

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GÉNETICA**

MARIA ANGÉLICA ABDALLA DE FREITAS CORTEZ

**Estudo de microRNAs reguladores da podoplanina e da invasão
celular em glioblastoma multiforme**

**Ribeirão Preto
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA ANGÉLICA ABDALLA DE FREITAS CORTEZ

Estudo de microRNAs reguladores da podoplanina e da invasão celular em glioblastoma multiforme

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cortez, Maria Angélica

Estudo de microRNAs reguladores da podoplanina e da invasão celular em glioblastoma multiforme. Ribeirão Preto, 2009.

122f.:il.;30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientador: Luiz Gonzaga Tone

1. glioblastoma.
2. microRNAs.
3. podoplanina.
4. invasão celular.
5. apoptose.
6. proliferação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Angélica Abdalla de Freitas Cortez

Estudo de microRNAs reguladores da podoplanina e da invasão celular em glioblastoma multiforme

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Genética

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese ao meu marido Marcos pela paciência, apoio e compreensão dispensadas a mim durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. ***Luiz Gonzaga Tone***, meu querido orientador, pelo auxílio e apoio durante a realização deste trabalho. Hoje me sinto preparada para enfrentar os desafios da vida acadêmica graças ao aprendizado que tive a oportunidade de adquirir sob sua orientação e tutela. Nunca esquecerei do que aprendi nestes anos todos de convivência, das sábias frases proferidas e das atitudes dignas de um mestre. Muito obrigada Professor!

Ao Prof. Dr. ***Carlos Alberto Scrideli*** pela co-orientação, correção, colaboração e pela imensa ajuda e apoio em todos os momentos da minha vida acadêmica. Muito obrigada pelas valiosas idéias dadas durante a realização deste trabalho.

Ao coordenador do curso de pós-graduação do Departamento de Genética Prof. Dr. ***Ademilson Espencer Egea Soares*** pela atenção, auxílio e apoio durante meu doutorado.

Ao Prof. Dr. ***Carlos Gilberto Carlotti Jr.*** por ter cedido as amostras para o estudo.

Ao Prof. Dr. ***Elvis Terci Valera*** pela ajuda e pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. ***George Adrian Calin***, meu futuro supervisor, por ter aberto as portas do seu laboratório e me dar a oportunidade de maior aprendizado.

À Dr.^a ***Rosane Gomes de Paula Queiroz***, querida amiga e companheira das alegrias e tristezas. Muito obrigada pela ajuda na realização deste trabalho e por criar um ambiente maravilhoso dentro do laboratório. Já estou sentindo saudades!

À Dr.^a ***Maria Sol Brassesco Annichini***, querida amiga e companheira pela ajuda e apoio. Pela companhia nos finais de semana e pelas excelentes idéias durante a realização deste trabalho. Você é um sinônimo de competência. Saiba que você é um exemplo para mim e levarei comigo seus ensinamentos.

À ***Simona Rossi*** pela análise dos dados obtidos pela tecnologia do miRNA microarray.

Ao amigo *Masayoshi Shimitsu* pelo auxílio em todas as etapas no procedimento de microRNA microarray.

À Prof. Dr^a. *Maria-Magdalena Georgescu* pelo auxílio no estudo com o modelo animal.

Ao meu querido amigo *Kleiton Borges Silva*, obrigada por compartilhar comigo suas brilhantes idéias e momentos de glória e de lágrimas. Nós sabemos que o caminho é árduo, mas também que a vitória e o sucesso sempre chegam a quem trabalha. Sucesso!

Aos meus colegas de laboratório *Andressa Gois Morales, Maria Luiza Orsi Mendes, Daniel Antunes Moreno, Angel Mauricio Castro Gamero, Vanessa da Silva Silveira Andrade, Julia Alejandra Pezuk, Antônio Alves Duarte* e *Jaqueline Carvalho de Oliveira*. Eu simplesmente amo vocês. Foi maravilhoso conviver com vocês todo este tempo. Obrigada pela amizade, ajuda e apoio na realização deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de citogenética do Departamento de Pediatria *Aide Barbosa, Sônia Scandiussi, Maria Lucia Machado* e *Lucimar Fernandes* pelo apoio e agradável convivência.

Às secretárias do Departamento de Genética *Susie Adriana Penha Nalon, Maria Aparecida Oliveira Silva Elias* e *Silvia Sant'anna Consiglieri* pela atenção e apoio prestados durante toda a minha pós-graduação.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pela concessão da minha bolsa de doutorado.

À *Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)* pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Cortez, MA. **Estudo de microRNAs reguladores da podoplanina e da invasão celular em glioblastoma multiforme.** 2009, 122 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O glioblastoma (GBMs) é um dos mais frequentes e malignos tumores cerebrais, que apresenta uma elevada capacidade proliferativa e de invasão celular. Recentemente foi demonstrado que a podoplanina, uma sialo-glicoproteína de membrana, está relacionada com a invasão e malignidade em tumores astrocíticos. Entretanto, o papel desta proteína na invasão celular em GBMs ainda não está claro. MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes de proteína que regulam a expressão gênica e vários processos biológicos e doenças, incluindo o câncer. Contudo, pouco se sabe a respeito do papel dos microRNAs na regulação do processo de invasão, proliferação e apoptose em GBMs. Os objetivos do presente estudo foram primeiro, avaliar o impacto do silenciamento da podoplanina na invasão e proliferação celular em GBMs. Segundo, identificar miRNAs diferencialmente expressos potencialmente reguladores da podoplanina e comparar o perfil de expressão destes miRNAs entre o GBM e as células CD133 positivas (CD133⁺). E terceiro, avaliar a expressão dos miRNAs selecionados em modelo xenográfico e o impacto da restauração da expressão destes miRNAs sobre os processos de invasão, apoptose e proliferação celular em GBMs. O silenciamento da podoplanina por RNA de interferência promoveu uma diminuição significativa na quantidade de células invasivas ($p=0,03$) e na proliferação ($p=0,02$) in vitro. Para identificação de miRNAs diferencialmente expressos foram analisadas 40 amostras de pacientes com GBM comparadas com amostras de cérebro normal por miRNA *microarray*. A análise dos dados indicaram 47 miRNAs hipoexpressos e 41 hiperexpressos. Para a validação dos dados de *microarray* foram selecionados os miRNAs potencialmente reguladores da podoplanina preditos pela análise in silico. Os resultados de *microarray* foram validados pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (qRT-PCR) para os miR-29b ($p=0,03$) e miR-125a ($p=0,001$). Como em GBMs, os miRNAs miR-29b ($p=0,02$), miR-125a ($p=0,0005$), miR-149 ($p=0,014$) e miR-181a ($p=0,01$) também estão hipoexpressos nas células CD133⁺ comparado com as células negativas (CD133⁻). No estudo em linhagens de GBM foi observado uma correlação inversa entre a expressão dos miR-29b e miR-125a e da podoplanina. Além disso, a expressão da podoplanina foi reduzida após a transfecção dos miR-29b e miR-125a na linhagem LN319. Foi observado uma diminuição da atividade da luciferase na transfecção com o miR-29b ($p=0,0017$) e miR-125a ($p=0,003$). A mutação dos sítios de interação do miR-29b e miR-125a resgatou a atividade da luciferase, confirmando a regulação da expressão da podoplanina por estes miRNAs por meio da interação direta com a região não traduzida 3' (3'UTR). Nos estudos de invasão celular, a transfecção com os miR-29b e miR-125a levou a uma significativa redução da invasão nas linhagens de GBM LN319 ($p=0,0003$ e $p=0,005$, respectivamente) e U251 ($p=0,03$ e $p=0,0008$, respectivamente). No estudo em modelos in vitro e in vivo, houve uma diminuição da expressão do miR-125a nas células com perfil invasivo selecionadas em matrigel e nas células invasivas de tumor xenográfico ($p=0,001$). Na linhagem com TP53 selvagem houve a indução da apoptose ($p=0,01$) e diminuição da proliferação celular ($p=0,0002$) após a transfecção do miR-29b, sugerindo que o miR-29b age de maneira dependente ao TP53 no mecanismo de apoptose. Os resultados indicam uma relação da podoplanina no processo de invasão em GBMs e sugerem um importante papel dos miR-29b e miR-125a na patogênese e progressão do GBM e que portanto, representam interessantes alvos para desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento do GBM.

Palavras-chave: glioblastoma; microRNAs; podoplanina; invasão celular; apoptose; proliferação.

ABSTRACT

Cortez, MA. **Study of microRNAs regulating podoplanin and cellular invasion in glioblastoma multiforme.** 2009, 122 f. Doctorate Thesis – Faculty of Medicine University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and malignant brain tumor, that presents elevated capacity of proliferation and cellular invasion. Recently, it was demonstrated that podoplanin, a membrane sialo-glycoprotein, is related to cellular invasion and malignancy in astrocytic tumors. However, its role in GBMs invasion remains elusive. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that regulate gene expression and several biological processes and diseases, including cancer. Nevertheless, their role in invasion, proliferation and apoptosis is not completely understood in GBMs. The objectives of this study were, first, evaluate the impact of podoplanin silencing in cellular invasion and proliferation in GBMs. Second, identify differentially expressed miRNAs predicted to regulate podoplanin and compare the expression profile of these miRNAs between GBM and CD133 positive cells (CD133⁺). Third, evaluate the expression of the selected miRNAs in xenograph model and analyze the impact of these miRNAs replacement in invasion, apoptosis and cellular proliferation in GBMs. Podoplanin silencing promoted a significant reduction in cellular invasion ($p=0,03$) and proliferation ($p=0,02$) in vitro. We analyzed 40 samples from GBM patients by miRNA microarray compared to normal brain samples in order to identify differentially expressed miRNAs. Data analysis indicated 47 under expressed miRNAs and 41 overexpressed miRNAs in GBMs. For microarray data validation we selected miRNAs predicted by in silico analysis to regulate podoplanin. MiRNA microarray data were validated by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) for miR-29b ($p=0,03$) and miR-125a ($p=0,001$). As seen in GBMs, the selected miRNAs miR-29b ($p=0,02$), miR-125a ($p=0,0005$), miR-149 ($p=0,014$) and miR-181a ($p=0,01$) were also underexpressed in CD133⁺ when compared to negative cells. In GBM cell lines study, it was observed a inverse correlation between miR-29b and miR-125a and podoplanin. Cells transfected with miR-29b and miR-125a presented a reduction in podoplanin expression compared to control. It was observed a reduction of luciferase activity after miR-29b ($p=0,0017$) and miR-125a ($p=0,003$) transfection. Mutations in miR-29b and miR-125a 3'UTR interaction sites rescued luciferase activity, confirming the regulation of podoplanin by these miRNAs through direct 3'UTR interaction. In invasion studies, a reduction of invasive cells was observed in transfected LN319 and U251 cells with miR-29b ($p=0,0003$ and $p=0,03$, respectively) and with miR-125a ($p=0,005$ and $p=0,0008$, respectively). In vitro and in vivo models, the expression of miR-125a was decreased in cells with high invasive profile selected in matrigel and in invasive cells from xenograph tumor ($p=0,001$). In wild-type TP53 cell line apoptosis induction ($p=0,01$) and proliferation reduction ($p=0,02$) were observed after miR-29b transfection, suggesting that miR-29b is TP53-dependent in apoptosis process. These results indicate a participation of podoplanin in GBM invasion and suggest an important role of miR-29b and miR-125a in GBM pathogenesis and progression and thus, may represent interesting targets for new therapeutical approaches in GBM treatment.

