais (52). Estudos recentes mostraram que o aumento de expressão do MALAT1 em culturas de células de carcinoma urotelial resultou no aumento de

sobrevivência celular, proliferação, migração e promoção do epitélio mesenquimal de transição por meio da ativação da via Wnt, sugerindo que esse lncRNA pode estar relacionado à motilidade celular, favorecendo a metástase (52,53). O LINC00092, é outro lncRNA já relacionado ao carcinoma urotelial e cuja expressão aumentada, juntamente com o aumento da ativação do regulador central de glicólise aeróbica (vias PTEN/PI3K/AKT/mTOR), pode contribuir para o metabolismo tumoral e proliferação celular (54).

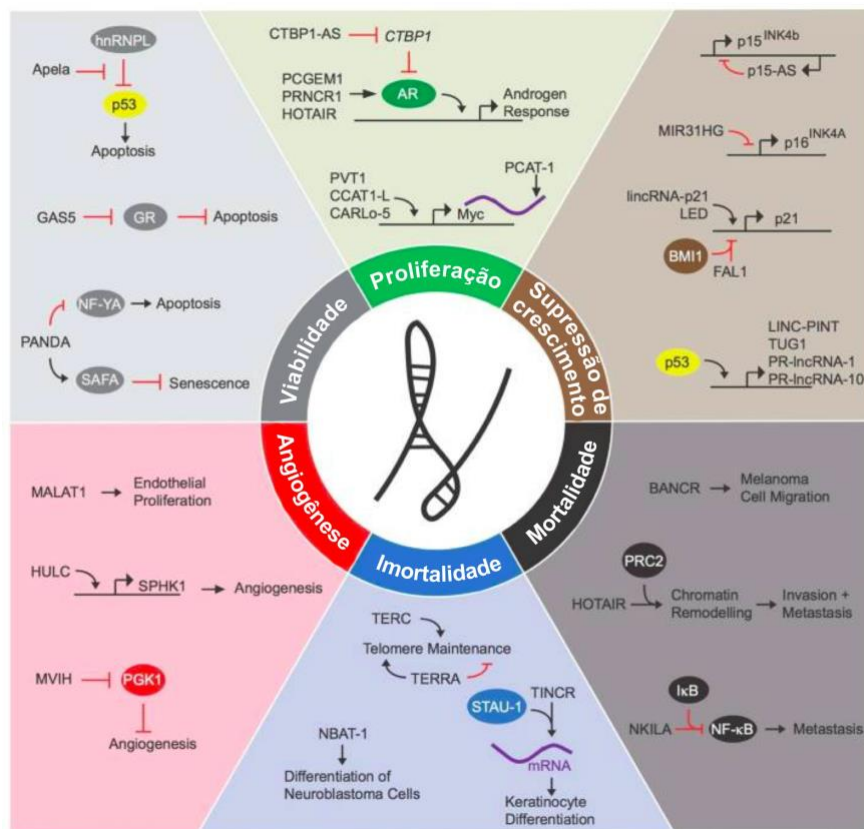


Figura 4: lncRNA contribui para alguns hallmarks do câncer (adaptado de Hanagan & Weinberg, 2011 (55)). Exemplos de lncRNA e seus respectivos alvos moleculares ou genômicos relacionados a importantes efeitos na carcinogênese: proliferação, supressão do crescimento, motilidade, imortalidade, angiogênese e viabilidade.

Além de atuar em diversos processos carcinogênicos, alguns lncRNAs foram descritos como também desempenhando papel importante na resistência à quimioterapia. Em câncer de mama, o aumento da expressão do lncRNA-ARA foi associado à resistência ao antineoplásico adriamicina (56), enquanto o aumento do lncRNA-ATB à *trastuzumab* (57). A

expressão do lncRNA-ODRUL em linhagens celulares de osteosarcoma resultou no aumento da resistência ao tratamento com a doxorrubicina (58). Particularmente em carcinomas uroteliais, até o momento foi descrita apenas a relação entre o aumento da expressão do lncRNA-UCA1 e a resistência à cisplatina (59).

6.3 Proteínas de ligação ao RNA (RBPs) e câncer

Entre os fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento, recorrência ou resistência dos tumores de bexiga às terapias conhecidas, destacam-se aqueles que atuam em nível pós-transcricional, como as proteínas de ligação ao RNA (*RNA binding proteins*, RBPs). As RBPs desempenham suas funções por meio da ligação ao RNAm, abrangendo as regiões 5'UTRs, sequências de codificação e regiões 3'UTRs. Suas funções regulatórias podem ser positivas (ativadores) ou negativas (repressores), dependendo da proteína, do RNAm ou do contexto biológico (60). As RBPs atuam nos processos de *splicing*, poliadenilação, estabilidade, degradação e transporte de RNAs e tradução (Figura 5) (61,62).

Estudos recentes mostram que a maioria das RBPs tem estruturas modulares e são compostas por múltiplas repetições de apenas alguns domínios que se combinam em arranjos diferentes para criar superfícies versáteis de ligação ao RNA (63). Essa arquitetura permite que essas proteínas se liguem ao RNA com maior especificidade e afinidade do que os domínios individuais. Além disso, múltiplas cópias dos domínios de ligação ao RNA são combinadas a outros domínios enzimáticos ou efetores, permitindo que as RBPs tenham outras funções além daquela de reconhecer o alvo, o RNAm (64). Os principais domínios de ligação ao RNA são classificados em: *RNA-recognition motif* (RRM), *repeat proteins*, *Pumilio repeats* (PUF), *pentatricopeptide repeat* (PPR), hnRNP K homology (KH) *domains*, *zinc-binding domains* (ZnF) e *double-stranded RNA-binding motifs* (dsRBD) (64). A princípio, esses diferentes domínios, com diferentes estruturas e/ou especificidade, como os dsRBDs e RRM, poderiam ser combinados para aumentar a afinidade e especificidade de

ligação ao RNA, contribuindo, assim, para a produção de proteínas características de cada tipo ou estado da célula. De fato, essa estratégia molecular aumenta as sequências de RNA alvos utilizando limitado repertório de domínios estruturais (64).

As RBPs vêm sendo amplamente estudadas devido suas funções na regulação da expressão gênica. O envolvimento de algumas RBPs na oncogênese e na progressão tumoral tem sido observado em diversos tipos de câncer. Em relação aos tumores de bexiga, Boman et al. (65) mostraram que a perda de expressão de RBM3 (*RNA-binding motif protein 3*) está associada a tumores clinicamente mais agressivos, sendo este gene um potencial biomarcador para estratificação do tratamento. Além disso, tem sido sugerido que altos níveis da proteína IMP3 (*insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3*) em pacientes com câncer de bexiga podem indicar alto risco de progressão da doença e, conseqüentemente, a necessidade de uma terapia mais intensiva.