Keywords: glioblastoma; microRNAs; podoplanin; cellular invasion; apoptosis; cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biogênese e mecanismo de ação do microRNA.....	28
Figura 2 -	Vetor repórter pGL3-básico.....	43
Figura 3 -	Vetor repórter phRL-TK.....	45
Figura 4 -	Análise da eficiência do silenciamento da podoplanina com siRNAs específicos	50
Figura 5 -	Confirmação do silenciamento da podoplanina por Western blot.....	51
Figura 6 -	Análise da expressão da podoplanina por imunofluorescência após a transfecção da linhagem LN319 com o siRNA 2	52
Figura 7 -	Análise da invasão celular em após a transfecção da linhagem LN319 com siRNAs específicos para a podoplanina	53
Figura 8 -	Análise da proliferação celular em após a transfecção da linhagem LN319 com siRNAs específicos para a podoplanina	54
Figura 9 -	Validação dos dados obtidos por miRNA microarray por qRT-PCR.....	60
Figura 10 -	Estudo da expressão do miR-149 e miR-181a em amostras de GBM comparadas com cérebro normal por qRT-PCR.....	61
Figura 11 -	Estudo da expressão dos miRNAs miR-29b e miR-125a em células NS2 CD133 ⁺ e NS2 CD133 ⁻ por qRT-PCR	63
Figura 12 -	Estudo da expressão dos miRNAs miR-149 e miR-181a em células NS2 CD133 ⁺ e NS2 CD133 ⁻ por qRT-PCR	64
Figura 13 -	Estudo comparativo de expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina em linhagens de GBM	66
Figura 14 -	Análise da eficiência da transfecção do miR-29b e miR-125a nas linhagens LN319, U87 e U251 por qRT-PCR.....	69

Figura 15 -	Western blot após extração de proteínas da linhagem LN319 transfectada com os miRNAs miR-29b e miR-125a	70
Figura 16 -	Imunofluorescência da linhagem LN319 transfectada com o miR-29b, miR-125a e controle.....	71
Figura 17 -	Regiões 3'UTR do gene <i>PDPN</i> preditos para interação com o miR-29b e miR-125a	72
Figura 18 -	Verificação da qualidade do DNA genômico e amplificação das regiões 3'UTR do gene <i>PDPN</i>	73
Figura 19 -	Seleção dos clones com as regiões 3'UTR do gene <i>PDPN</i> com a enzima de restrição <i>EcoRI</i>	74
Figura 20 -	Ensaio da luciferase onde foi demonstrado que o miR-29b regula a expressão da podoplanina pela interação direta com a região 3'UTR	75
Figura 21 -	Ensaio da luciferase onde foi demonstrado que o miR-125a regula a expressão da podoplanina pela interação direta com a região 3'UTR	76
Figura 22 -	Análise da invasão celular em após a transfecção da linhagem LN319 com o miR-29b e miR-125a	78
Figura 23 -	Análise da invasão celular em após a transfecção da linhagem U251 com o miR-29b e miR-125a	79
Figura 24 -	Análise da expressão do miR-29b e miR-125a em tumor xenográfico em camundongos SCID.....	81
Figura 25 -	Análise de apoptose após a transfecção das linhagens U87 e U251 com o miR-29b e miR-125a	83
Figura 26 -	Análise de apoptose após a transfecção da linhagem U251 com o miR-29b e miR-125a	84
Figura 27 -	Análise da proliferação celular em após a transfecção da linhagem U251 com o miR-29b e miR-125a	86

Figura 28 -	Análise da proliferação celular em após a transfecção da linhagem LN319 com o miR-29b e miR-125a	87
Figura 29 -	Análise da proliferação celular em após a transfecção da linhagem U87 com o miR-29b e miR-125a	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seqüências dos primers utilizados na clonagem da região 3'UTR do gene <i>PDPN</i> e as posições de interação de miRNAs na mesma	42
Tabela 2 -	Protocolo da reação de ligação dos insertos contendo as regiões 3'UTR do gene <i>PDPN</i> ao vetor pGL3	42
Tabela 3 -	Seqüências dos primers utilizados na mutagênese sítio-dirigida da região 3'UTR do gene <i>PDPN</i>	44
Tabela 4 -	MiRNAs diferencialmente expressos em GBM analisados por miRNA microarray.....	56
Tabela 5 -	MiRNAs diferencialmente expressos em GBM analisados por miRNA microarray.....	57
Tabela 6 -	MiRNAs selecionados para validação dos dados de miRNA microarray por qRT-PCR	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'	região carboxi-terminal do ácido nucléico
5'	região amino terminal do ácido nucléico
ACTL6A	actin-like 6A
ADAMs	a disintegrin and metalloproteinase
ARP	actin-related proteins
BAF53a	BAF complex 53 kDa subunit
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BIS	N-N'-metileno-bis-acrilamida
BMP4	bone morphogenetic protein 4
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27, Kip1)
CTN	célula tronco neural
CLEC-2	C-type lectin-like receptor-2
DEPC	dietil-piro-carbato
DGCR-8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DICER1	dicer 1, ribonuclease type III
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGF	epidermal growth factor (<i>beta</i> -urogastrone)
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb- b) oncogene homolog, avian
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ERM	ezrina, radixina e moesina

FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GPCRs	G protein-coupled receptors
HC-RP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
KDa	Quilo Dalton
LECs	Lymphatic endothelial cells
mA	miliampères
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
miRNA	microRNA
MMPs	matrix metalloproteinase
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
nt	nucleotídeo
PACT	interferon-inducible double strand-RNA-dependant protein kinase activator
pb	pares de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PROX1	prospero homeobox 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	Real Time quantitative Reverse Transcription PCR
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RISC	complexo de silenciamento induzido de RNA
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RT	transcrição reversa
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases

SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	dodecil sulfato de sódio
siRNA	small interfering RNA
TBS-T	Tampão Tri-Salino Tween
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF	tumor necrosis factor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TP53	tumor protein p53
TRAIL	tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).
TRBP	transactivating response RNA-binding protein
TRBP	transactivating region binding protein
trkC	tropomyosin-related kinase C
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Untranslated region
V	Volts
VEGFC	vascular endothelial growth factor C
WHO	World Health Organization
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Glioblastomas	18
1.2. Etiologia e incidência	19
1.3. Glioblastoma e podoplanina	20
1.4. Glioblastoma e células CD133 positivas (CD133 ⁺)	23
1.5. MicroRNAs	24
1.5.1. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs.....	25
1.5.2. MicroRNAs e câncer	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivos Gerais	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. PACIENTES E MÉTODOS	32
3.1. Pacientes e amostras de cérebro normal	32
3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	33
3.3. miRNA <i>microarrays</i> e análise computacional	34
3.4. Análise da expressão de miRNAs maduros por qRT-PCR	35
3.5. Isolamento de células CD133 ⁺ da linhagem U87 de GBM.....	35
3.6. Linhagens Celulares	37
3.7. Transfecção.....	37
3.8. Predição de alvos in silico utilizando ferramentas de bioinformática.....	38
3.9. Extração de Proteínas e Análise por Western blot	39
3.10. Modelo Animal.....	40
3.11. Clonagem da região 3'UTR do gene <i>PDPN</i>	40
3.12. Construção de Mutantes (mut)	43

3.13. Ensaio da Luciferase.....	44
3.14. Ensaio de Proliferação	45
3.15. Ensaio de Apoptose	46
3.16. Ensaio de Invasão	47
3.17. Imunofluorescência	47
3.18. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1. O silenciamento da podoplanina promove diminuição da invasão e proliferação na linhagem LN319	49
4.2. MiRNAs diferencialmente expressos em GBM	55
4.3. Validação dos dados de miRNA microarray por qRT-PCR.....	59
4.4. Estudo da expressão dos miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a em células tronco neurais NS2 CD133 ⁺ e sua contraparte negativa	62
4.5. Correlação inversa entre a expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina nas linhagens de GBM.....	65
4.6. Regulação da podoplanina pelos miRNAs miR29b e miR-125a	67
4.7. Inibição da invasão celular pelos miRNAs miR-29b e miR-125a em linhagens de GBM	77
4.8. Expressão dos miR-29b e miR-125a em amostras de tumor xenográfico de camundongos SCID.....	80
4.9. Indução da apoptose pelo miR-29b e miR-125a nas linhagens de GBM.....	82
4.10. Impacto da hiperexpressão do miR-29b e miR-125a na proliferação em GBMs.....	85
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXO – MANUSCRITO DO ARTIGO.....	131

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glioblastomas

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC) originadas do tecido neuroepitelial são genericamente chamadas de gliomas e são as mais freqüentemente observadas em crianças e adultos (Kleihues et al., 2002). Os gliomas apresentam subtipos com comportamento biológico heterogêneo e características histológicas diferenciadas. Dentro do grupo dos gliomas estão os tumores astrocíticos que são derivados das principais células de sustentação da glia, os astrócitos ou suas células progenitoras. Essas neoplasias são bastante diversificadas quanto à localização, idade, extensão, potencial invasivo, curso clínico e progressão (Khatua et al., 2003; Wang et al., 2003). De acordo com a classificação adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estes tumores são divididos em astrocitomas pilocíticos (grau I), astrocitomas difusos ou fibrilares (grau II), astrocitomas anaplásicos (grau III) e glioblastomas multiformes (GBM) (grau IV) (Kleihues et al., 2002; Louis et al., 2007). Assim, o GBM representa a forma mais agressiva dos gliomas malignos. É comumente visualizado como uma lesão focal, embora freqüentemente se estenda através da matéria branca do corpo caloso dentro do hemisfério contralateral ou se apresente de forma multifocal devido à infiltração difusa. Contudo, como a maioria dos tumores malignos do SNC, o GBM não forma metástase (Furnari et al., 2007). Os sintomas da doença incluem dores de cabeça progressiva, convulsão ou déficit neurológico focal. Como o próprio nome sugere, o GBM apresenta-se microscopicamente heterogêneo, com astrócitos neoplásticos pouco diferenciados, atipia celular e nuclear, alta atividade mitótica, apoptose reduzida, neoangiogênese e necrose (Reardon et al., 2006; Louis et al., 2007).

1.2. Etiologia e incidência

Apesar dos fatores de predisposição ao GBM não estarem elucidados, acredita-se que a etiologia da doença tenha bases multifatoriais, compostas de agentes genéticos e ambientais (Wrensch et al., 1997; Nichols et al., 2001). Alguns fatores de risco foram relatados por diversos estudos como, por exemplo, o contato com cloreto de vinil e pesticidas, mas somente a exposição às altas doses radiação ionizante e a associação com raras síndromes genéticas foram cientificamente comprovados (Fisher et al., 2007; Gu et al., 2009). O GBM é o tumor mais freqüente dos tumores do SNC, correspondendo a aproximadamente a 50 % dos tumores malignos, com aproximadamente 10.000 novos casos nos Estados Unidos (Davis; McCarthy, 2001; Ware et al., 2003). Por razões não esclarecidas, este tipo de tumor ocorre em diferentes freqüências entre os países desenvolvidos. Nos Estados Unidos representa aproximadamente 51% dos gliomas e na Suíça, 69% dos casos dos tumores astrocíticos e oligodendrogliais são GBMs (Ohgaki et al., 2004; Ohgaki et al., 2005). A maior incidência global em países desenvolvidos pode estar relacionada ao subdiagnóstico nos países em desenvolvimento (Stiller; Nectoux, 1994; Ohgaki et al., 2005). Caucasianos são mais freqüentemente afetados do que asiáticos ou africanos (Ohgaki et al., 2005), com uma incidência de 3.55 novos casos por 100.000 pessoas por ano (Ohgaki; Kleihues, 2005). Embora possa ocorrer em pessoas de qualquer idade, são mais freqüentes em adultos com idade mais avançada. A maioria dos casos (>90%) são GBMs primários que se desenvolvem rapidamente de novo, sem evidência clínica ou histológica de uma lesão precursora maligna. Este tipo afeta principalmente pacientes mais velhos e são geneticamente caracterizados pela perda de heterozigosidade da região 10q, amplificação do *EGFR*, deleção do *CDKN2A* e mutações do *PTEN*.

Por outro lado, o GBM pode ser secundário originado a partir da transformação de um tumor de baixo grau ou anaplásico e manifestar em pacientes mais jovens. Em GBMs

secundários observam-se principalmente mutações do gene *TP53* (Ohgaki; Kleihues, 2007). A distribuição da idade dos pacientes é mais variável no tipo secundário. A média de idade dos pacientes com GBM primário e secundário é cerca de 60 e 45 anos, respectivamente (Ohgaki et al., 2004; Ohgaki et al., 2005). Ao contrário dos pacientes com GBM secundário, o GBM primário ocorre mais frequentemente em homens do que em mulheres (H:M = 1.3) (Louis et al., 1993; Godard et al., 2003; Ohgaki et al., 2004). A sobrevida global dos pacientes recentemente diagnosticados com GBM é de apenas 17–30% em 1 ano, mesmo com a aplicação de novas técnicas cirúrgicas, radioterapia e quimioterapia (Capocaccia et al., 2003; Ohgaki et al., 2004; Ohgaki et al., 2005). Atualmente, mesmo com os recentes avanços no entendimento da patologia molecular não houve um progresso significativo na terapia ou aumento na sobrevida dos pacientes (Kanu et al., 2009).

1.3. Glioblastoma e podoplanina

Há várias características do GBM que representam grandes obstáculos na terapia como a proeminente angiogênese, alta resistência à radioterapia e quimioterapia e a invasão do tecido cerebral normal (Gomez; Kruse, 2006; Louis, 2006; Furnari et al., 2007; Barcellos-Hoff et al., 2009). Dentre estes exemplos, a invasão de células isoladas do GBM representa uma das causas da malignidade e da impossibilidade de ressecção total do tumor, originando novos focos malignos (Giese et al., 2003). A invasão é um processo complexo, ativada por vários receptores da superfície celular como tirosina quinases (RTKs), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), receptor de TGF- β , integrinas, imunoglobulinas, família de fatores de necrose tumoral (TNF), receptores de citocinas, e receptores de tirosina fosfatase (Teodorczyk; Martin-Villalba, 2009). Além disso, uma outra proteína denominada

podoplanina também foi relacionada à indução da invasão celular em diversos tipos de tumores, incluindo o GBM (Martin-Villar et al., 2006).

A podoplanina é uma sialo-glicoproteína de membrana tipo I com 38kDa, codificada pelo gene *PDPN* (T1A/T1A2/GP36/AGGRUS) situado na região 1p36.21 (Zimmer et al., 1999). O gene *PDPN* é expresso em dois RNAs de 2.7 e 0.9 kb, ambos contendo as seqüências codificantes e originadas de poliadenilação alternativa (Kriehuber et al., 2001; Martín-Villar et al., 2005). Esta proteína foi primeiramente descrita por Wetterwald et al. (1996) como antígeno E11. Posteriormente, foi dado o nome de podoplanina devido à associação desta proteína com modificações morfológicas da célula epitelial glomerular denominada podócito (Breiteneder-Geleff et al., 1997). A expressão da mesma é regulada pelo gene *PROX1*, que controla o desenvolvimento de células progenitoras do sistema linfático de veias embrionárias (Kato et al., 2006). A podoplanina é expressa em vários tipos de tecidos e células normais, notavelmente as células endoteliais linfáticas (LECs). Entretanto, não é expressa pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos. Devido a este aspecto, a podoplanina tem sido amplamente utilizada como marcador específico para detecção das LECs e linfagiogênese associada ao crescimento tumoral (Breiteneder-Geleff et al., 1999; Ordonez, 2006). A podoplanina é idêntica ao antígeno M2A, que é reconhecido pelo anticorpo D2-40 (Schacht et al., 2005). Em um estudo sobre marcadores do cérebro em desenvolvimento, Nakamura et al. (2006) relataram que a maioria das células tronco normais (CTNs) e células progenitoras foram reconhecidas pelo anticorpo D2-40, concomitantemente com outros marcadores de células tronco como nestina, vimentina e β -tubulina II. Estes resultados sugerem que a podoplanina pode representar um marcador putativo de células da camada da matriz marginal (CTNs e progenitoras) e células derivativas. Atsumi et al. (2008) e Shimada et al. (2009) sugeriram que a podoplanina é um novo marcador de células iniciadoras de tumor com propriedade de células tronco e que a expressão desta proteína estaria

relacionada ao estado imaturo no processo de diferenciação em carcinoma de células escamosas. Foi demonstrado que camundongos deficientes de podoplanina morrem ao nascer devido as malformações dos vasos linfáticos e falha respiratória (Ramirez et al., 2003; Schacht et al., 2003). Embora a função biológica específica da podoplanina ainda não foi totalmente elucidada, alguns estudos demonstraram uma importante participação em condições fisiológicas, como na manutenção da permeabilidade glomerular (Raica et al., 2008), e patológicas como no câncer. Vários estudos relataram a correlação da expressão da podoplanina com a progressão da malignidade, migração celular e invasão em tumores. Além disso, a podoplanina promove a agregação plaquetária das células tumorais por meio da interação com o receptor plaquetário CLEC-2 (Suzuki-Inoue et al., 2007; Kato et al., 2008). A ativação de plaquetas pelas células tumorais as protege da citotoxicidade do TNF- α (Philippe et al., 1993) e da resposta imunológica (Nash et al., 2002), sendo responsável pela liberação de vários fatores de crescimento que promovem a proliferação celular (Camerer et al., 2004). Ainda, a agregação plaquetária promove a adesão celular ao endotélio vascular via integrinas, extravasamento e metástase (Nash et al., 2002). Foi demonstrado que a podoplanina promove a migração e invasão celular por meio da modulação da atividade da RhoA e do citoesqueleto de actina via a fosforilação da ezrina, umas das proteínas ERM (ezrina-radixina-moesina) (Scholl et al., 1999; Martín-Villar et al., 2006; Wicki et al., 2006). A podoplanina é hiperexpressa em vários tipos de cânceres incluindo carcinoma de células escamosas da pele (Liang et al., 2007), pulmão (Kato et al., 2005), esôfago (Nakayama et al., 2007), cervix uterino (Dumoff et al., 2006), laringe e cavidade oral (Martín-Villar et al., 2005), disgerminoma ovariano e tumores da granulosa (Schacht et al., 2005), mesotelioma maligno (Ordonez, 2005), angiosarcoma (Breiteneder-Geleff et al., 1999), adenocarcinoma do cólon e reto (Kato et al., 2003), tumor germinal testicular (Kato et al., 2004; Schacht et al., 2005), hemangioblastoma (Roy et al., 2005) e muitos tumores do SNC como ependimoma,

papiloma do plexo coróide, meningiomas, astrocitoma pilocítico e GBM (Shibahara et al., 2006). Contudo, apesar de ter sido estabelecido uma associação entre a podoplanina e a invasão celular no câncer, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais esta proteína promove a progressão tumoral em GBMs.

1.4. Glioblastoma e células CD133 positivas (CD133⁺)

Recentes estudos demonstraram que entre as CTNs e o GBM há muitas similaridades como a alta taxa proliferativa, auto renovação e a capacidade de diferenciação em linhagens neurais, astrocíticas e oligodendrogliais (Singh et al., 2004; Godlewski et al., 2009). As CTNs estão amplamente distribuídas na zona subventricular e no giro dentado do cérebro adulto. Interessantemente, as células do GBM são mais representativas do tumor quando crescidas nas mesmas condições das culturas das CTNs (Lee et al., 2006). Além disso, as células do GBM hiperexpressam proteínas associadas às células progenitoras e células tronco como nestina, Bmi-1, Olig2, e Sox2 (Stiles; Rowitch, 2008). No entanto, estudos revelaram que apesar das similaridades com as células do GBM, as CTNs apresentam importantes peculiaridades como, por exemplo, a utilização de distintos mecanismos de diferenciação (Godlewski et al., 2009). A descoberta de que as células tumorais e as células tronco compartilham algumas características como diferenciação incompleta e capacidade de auto-renovação levou à idéia da célula tronco do câncer (CTC). Apesar da existência de controvérsias, foi levantada a hipótese de que os GBMs são mantidos por uma pequena população de CTCs. Inicialmente, foi proposto que certos tipos de cânceres como leucemias e câncer de mama poderiam conter uma pequena porcentagem de células com potencial tumorigênico assim como propriedades de células tronco (Huntly et al., 2005; Stingl; Caldas, 2007). Posteriormente, pequenas subpopulações de células foram isoladas de outros tipos de

cânceres como o GBM (Singh et al., 2004). Nestes estudos, as células de pacientes com o tumor foram separadas baseadas na expressão do putativo marcador de células tronco, o antígeno de superfície prominina-1 (CD133) (Singh et al., 2004, Yuan et al., 2004, Yu et al., 2004). As células CD133⁺ apresentam um enorme potencial tumorigênico in vivo em detrimento das células CD133 negativas (CD133⁻). Além de apresentar uma alta capacidade angiogênica, as células CD133⁺ demonstram uma resistência aumentada à radiação e quimioterapia (Bao et al., 2006). Com relação a este aspecto, recentes estudos demonstraram que após a indução de diferenciação das células CD133⁺ de GBM pela BMP4 ocorreu inibição do crescimento tumoral intracerebral em camundongos (Piccirillo et al., 2006). No entanto, ainda há muitos aspectos a serem explorados como, por exemplo, a identificação de células CD133⁻ potencialmente tumorigênicas (Beier et al., 2007). Portanto, a elucidação deste e dos outros aspectos acima citados e o estudo de novos reguladores da expressão gênica, como os miRNAs poderão auxiliar no desenvolvimento de novas terapias contra o GBM.

1.5. MicroRNAs

MiRNAs são uma classe de pequenos RNAs não-codificantes que participam da regulação da expressão gênica tanto pela repressão transcricional como pela degradação do RNA mensageiro (RNAm) (Ambros, 2004; Bohnsack et al., 2004; Zamore; Haley, 2005). Os miRNAs foram primeiramente identificados cerca de 15 anos atrás com a descoberta do lin-4 em *C. elegans* (Wightman; Ruvkun, 1993; Griffiths-Jones, 2006). Atualmente, mais de 700 miRNAs tem sido identificados em humanos (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). No entanto, foi elucidada a função fisiológica de apenas uma pequena fração dos miRNAs identificados (Esquela-Kerscher; Slack, 2006).

1.5.1. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

Em humanos, aproximadamente metade de todos os genes de miRNA estão localizados dentro de íntrons de genes codificantes de proteínas, enquanto outros são encontrados em regiões intergênicas ou em éxons (Rodriguez et al., 2004). Em mamíferos, os miRNAs são geralmente transcritos pela RNA polimerase II (Farh et al., 2005) e em alguns casos pela RNA polimerase III (Borchert et al., 2006). Alguns transcritos primários (pri-miRNAs) contêm *clusters* de vários miRNAs que são processados nas suas formas maduras a partir de um único transcrito primário, enquanto outros contêm apenas um miRNA. Portanto, a transcrição do miRNA pode resultar na produção de pri-miRNAs monocistrônicos, bicistrônicos ou policistrônicos. Um único pri-miRNA pode apresentar aproximadamente 200 nucleotídeos (nt) a várias kilobases (kb) em comprimento e ter tanto Cap 5' (7-metilguanossina) e a cauda poli A (Lee et al., 2002; Zeng et al., 2003; Cullen, 2004). Os pri-miRNAs são processados por um complexo contendo duas proteínas principais, as endonucleases RNase III Drosha (ribonuclease 3) e DGCR8, que formam o miRNA precursor ou pré-miRNA contendo um monofosfato na terminação 5' e 2 nt ligados a um grupo hidroxil na terminação 3' (Cai et al., 2004; Lee et al., 2003; Kim, 2005). Este miRNA precursor, que contém aproximadamente 60-110 nt em estrutura de grampo (*hairpin*), é ativamente transportado para o citoplasma pela exportina 5 e seu cofator Ran-GTP (Li et al., 2003; Lund et al., 2004). Tais proteínas se ligam aos 2 nt localizados na terminação 3' do miRNA precursor (Basyuk et al., 2003). Uma vez no citoplasma, a hidrólise da molécula de GTP promove a liberação dos pré-miRNAs, que são então processados pela endonuclease RNase III Dicer em conjunto com seus cofatores TRBP (Chendrimada et al., 2005) e PACT (Lee et al., 2006). Estas enzimas se ligam aos 2 nt da terminação 3' e removem a volta (*loop*) terminal resultando em um pequeno RNA maduro de fita dupla com aproximadamente 19-25

nt. A fita do miRNA maduro que apresentar-se energeticamente menos estável na terminação 5' é incorporada pelo complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Hammond et al., 2000), composto principalmente pelas proteínas da família Argonauta (Meister et al., 2004; Maniatakis; Mourelatos, 2005). A interação entre o miRNA e o RNAm alvo ocorre entre a região denominada *seed* com 2-8 nt no miRNA e os sítios complementares dentro da região 3' não traduzida (3'UTR) do RNAm (Lewis et al., 2005; Brennecke et al., 2005). Apesar da regulação dos duplexes miRNA-RNAm ser mediada principalmente por meio de múltiplos sítios complementares na região 3'UTR, há várias exceções como por exemplo a ligação do miRNA na região 5'UTR e/ou na região codificante dos RNAs (Lytle et al., 2007). Cerca de 30% dos genes codificantes são regulados por miRNAs e um único miRNA é capaz de regular diferentes RNAs (Lewis et al., 2003; Krek et al., 2005; Brennecke et al., 2005; Lall et al., 2006; Xie et al., 2007). Em contraste com os siRNAs que são totalmente complementares à suas regiões alvos, a maioria dos miRNAs pareiam de forma imperfeita com os sítios da região 3'UTR. Devido a esta complementaridade incompleta, os miRNAs podem regular múltiplas vias e processos, ou múltiplos genes envolvidos em processos similares simultaneamente (Lim et al., 2005). Além disso, acredita-se que os efeitos fenotípicos da modulação da expressão gênica pelos miRNAs sejam decorrentes dos efeitos cumulativos e potencialmente sinérgicos em múltiplos genes e vias dependentes dos tipos de tecidos envolvidos. Diferentes estudos têm demonstrado que a repressão traducional pelos miRNAs inclui a interferência no reconhecimento do cap 5' do RNAm para prevenir o início da tradução, desestabilização do RNAm via deadenilação da cauda poli A e o recrutamento da proteína inibidora de ribossomo IF6 (Wu et al., 2006; Chendrimada et al., 2007). Em contraste, foi relatado que alguns miRNAs são capazes de aumentar a expressão de RNAs alvos em determinadas circunstâncias (Vasudevan et al., 2007). A variação de seqüências nos genes de miRNAs, incluindo pri-miRNAs, pré-miRNAs e miRNAs maduros, podem influenciar o

processamento e a seleção de alvos pelos miRNAs (Duan et al., 2007). A alta conservação de seqüências de miRNAs entre organismos relacionados sugere uma participação destas moléculas em importantes processos fisiológicos como no desenvolvimento, metabolismo, diferenciação celular, proliferação, controle do ciclo celular e apoptose (Miska, 2005; Jannot; Simard, 2006). Conseqüentemente, a desregulação da expressão de miRNAs está correlacionada a uma variedade de patologias como infecções virais (Umbach et al., 2008), doenças inflamatórias (Sheedy et al., 2008; Pauley et al., 2008), diabetes (Tang et al., 2008), doenças musculares (Chen et al., 2009), doenças cardiovasculares (Thum et al., 2008) e câncer (Calin et al., 2004).

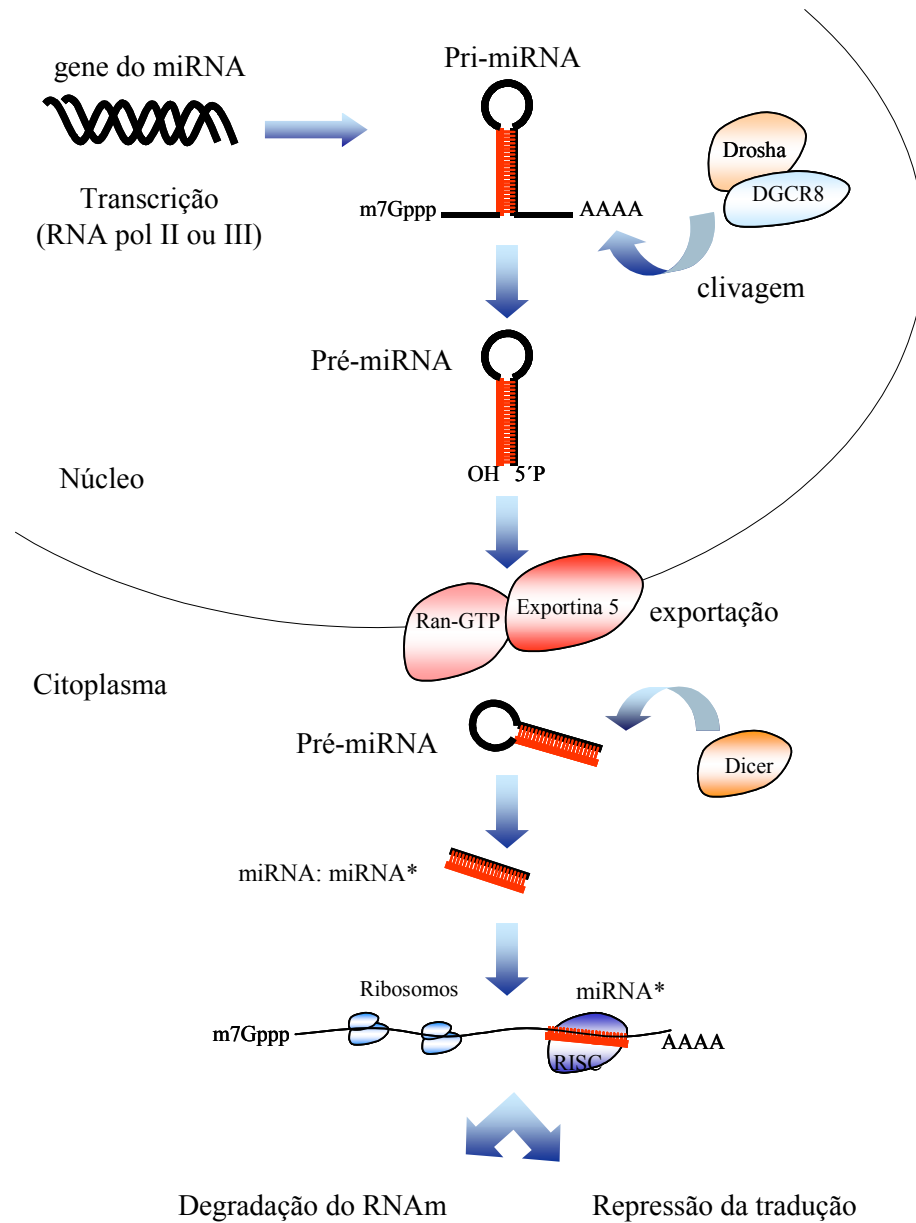


Figura 1 - Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs. Os miRNAs são primeiramente transcritos no núcleo como transcritos primários (pri-miRNAs) que são posteriormente processados pela Drosha e DGCR8, para formarem o miRNA precursor (pré-miRNA). Tais pré-miRNAs (hairpins) são ativamente transportados para o citoplasma pela Ran-GTP e a exportina 5. No citoplasma, os miRNAs precursores são processados pela Dicer, resultando em uma pequena estrutura de RNA de dupla fita (miRNA:*miRNA). A fita simples madura do miRNA é incorporada no complexo RISC, que facilita a interação do miRNA com os sítios complementares no RNAm alvo e portanto, regula a expressão gênica tanto pela repressão traducional ou pela degradação do RNA.

1.5.2. MicroRNAs e câncer

A primeira evidência do envolvimento de miRNAs na patogênese do câncer foi relatado por Calin et al. (2002) em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B (LLC-B). Neste estudo foi demonstrado que os miRNAs miR-15a e miR-16a estão localizados na região cromossômica 13q14, uma região freqüentemente deletada em mais da metade dos pacientes com LLC-B. Posteriormente, estudos publicados pelo mesmo grupo demonstraram que tais miRNAs regulam o gene antiapoptótico *BCL2* (Cimmino et al., 2005). Os genes de miRNAs estão localizados em regiões cromossômicas freqüentemente sujeitas a rearranjos, deleções e ampliações nas células tumorais (Calin et al., 2004b). Além disso, perfis de expressão específicos de miRNAs foram associados com translocações em leucemias e tumores sólidos (Zhang et al., 2006; Garzon et al., 2008; Jongen-Lavrencic et al., 2008; Dixon-McIver et al., 2008; Varambally et al., 2008). Vários miRNAs foram descritos como oncogenes ou supressores tumorais (Esquela-Kerscher; Slack, 2006; He et al., 2007). Por exemplo, miRNAs oncogênicos como o miR-21 e o *cluster* miR-17-92 (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, and miR-92-1) levam a progressão do câncer por meio da regulação de genes supressores tumorais como *PTEN* (Meng et al., 2007) e *E2F* (Mendell, 2008), respectivamente. Além disso, foi relatado que o *cluster* miR-17-92 coopera com o gene *MYC* na aceleração do desenvolvimento do tumor em camundongos com linfoma de células B (Venturini et al., 2007). Por outro lado, há miRNAs que são importantes efetores da ativação do gene *TP53* como o miR-34 e outros que regulam a expressão do *RAS* como o let-7 (Johnson et al., 2005; Suzuki et al., 2009). Em tumores ovarianos foi observado ganho no número de cópias dos genes codificadores das proteínas Dicer e Argonauta, sugerindo que alterações indiretas no mecanismo de silenciamento gênico desempenhado pelos miRNAs também representam um aspecto importante na alteração da expressão de miRNAs em

tumores (Zhang et al., 2005). Em um interessante estudo publicado por Lu et al. (2008) foi demonstrado que o padrão de expressão de miRNAs varia entre os tipos de tumores. Embora o miR-15a e miR-16-1 sejam considerados supressores tumorais na LLC, desempenham um papel oncogênico em tumores do pâncreas (Roldo et al., 2006). Entretanto, tumores derivados de tecidos da mesma origem embrionária compartilham os mesmos padrões de expressão de miRNAs (Yanaihara et al., 2006; Murakami et al., 2006). Contudo, acredita-se que além da participação de sistemas regulatórios genômicos como metilação, mutações, deleções e ampliações, as alterações no processamento, edição e mutação nas seqüências complementares nos sítios alvos expliquem, em parte, a expressão aberrante de miRNAs no câncer (Godlewski et al., 2009). Outros estudos demonstraram perfis de expressão específicos de vários tipos de câncer, incluindo carcinomas gástrico e do cólon (Michael et al., 2003), LLC-B (Calin et al., 2004), carcinoma de mama (Iorio et al., 2005), carcinoma papilar da tireóide (He et al., 2005), carcinoma hepático (Murakami et al., 2006), câncer de pulmão (Yanaihara et al., 2006), tumor do pâncreas (Volinia et al., 2006), e GBM (Ciafrè et al., 2005). No entanto, são necessários mais estudos para elucidação do papel destes pequenos RNAs na progressão do GBM.

Apesar de um maior entendimento da biologia e natureza molecular do GBM ter sido alcançado nos últimos anos, poucos avanços foram obtidos na terapia dos pacientes. O estudo de miRNAs e dos mecanismos e fatores envolvidos na progressão do tumor é portanto, necessária para a identificação de novas abordagens que possibilitem a descoberta de alvos moleculares aplicáveis à prática clínica e melhorem a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Os principais objetivos do presente estudo foram avaliar o impacto do silenciamento da podoplanina sobre a invasão e proliferação em linhagens GBM e avaliar o papel de miRNAs diferencialmente expressos reguladores da podoplanina na invasão, apoptose e proliferação celular em GBMs.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar e comparar o perfil de expressão de miRNAs reguladores da podoplanina entre as células CD133⁺ e o GBM;
- Avaliar a dinâmica de expressão dos miRNAs reguladores da podoplanina em modelo xenográfico.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes e amostras de cérebro normal

Foram analisados 2 grupos diferentes de pacientes com GBM. Na análise por miRNA *microarray* foram estudados 40 amostras de pacientes microdissecadas de GBM (OMS grau IV) (13 homens e 2 mulheres) com a idade variando entre 17 a 73 anos (média de idade de 54 anos, com a mediana e desvio padrão de 54 ± 16.42 anos) obtidas do Departamento de Patologia da MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EUA. No estudo de miRNA *microarray* foi utilizado um *pool* de amostras de substância branca de cérebro normal FirstChoice® Human Brain Reference RNA (Ambion, Austin, TX, EUA). Na validação dos resultados obtidos pelo miRNA *microarray*, foi utilizado outro grupo com 15 pacientes com GBM (OMS grau IV) (12 homens e 3 mulheres) com a idade variando de 29 a 73 anos (média de idade de 57 anos, com a mediana e desvio padrão de 60 ± 12.73 anos) obtidas do banco de tumores (aprovado pelo comitê de ética processo número 7645/99) do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr. O diagnóstico foi baseado nos critérios da Organização Mundial de Saúde 2007 (Louis et al., 2007). No estudo por reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) foram utilizadas 3 amostras representando um *pool* de amostras de substância branca de cérebros normais, adquiridas comercialmente de diferentes empresas: FirstChoice® Human Brain Reference RNA (Applied Biosystems, Foster City, CA), Human Brain MVPTM RNA (Stratagene Agilent Technologies, TX, EUA) e Human Brain RNA (BioChain Institute, Inc. Hayward, CA, EUA).

3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado dos tecidos e das linhagens celulares utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) tanto para análise de RNAm como de miRNAs, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do RNA foi avaliada pelo aparelho NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, DE, EUA). Além disso, a qualidade das amostras utilizadas na análise de expressão de miRNA por *microarray* foi verificada pelo sistema automatizado de eletroforese com a utilização do kit Experion RNA StdSens Analysis kit (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA) e do aparelho Experion Automated Electrophoresis Station (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA). O RNA total foi reversamente transcrito com os reagentes do *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e *primers* específicos de transcrição reversa *stem-loop* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para cada miRNA de estudo. Com a utilização destes reagentes não há necessidade de pré-tratamento com a enzima DNase. A restrição espacial da estrutura *stem-loop* previne a ligação das moléculas de DNA genômico de fita dupla e, portanto, elimina a necessidade do tratamento do RNA quando é utilizado os reagentes do *kit* Taqman miRNA assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Chen et al., 2005). Na reação de síntese de cDNA foi utilizado 2µL de RNA total na concentração de 100ng, 1,5µL de solução tampão 10X, 0,15µL de dNTPs, 1µL de enzima RT, 0,2µL de inibidor de RNase, 5,15µL de água livre de nuclease e 1µL de cada primer específico dos miRNAs de estudo e incubados por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C com volume final de 15µL.

3.3. miRNA *microarrays* e análise computacional

A análise do perfil de expressão de miRNAs das amostras de GBM e tecido cerebral normal foi realizada com *microarray* composto de oligonucleotídeos sintetizados in situ manufaturados pela Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc, CA, EUA). 5µg do RNA total de cada amostra foi reversamente transcrito com a utilização de *random* primers octâmeros conjugados com duas biotinas e uma cauda 5' poli (A). A hibridação foi realizada no *chip* de miRNA *microarray* contendo 460 sondas de miRNAs maduros humanos espotados em quadruplicata com os sítios ativos anotados. Os *chips* foram hibridados em 6x SSPE (0,9 M NaCl/60mM, NaH₂PO₄·H₂O/8mM EDTA, pH 7.4)/30% formamida a 25°C por 18 horas (h), lavados em 0,75x TNT (Tris·HCl/NaCl/Tween 20) a 37°C por 40 minutos (min), e processados por meio do método de detecção direta de transcritos contendo biotina pelo conjugado estreptavidina-Alexa647. As lâminas processadas foram escaneadas com a utilização do aparelho PerkinElmer ScanArray XL5K Scanner (PerkinElmer, MA, EUA). O dados foram normalizados e analisados por meio da utilização do software Genespring (Silicon Genetics, CA, EUA). A ferramenta Genespring gerou uma média de valores de três replicatas espotadas para cada miRNA. O *background* subtraído das intensidades encontradas foi limitado a 10 e transformado em log. Os *spots* ausentes ou sinal de baixa qualidade foram removidos da análise antes da normalização por intensidade total (Média ou Mediana Global). Os dados gerados pelo miRNA *microarray* foram analisados pela bioinformata Simona Rossi (Departamento de Terapia Experimental do MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EUA) com a utilização do software Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Stanford University Labs, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância com um valor de *p* de múltipla comparação menor que 0,005. Foram considerados hiperexpressos

os miRNAs que apresentaram valores de expressão maiores que 1,7 e hipoexpressos os miRNAs com valores menores que 0,7.

3.4. Análise da expressão de miRNAs maduros por qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata utilizando aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) nas seguintes condições: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (s), e 60°C por 1 min. Os primers e sondas TaqMan® para os miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a foram adquiridas pelo sistema *by-demand* da Applied Biosystems. A concentração final dos primers e sonda foram de 900nM e 300nM, respectivamente. O volume final para cada reação foi de 15µL, incluindo 5µL de amostra investigada diluída (1/10), 7,5µL Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,75µL de sonda e 1,75µL de água. Foi utilizado como gene de referência o pequeno RNA nuclear *RNAU6B*, que foi expresso de maneira uniforme entre as amostras. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método Ct compartilhado (Livak ; Schmittgen, 2008).

3.5. Isolamento de células CD133⁺ da linhagem U87 de GBM

As células da linhagem U87 foram mantidas com o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Mediatech, Inc, VA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone, UT, EUA), 50µg/mL de estreptomicina e penicilina e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida de 5% CO₂. Na realização dos experimentos, a contagem e o teste de viabilidade celular foram determinados utilizando

aparelho Vi-Cell XR cell viability analyzer (Beckman Coulter Canada Inc, ON, Canadá). 20×10^6 células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e após a lavagem com PBS, o pellet foi ressuspenso em 1mL de PBS. No intuito de remover aglomerados celulares e obter células únicas, as mesmas foram passadas através de uma malha de nylon de $35\mu\text{m}$ de tubos BD Falcon Round-Bottom Tubes (BD-Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). As células desagregadas foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e o *pellet* ressuspenso em 1mL de tampão de separação autoMACS™ Running Buffer (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA). Uma vez separadas em diferentes tubos foram adicionados $50\mu\text{L}$ do bloqueador FcR blocking Reagent (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) em cada amostra antes e depois da adição dos anticorpos específicos. Nos tubos para isolamento das células CD133^+ foram adicionados $100\mu\text{L}$ de *beads* magnéticos AC133 (CD133/1) Microbeads (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) utilizando o *kit* Miltenyi Biotec CD133 Direct Cell Isolation (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) e nos controles foram adicionados $20\mu\text{L}$ do anticorpo mouse IgG2b-PE (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA). As células foram incubadas por 30 min a 4°C . $50\mu\text{L}$ do anticorpo CD133/2 (293C3) (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) conjugado com R-ficoeritrina (PE) foram adicionados e incubados por 10 min a 48°C para avaliação da eficiência de separação magnética por citometria de fluxo. Após este período as células foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão autoMACS™ Running Buffer e submetidas posteriormente a separação por citometria de fluxo. Após isolamento, as células CD133^+ , nomeadas de NS2 CD133+, foram mantidas em DME/F12 (Mediatech, Inc, VA, EUA), suplementado com 10mL B-27 (Gibco Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) para 500mL de meio de cultura, 20ng/mL de bFGF (Peprotech Inc, NJ, EUA), 20 ng/ml EGF (Peprotech Inc, NJ, EUA) e $50\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e penicilina em atmosfera úmida e 5% CO_2 , sem adição de SFB. Meio novo foi adicionado a cada 3 a 5 dias. As neuroesferas em suspensão foram dissociadas utilizando acutase (Innovative Cell Technologies, CA, EUA) por 30 min à 37°C . As células

NS2 CD133⁻ foram mantidas em DMEM/F12 (Mediatech, Inc, VA, EUA) suplementado com 10% de SFB (Hyclone, UT, EUA), 50µg/mL de estreptomicina e penicilina a 37 °C em atmosfera úmida e 5% CO₂. 3 amostras biológicas diferentes de células CD133⁺ e CD133⁻ foram coletadas e submetidas à análise de expressão de miRNAs por qRT-PCR. O resultado obtido foi a média da expressão de miRNAs das 3 amostras biológicas de cada tipo celular.

3.6. Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens estabelecidas de GBM LN229, U87, U251, U373, T98G e D54 adquiridas da American Type Culture collection (ATCC, VA, EUA). A linhagem LN319 foi gentilmente cedida pelo Dr. Frank Furnari (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA, EUA). As células foram mantidas em DMEM/F12 (Mediatech, Inc, VA, EUA) suplementado com 10% de SFB (Hyclone, UT, EUA), 50µg/mL de estreptomicina e penicilina e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Na realização dos experimentos, a contagem e teste de viabilidade celular foram determinados utilizando o aparelho Vi-Cell XR cell viability analyzer (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canadá) e o teste de exclusão do azul de Trypan.

3.7. Transfecção

Para análise do silenciamento do gene *PDPN* foram utilizados os oligômeros *Silencer*® Pre-designed siRNA (Ambion, Austin, TX, EUA) específico para a podoplanina e como controle o *Silencer*® Negative Control #1 siRNA (Ambion, Austin, TX, EUA). Para o estudo com miRNAs foram utilizados os precursores de miRNAs Pre-miR™ miRNA Precursor Molecule (Ambion, Austin, TX, EUA) específicos para os miRNAs miR-29b e

miR-125a e como controle o Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules-Negative Control #1 (Ambion, Austin, TX, EUA) também conhecido como *scrambled*. O mesmo protocolo foi utilizado tanto para transfecção de siRNAs quanto de miRNAs. Os oligômeros foram reversamente transfectados nas linhagens de GBM utilizando a lipofectamina 2000 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EUA). Inicialmente, os oligômeros foram centrifugados e ressuspendidos em água livre de nuclease a uma concentração de 50µM. Para a transfecção, 30µL lipofectamina foi diluída em 250µL do meio Opti-MEM pré-aquecido a 37°C e incubado por 5 min a temperatura ambiente. A seguir, 7µL do oligômero foi diluído em 250µL do meio Opti-MEM para atingir uma concentração final de 100µM, quando adicionado nas células. Após 5 min de incubação, a lipofectamina diluída foi combinada com o oligômero diluído e incubados por 20 min em temperatura ambiente. Seguidamente, 500µL do complexo oligômero-lipofectamina foram adicionados a 6,5mL de meio de cultura sem antibióticos contendo 6×10^6 células, produzindo um volume final de 7mL. As células transfectadas foram incubadas por 24 a 96 horas a 37°C. A eficiência da transfecção foi monitorada qRT-PCR no estudo com miRNAs. Para o estudo com siRNAs a eficiência da transfecção foi monitorada por Western blot e Imunofluorescência.

3.8. Predição de alvos in silico utilizando ferramentas de bioinformática

Dentro do grupo de miRNAs validados por qRT-PCR foram selecionados miRNAs potencialmente reguladores da podoplanina utilizando os programas Target Scan (<http://www.targetscan.org/>), miRanda (<http://microrna.sanger.ac.uk/index.shtml>), RNAhybrid (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) e TarBase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>).

3.9. Extração de Proteínas e Análise por Western blot

As proteínas totais foram extraídas utilizando o tampão Ripa (Pierce, IL, EUA) suplementado com Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Inc, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O lisado foi centrifugado por 10 min a 12.000 rpm, e recuperado o sobrenadante. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford et al., 1976). Para a análise protéica, 40µg de cada amostra foram resolvidas em um gel denaturante SDS-poliacrilamida Ready Gel® Precast Polyacrylamide Gels (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA) gradiente entre 4 a 20%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA) e então incubadas em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários: anti-podoplanina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-Vinculina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) nas diluições 1:500 e 1:1000, respectivamente. As membranas foram então lavadas 3 vezes (10 min cada) com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG HRP sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) (1:5000 em TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes (10 min cada) com TBS-T. A visualização das bandas foi realizada por meio da utilização do kit ECLTM Western blotting Analysis System (Amersham GE Healthcare, BK, UK). Os filmes foram expostos por 30, 45 e 60 s e então analisados. Os filmes foram escaneados e a intensidade das bandas determinada com a utilização do aparelho GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Imaging System (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA).

3.10. Modelo Animal

Foram utilizados camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID) para a seleção de células invasivas e não invasivas por meio de injeções intracranianas de células parentais da linhagem U251. O procedimento de injeção intracraniana e coleta da amostra foram realizados pela equipe técnica do Departamento de Neuro-Oncologia do MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EUA. Após 21 a 35 dias da inoculação das células, os animais foram sacrificados para coleta de amostras do tumor xenográfico. Foram separadas as células da região central do tumor (células não invasivas) e as células que invadiram o tecido normal (células invasivas). Foi realizada a extração de RNA total e de proteínas das amostras e a análise da expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina foram realizados por qRT-PCR e Western blot, respectivamente.

3.11. Clonagem da região 3'UTR do gene *PDPN*

Foram preditos pelas ferramentas de bioinformática 3 diferentes sítios de interação para o miR-29b e miR-125a na região 3'UTR do gene *PDPN* (UTR: accession number: NM_001006624.1), situados nas posições 1000-1400 (1), 1400-2000 (2) e 2200-2800 (3) (Tabela 1). Uma amostra de DNA genômico da linhagem MRC5 (fibroblasto de pulmão humano normal) foi utilizada para amplificação das 3 regiões 3'UTR do gene *PDPN* por PCR utilizando o kit AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Na reação de PCR foram utilizados 2µL de DNA adicionados a uma solução contendo 16,375µL de água para PCR, 0,5µL de solução 10mM de cada dNTP, 2,5µL de cloreto de magnésio 25nM (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2,5µL de solução tampão 10X, 0,125µL de AmpliTaq Gold e 10µM de cada *primer*

específico para as regiões 3'UTR selecionadas e também para o gene *GAPDH* (Sigma-Aldrich, Inc, MO, EUA) no intuito de avaliar a qualidade da amostra utilizada. As regiões 3'UTR selecionadas e as seqüências dos *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. Os produtos de PCR 3'UTR-1 (200bp), 3'UTR-2 (600bp), 3'UTR-3 (600bp) e *GAPDH* foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89mM, 89mM Ácido bórico, 2mM EDTA) com brometo de etídeo durante 1 hora a 100 V (Figura 14). As bandas foram purificadas com a utilização do kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após esta etapa as amostras foram clonadas em plasmídeo com a utilização dos kits TOPO TA Cloning kits (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EUA) e One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli* kit (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após o crescimento das bactérias selecionadas foi realizada a extração do DNA plasmidial com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle da ligação foi utilizado o sequenciamento realizado no centro de sequenciamento do MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EUA, e a digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Para esta reação foram utilizados 1µL de água, 1µL de solução tampão 10X (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5µL de *EcoRI* e 4µL da amostra em um volume final de 10µL. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (Figura 15). Após esta etapa, os insertos e o vetor pGL3-básico (Promega Inc, WI, EUA) foram separadamente submetidas a digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *BamHI*. Para esta reação foram utilizados 8µL de solução tampão 10X (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1µL de *Xba I*, 1µL de *BamHI* e 10µL do inserto em um volume final de 20µL. Para digestão do vetor foi utilizado 8µL de solução tampão 10X (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1µL de *Xba I*, 1µL de *BamH I* e 3µg do vetor. As reações de digestão foram realizadas à 37°C por 2 horas. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de

etídeo e as bandas foram purificadas com a utilização do kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi realizada com a utilização da enzima T4 DNA ligase (Tabela 2). Foram construídos os plasmídeos repórter selvagens pGL3 wild-type 1 (pGL3wt1), pGL3 wild-type 2 (pGL3wt2) e pGL3 wild-type 3 (pGL3wt3) com as regiões 3'UTR via inserção de regiões 3'-UTR do gene *PDPN* dentro dos sítios 3' de restrição das enzimas *XbaI* e *BamVI* no plasmídeo promotor da luciferase pGL3-básico (Promega Corp., WI, EUA) (Figura 2) que expressa a luciferase proveniente de *Photinus pyralis* (vaga-lume).

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados na clonagem da região 3'UTR do gene *PDPN* e as posições de interação de miRNAs na região 3'UTR. Os primers 1, 2 e 3 foram utilizados para a clonagem das regiões 3'UTR do gene *PDPN* e os primers para o *GAPDH* foram utilizados para controle da qualidade da amostra.

<i>Primers</i>	seqüência	posição na região 3'UTR	amplicon (pb)
1	F:AACCGAAGGAAAGACCGTTCACCA R:TCTGCACCAGCTAAAGGCAGTTGT	250-500	200
2	F:GCTGGTCCAGATTAATCATTTCAAAGAC R:CCAGAATTGCACAACCGCCATCAT	750-1250	600
3	F:ACTATCATTCGGAAGCACAGCCCA R:CATGTCTACACTGCATTGAGCACC	1500-2000	600
GAPDH	F: GTCATCAATGGAAATCCCATCACC R: TAATACGACTCACTATAGGGA	-	240

Tabela 2 - Protocolo da reação de ligação dos insertos contendo as regiões 3'UTR do gene *PDPN* ao vetor pGL3.

	Vetor (µL)	Controle sem enzima (µL)	Controle sem inserto(µL)
Inserto	5	5	-
Vetor (50ng/µL)	1	1	1
Tampão de ligação 2X	1	1	1
T ₄ DNA ligase (3unidades/µL)	1	-	1
água nuclease-free	2	3	7

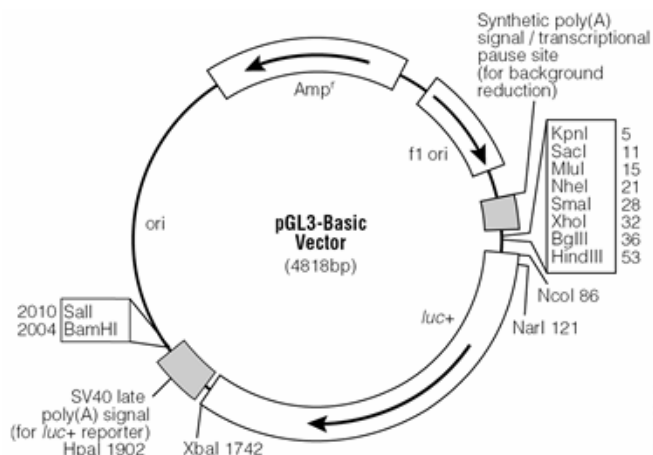


Figura 2 - Vetor repórter pGL3-básico. Vetor repórter pGL3-básico utilizado para a clonagem das regiões 3'UTR do gene *PDPN* que expressa o gene repórter luciferase.

3.12. Construção de Mutantes (mut)

Foram preparados os 2 diferentes vetores pGL3 mut1 e pGL3 mut2 para o miR-29b e 2 diferentes vetores pGL3 mut3 e pGL3 mut4 para miR-125a com deleções dos sítios preditos para interação dos miRNAs do vetor pGL3 contendo a região 3'UTR do *PDPN* com a utilização do QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Os *primers* utilizados para a inserção de deleções no sítio do miR-29b e miR-125a nos mutantes estão descritos na Tabela 2. Na reação de PCR mutagênica ou mutagênese sítio-dirigida foram utilizados 30ng/μL de DNA adicionados a uma solução contendo 37,5μL de água para PCR, 1μL de solução 10mM de cada dNTP, 5μL de solução tampão 10X, 3μL de Quick Solution, 100ng/μL de cada primer específico e 1μL de Pfu DNA polymerase. As condições da reação foram 95°C por 1 min, 95°C por 50 s, seguido de 18 ciclos a 60°C por 50 s, 68°C por 4 min e 30s e 68°C por 7 min. Os vetores mutantes foram utilizados como controle no ensaio da luciferase.

Tabela 3 - Sequências dos primers utilizados para a reação de mutagênese sítio-dirigida das regiões 3'UTR do gene *PDPN* que contêm os sítios putativos de interação do miR-29b e miR-125a. Foram sintetizados dois vetores mutantes com deleções para cada miRNA. O pGL3 mut1 e pGL3 mut2 para o miR-29b e pGL3 mut3 e pGL3 mut4 para o miR-125a.

miRNA	vetor pGL3	Primers	Deleção
miR-29b	mut 1-S	GAGGAAGCTGCTGGATGCTTAAAGAGGCTCAAGTGTGTTTGAAA	7bp
	mut 1-AS	TTTCAAACACACTTGAGCCTCTTTAAGCATCCAGCAGCTTCCTC	
miR-29b	mut 2-S	GGTTTCTTGGTCACACCTGTGTCAATGCAGTGTAGACATGAAGG	7bp
	mut 2-AS	CCTTCATGTCTACACTGCATTGACACAGGTGTGACCAAGAAACC	
miR-125a	mut 3-S	ACTTCCCTCAGATGATGAGGAGCTAAGGGGGCAGCCTTCTCTCT	6bp
	mut 3-AS	AGAGAGAAGGCTGCCCCCTTAGCTCCTCATCATCTGAGGGAAGT	
miR-125a	mut 4-S	AAGAACAAAATAAAGGAGCCCATCATTCTGTCTCAGCACCATCC	5bp
	mut 4-AS	GGATGGTGCTGAGACAGAATGATGGGCTCCTTTATTTTGTCTT	

3.13. Ensaio da Luciferase

No intuito de validar potenciais miRNAs reguladores da podoplanina foi realizado o ensaio da luciferase. As células da linhagem LN229 foram reversamente transfectadas com 0,025µg/poço dos vetores pGL3 selvagens e mutantes, 0.005 µg/poço do vetor phRL-TK (Promega Inc, WI, EUA) (Figura 3), 0,125µL dos miRNAs miR-29b, miR-125a, miR149 e miR181a (100nM) e 0,25µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Inc, CA, EUA). As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 10⁴ células/poço com um volume final de 100µL de meio de cultura. Após 36 horas, as células foram lavadas com PBS e então incubadas por 10 min em agitação com 20µl/poço do tampão de lise Passive Lysis Buffer (PLB) (Promega Inc, WI, EUA) e submetidas ao ensaio com a utilização do kit Dual-Luciferase® Reporter (DLR.) Assay System (Promega Inc, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A atividade das luciferases de vaga-lume (*Photinus pyralis*) e da

Renilla (*Renilla reniformis*) foi medida sequencialmente em cada amostra utilizando o aparelho Veritas™ Microplate Luminometer (Turner BioSystems, Inc, CA, EUA). A atividade da luciferase foi calculada como a seguir: Luz captada do miRNA/Luz captada do controle = Atividade do miRNA na região 3'UTR alvo. Os resultados obtidos foram normalizados de acordo com a atividade da luciferase *Renilla* utilizada como controle interno da reação. O ensaio foi realizado em oito replicatas e repetido 4 vezes. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

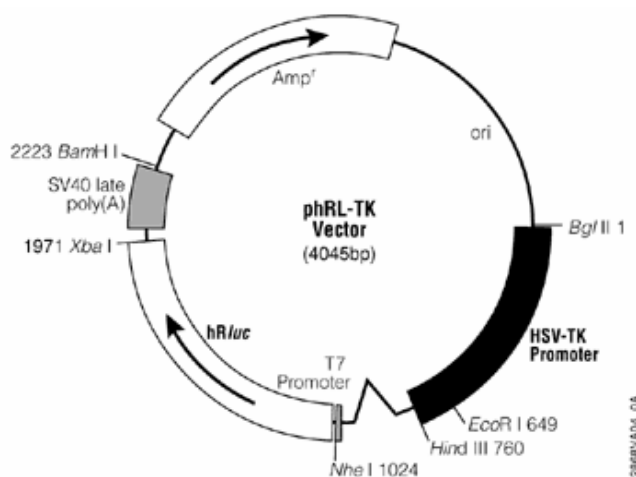


Figura 3 - Vetor repórter phRL-TK. Vetor repórter phRL-TK que expressa a luciferase *Renilla* utilizado como controle interno no ensaio da luciferase.

3.14. Ensaio de Proliferação

As linhagens celulares LN319, U87 e U251 foram reversamente transfectadas com o miR-29b, miR-125a e controle na concentração de 100µM em placas de 12 poços. 2 x 10⁴ células/poço foram semeadas em triplicata para cada tratamento e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas a 37 °C. A cada intervalo, foi realizada a remoção do meio de cultura e lavagem dos poços com PBS. Logo após, foi adicionado em cada poço 500µl meio de cultura contendo

60µl de XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (3 mg/mL) do kit Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Molecular Biochemicals, IN, EUA). As placas foram então incubadas por 2 horas a 37°C. O meio de cultura de cada poço foi transferido para placas de 96 poços e então submetidos à leitura da absorbância de 450nm com onda de referência de 650nm utilizando o aparelho iMark Microplate Absorbance Reader (Biorad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

3.15. Ensaio de Apoptose

As linhagens celulares U87 e U251 foram reversamente transfectadas com o miR-29b, miR-125a e controle na concentração de 100µM. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 1000rpm por 5 min. As células foram lavadas duas vezes com PBS, contadas e ressuspensas em tampão 1X annexin V binding buffer (diluído a partir do tampão 5X annexin V binding buffer stock) (Biotium Inc, CA, EUA) na concentração de 10⁶ células/mL. Para análise da atividade da caspase 3 e da anexina foi utilizado o *kit* Dual Apoptosis Assay Kit with NucViewTM488 caspase-3 substrate; sulforhodamine 101-annexin V (Texas Red®-annexin V) (Biotium Inc, CA, EUA). Foram adicionados 5µL de NucViewTM 488 caspase-3 substrate e sulforhodamine 101-annexin V diretamente nas células. As células foram incubadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 min. Após este período, as mesmas foram incubadas com DAPI (0,15 ug/mL) (Sigma-Aldrich, Inc, MO, EUA) e analisadas em microscópio de fluorescência. As células normais e apoptóticas foram contadas e expressas em porcentagem. Os experimentos foram repetidos 4 vezes. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

3.16. Ensaio de Invasão

As linhagens celulares LN319 e U251 foram reversamente transfectadas com o miR-29b, miR-125a e controle na concentração de 100 μ M. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em meio de cultura sem SBF. Posteriormente, 2,5 x 10⁵ células foram colocadas no topo da matriz de matrigel do kit BD Biocoat™ Matrigel™ Matrix–24 well plate (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Na parte inferior do inserto foi adicionado meio de cultura com 10% de SBF. Após a incubação a 37°C por 22 horas, as células que não invadiram foram removidas da parte superior do inserto com o uso de um *swab* (tipo de cotonete). As células que invadiram foram fixadas com metanol 100% por 2 min, coradas com uma solução de azul de toluidina 1% e analisadas por microscopia de luz (magnificação de 20x). Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para estudo comparativo com as amostras de tumor xenográfico obtidas de camundongo SCID, foi realizado o ensaio de invasão com a linhagem U251. As células que invadiram foram colocadas em cultura e posteriormente submetidas ao ensaio de invasão repetido vezes com o objetivo de selecionar células com alto perfil invasivo. Foram extraídos o RNA total e proteínas das células selecionadas e então analisado o perfil de expressão dos miRNAs por qRT-PCR.

3.17. Imunofluorescência

Após a transfecção com os siRNAs específicos para podoplanina e controle e com os miRNAs miR-29b, miR-125a e controle, as células da linhagem LN319 foram semeadas em lamínula em uma placa de 6 poços. As lamínulas foram passadas no álcool e flambadas em chama rapidamente. Após serem esterilizadas, as mesmas foram depositadas nas placas e em

seguida, as células foram semeadas. Após 48 horas da transfecção foi adicionado 400 uL de paraformaldeído 2% em cada poço por 20 min. Os poços foram então lavados cinco vezes com PBS e depois foi adicionado uma solução de PBS–Glicina 0,1M por 10 min. Após a lavagem com PBS três vezes de 5 min foi realizada a permeabilização com uma solução de PBS-Triton (0,3%) por 15 min. Posteriormente, os poços foram lavados cinco vezes com PBS e então foram incubados com o anticorpo primário anti-podoplanina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) em tampão PBS BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente na diluição de 1:200. Após a lavagem dos poços com PBS cinco vezes de 5 min foi adicionado o anticorpo secundário goat-anti-mouse IgG F(ab')₂ FITC ou TRITC 1:200 (Millipore, MA, EUA) em tampão PBS BSA 1% por 1 hora em temperatura ambiente na diluição de 1:200 e seguidamente lavados por mais dez vezes de 4 min cada com PBS. Para a marcação do núcleo as amostras foram incubadas com DAPI (0,15 ug/mL) (Sigma-Aldrich, Inc, MO, EUA) por 5 min. Após a incubação no escuro, as lâminas foram montadas com Fluormont-G (meio de montagem aquoso) e analisadas com a utilização do microscópio de imunofluorescência Olympus BX60.

3.18. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste T de *Student* (two-tailed) ($p < 0.05$ foi considerado significativo). Os testes estatísticos e as análises foram realizados utilizando o programa Excell (Microsoft) e SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0 software (SPSS, Inc, IL, EUA). Na análise dos dados de microarray foi utilizado o software Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Stanford University Labs, CA, EUA). Nesta análise foram considerados hiperexpressos os miRNAs que apresentaram valores de expressão maiores que 1,7 e hipoexpressos os miRNAs com valores menores que 0,7.

4. RESULTADOS

4.1. O silenciamento da podoplanina promove diminuição da invasão e proliferação na linhagem LN319

Em estudos prévios foi demonstrado que a podoplanina está hiperexpressa em GBM e que esta proteína está relacionada a invasão em diversos tumores. Contudo, não há relatos na literatura sobre a importância da podoplanina no processo de invasão em GBMs. Portanto, neste estudo o impacto do silenciamento da podoplanina na linhagem LN319 na invasão celular foi analisado. No intuito de produzir um silenciamento gênico transiente foram testados dois duplexes de siRNA (siRNA 1 e siRNA 2) específicos para o gene da *PDPN*. A análise da eficiência da transfecção foi realizada após 48 horas, por meio de qRT-PCR, onde verificou-se uma eficiência de 72% e 82 % para o siRNA 1 e siRNA 2, respectivamente (Figura 4). O silenciamento gênico foi comprovado por Western blot e imunofluorescência, onde foi determinado a utilização do siRNA 2 no intervalo de tempo de 96 horas para realização dos ensaios funcionais (Figura 5 e Figura 6). No presente estudo foi observado que após o silenciamento da podoplanina ocorreu uma diminuição na taxa de invasão das células silenciadas ($p=0,003$) (Figura 7). Neste estudo também foi avaliado o impacto do silenciamento da podoplanina na proliferação em GBM. Foi observada uma diminuição significativa da taxa de proliferação nas células silenciadas no tempo de 96 horas, comparando com o controle ($p=0,02$) (Figura 8). Estes resultados sugerem uma importante participação da podoplanina na regulação da invasão celular em GBMs.

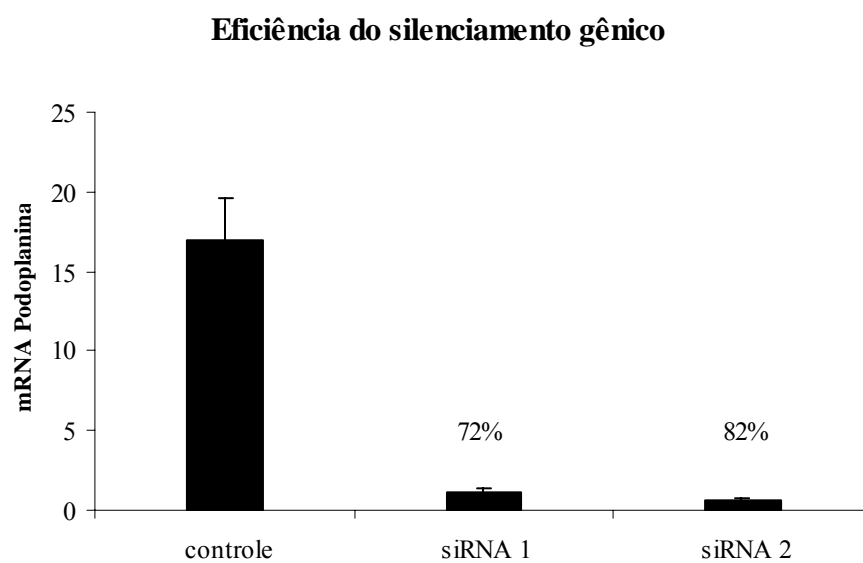


Figura 4 - Análise da eficiência do silenciamento da podoplanina com siRNAs específicos. A linhagem LN319 foi transfectada com os siRNAs 1 e 2 na concentração de 100nM com lipofectamina. A eficiência da transfecção foi avaliada por qRT-PCR 48 horas após a transfecção. Foi observado uma eficiência de 72% e 82 % para os siRNAs 1 e 2, respectivamente.

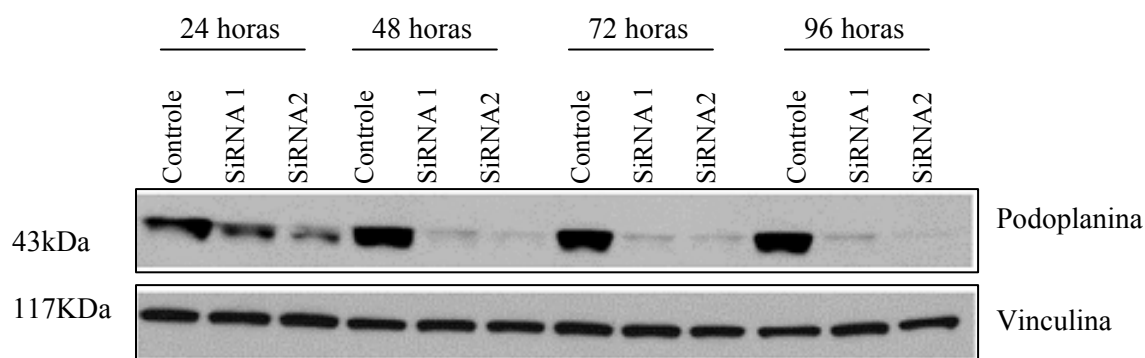


Figura 5 - Confirmação do silenciamento da podoplanina por Western blot. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com 100nM dos siRNAs 1 e 2 e controle com a utilização da lipofectamina. As células transfectadas foram coletadas em 24, 48, 72 e 96 horas para análise da expressão da podoplanina por Western blot. Foi utilizado o anticorpo contra a vinculina para controle. O silenciamento do gene *PDPN* foi confirmado à partir de 48 horas após a transfecção e foi maior 96 horas depois da transfecção com a utilização do siRNA 2. Portanto, o ensaio funcional de invasão foi realizado 96 horas após a transfecção com o siRNA 2. Foi utilizado o anticorpo contra a vinculina para controle.

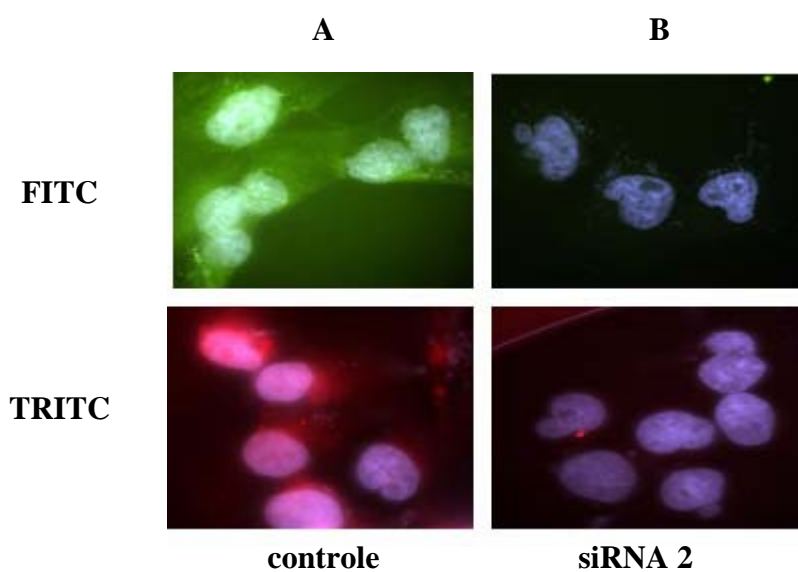


Figura 6 - Análise da expressão da podoplanina por imunofluorescência com anticorpos marcados com FITC e TRITC após a transfecção da linhagem LN319 com o siRNA 2. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com 100nM do siRNA 2 e controle com a utilização da lipofectamina. Após 96 horas foi analisada a expressão da podoplanina por imunofluorescência com anticorpos marcados com FITC e TRITC. Foi observada uma diminuição na expressão da podoplanina nas células transfectadas comparado com o controle.

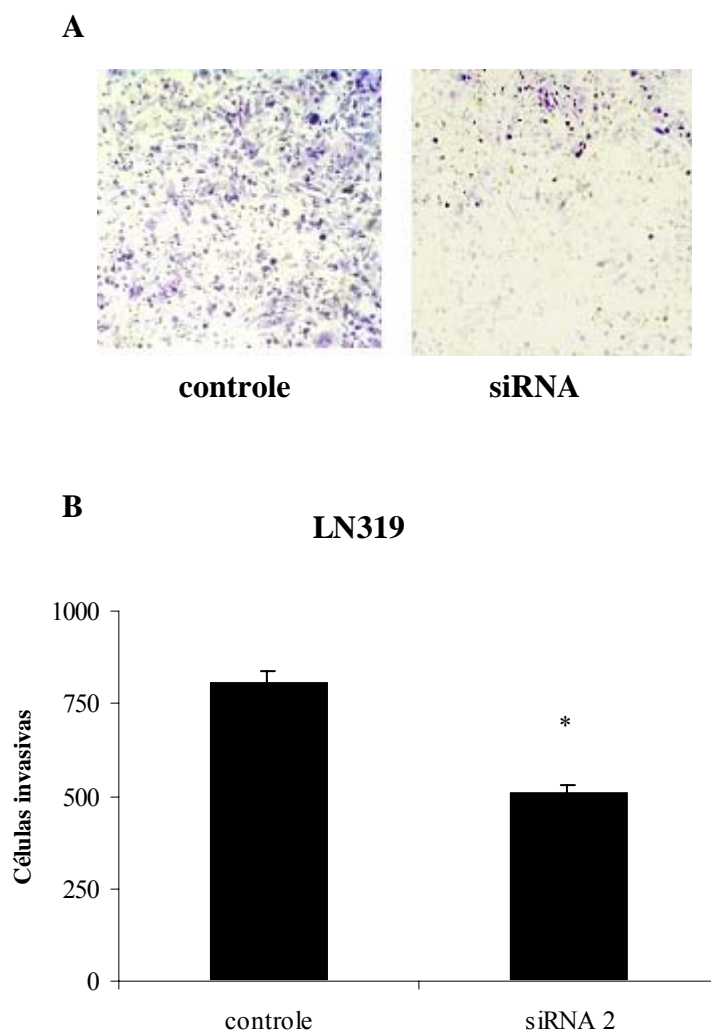


Figura 7 - Análise da invasão celular em após a transfecção da linhagem LN319 com siRNAs específicos para a podoplanina. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com 100nM do siRNA 2 e controle com a utilização da lipofectamina. Após 96 horas foi analisada a capacidade das células de invasão in vitro por meio da utilização de insertos de 8µm contendo matrigel. Após 22 horas as células que invadiram foram fixadas e contadas. Foi observado uma diminuição significativa na quantidade de células invasivas comparado com o controle ($p=0,03$). Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

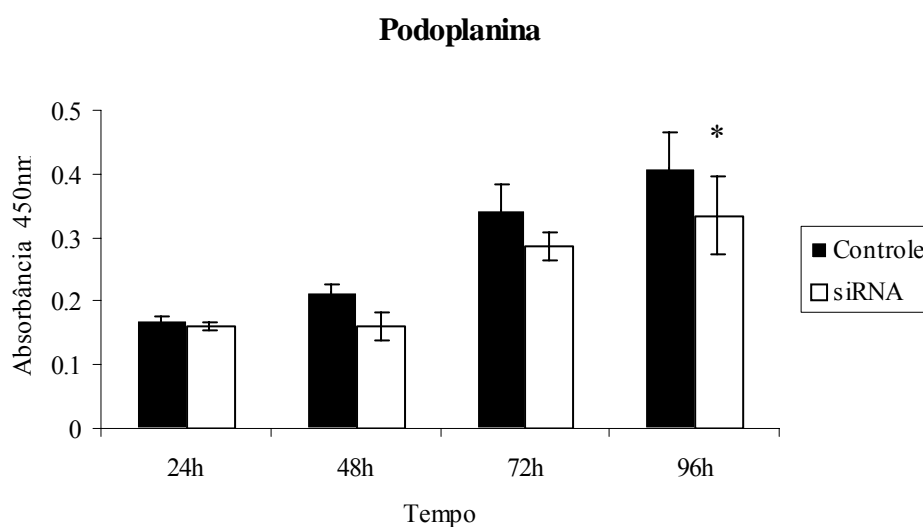


Figura 8 - Análise da proliferação celular em após a transfecção da linhagem LN319 com siRNAs específicos para a podoplanina. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com 100nM do siRNA 2 e controle com a utilização da lipofectamina. Foi analisada a capacidade de proliferação das células transfectadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Foi observado uma diminuição significativa na proliferação 96 horas após a transfecção das células com o siRNA 2, comparado com o controle ($p=0,02$). Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

4.2. MiRNAs diferencialmente expressos em GBM

No intuito de identificar novos miRNAs potencialmente relevantes para a patogenia do GBM, a expressão de miRNAs foi avaliada em 40 pacientes com GBM comparada com amostras de cérebro normal utilizando a tecnologia do miRNA *microarray*. A análise dos dados obtidos indicou 47 miRNAs diferencialmente hipoexpressos quando comparados com o tecido cerebral normal (Tabela 4) e 41 hiperexpressos (Tabela 5). Os miRNAs mais hipoexpressos foram miR-128a, miR-204, miR-128b, miR-211 e miR-139, e os mais hiperexpressos foram miR-21, miR-383, miR-627, miR-10b e miR-196a-2. Os *chips* utilizados continham duas sondas para let-7d, miR-129-2, miR-219-1, miR-181a-5p, miR-196-1, miR-196-2, miR-21, miR-338 e miR-594. Não foram observadas diferenças significativas entre as sondas específicas para o mesmo miRNA. Concordando com estudos previamente citados na literatura, foram encontrados miRNAs com expressão alterada como o miR-21, miR-383, miR-10b, miR-155, miR-29b, miR-149, miR-181a e miR-128a. Além disso, foram identificados outros miRNAs com expressão também alterada como miR-627, miR-196a, miR-206, miR-219, miR-20a, miR-146, miR-99b, miR-145, miR-125a, miR-338, miR-211 e miR-204, os quais não tinham sido citados anteriormente. Dentre os miRNAs hipoexpressos em GBM comparado com o cérebro normal, foram selecionados 4 miRNAs apontados pela análise *in silico* como potenciais reguladores da podoplanina.

Tabela 4 - MiRNAs diferencialmente expressos em GBM analisados por miRNA microarray. Sumário dos resultados da análise por SAM de MiRNAs hipoexpressos por miRNA *microarray* em amostras de GBM comparados com cérebro normal. Foram considerados hiperexpressos os miRNAs que apresentaram valores de expressão maiores que 1,7 e hipoexpressos os miRNAs com valores menores que 0,7.

miRNA*	Média Geométrica de intensidades do GBM	Média Geométrica de intensidades do cérebro normal	Diferença entre as classes
miR-128a	924,451	14600,718	0,063
miR-204	266,490	3921,178	0,068
miR-128b	540,341	7514,830	0,072
miR-211	216,143	2749,941	0,079
miR-139	129,245	1320,600	0,098
miR-299	151,605	1184,037	0,128
miR-338	146,017	950,819	0,154
miR-486	294,752	1874,241	0,157
miR-495	159,829	981,617	0,163
miR-129-2	137,853	772,184	0,179
miR-625	381,831	1932,500	0,198
miR-212	187,582	863,706	0,217
miR-129-2	191,448	827,476	0,231
miR-487b	199,706	862,916	0,231
miR-598	137,584	586,392	0,235
let-7d	198,329	785,808	0,252
miR-487a	153,635	586,610	0,262
miR-181a-5p	423,801	1556,239	0,272
miR-125a	1301,668	4396,766	0,296
miR-433	140,777	458,634	0,307
miR-181a	544,317	1754,195	0,310
miR-181c	315,337	1005,582	0,314
miR-181a-5p	686,000	2150,810	0,319
miR-338	149,316	451,956	0,330
miR-485-3p	271,754	774,735	0,351
miR-138-1	169,904	468,535	0,363
miR-382	204,528	563,269	0,363
miR-140	147,548	405,757	0,364
let-7g	652,514	1773,473	0,368
miR-29b-1	386,205	1038,772	0,372
miR-639	214,461	568,797	0,377
let-7f	802,917	1977,116	0,406
miR-29c	334,123	812,259	0,411
miR-145	354,907	855,840	0,415
miR-663	275,101	645,985	0,426
miR-29b-2	375,931	877,853	0,428
miR-30d	1991,422	4633,603	0,430
miR-99b	2271,020	5239,847	0,433
miR-658	146,513	333,314	0,440
miR-30a-5p	804,836	1796,615	0,448

miRNA*	Média Geométrica de intensidades do GBM	Média Geométrica de intensidades do cérebro normal	Diferença entre as classes
CONTINUA.			
miR-532	222,707	494,130	0,451
miR-219-2	703,892	1552,860	0,453
miR-107	1060,884	2252,509	0,471
miR-149	243,480	501,429	0,486
miR-629	767,816	1544,942	0,497
miR-566	1210,339	2320,923	0,521
miR-422a	209,724	396,098	0,529
miR-324-5p	417,162	786,137	0,531
let-7a-3	2886,262	5408,862	0,534
let-7d	1875,334	3485,329	0,538
miR-429	500,549	889,288	0,563
miR-150	922,408	1568,657	0,588

*Os miRNAs que aparecem com as designações 3p e 5p foram originados das regiões 3' e 5' do miRNA precursor, respectivamente. Os outros miRNAs com as letras 1 e 2 pertencem à mesma família mas são transcritos em regiões cromossômicas diferentes. Finalmente, as designações a e b estão relacionados aos miRNAs da mesma família transcritos nas mesmas regiões cromossômicas.

Tabela 5 - MiRNAs diferencialmente expressos em GBM analisados por miRNA microarray. Sumário dos resultados da análise por SAM de MiRNAs hiperexpressos por miRNA *microarray* em amostras de GBM comparados com cérebro normal. Foram considerados hiperexpressos os miRNAs que apresentaram valores de expressão maiores que 1,7 e hipoexpressos os miRNAs com valores menores que 0,7.

miRNA*	Média Geométrica de intensidades do GBM	Média Geométrica de intensidades do cérebro normal	Diferença entre as classes
miR-594	11346,731	6416,848	1,768
miR-594	26681,829	14966,326	1,783
miR-766	2170,900	1149,342	1,889
miR-7-3p	635,452	333,158	1,907
miR-611	250,381	131,004	1,911
miR-202-3p	253,109	131,004	1,932
miR-320	2012,082	1026,305	1,961
miR-551b	504,249	251,325	2,006
miR-619	7734,771	3799,123	2,036
miR-621	1217,722	590,144	2,063
miR-609	270,764	131,004	2,067
miR-331	4057,132	1903,799	2,131
miR-371	282,912	131,004	2,160
miR-765	287,861	131,004	2,197
miR-326	924,815	410,631	2,252
miR-34	305,109	131,004	2,329

miRNA*	Média Geométrica de intensidades do GBM	Média Geométrica de intensidades do cérebro normal	Diferença entre as classes
CONTINUA.			
miR-550-2	788,782	333,274	2,367
miR-92b	23694,121	9978,680	2,374
miR-494	5321,285	2231,972	2,384
miR-548d-2	318,559	131,004	2,432
miR-122a	964,379	396,327	2,433
miR-92-2	20838,489	8562,402	2,434
miR-550-1	648,668	265,177	2,446
miR-92-1	28529,731	11448,170	2,492
miR-668	466,104	184,880	2,521
miR-17-5p	431,468	166,324	2,594
miR-659	345,291	131,004	2,636
miR-146a	347,638	131,004	2,654
miR-219-1	351,924	131,004	2,686
miR-20a	372,038	131,004	2,840
miR-593	1934,665	674,386	2,869
miR-601	388,704	131,004	2,967
miR-155	391,375	131,004	2,988
miR-219-1	22933,909	7537,058	3,043
miR-595	2774,880	843,027	3,292
miR-196a-1	480,107	131,004	3,665
miR-554	489,468	131,004	3,736
miR-196a-2	500,347	131,004	3,819
miR-196a-1	3660,716	886,649	4,129
miR-206	943,682	226,644	4,164
miR-196a-2	582,454	131,004	4,446
miR-10b	1001,764	131,004	7,647
miR-627	1303,682	131,004	9,951
miR-383	1544,349	131,004	11,789
miR-21	1646,533	131,004	12,569
miR-21	2422,615	131,004	18,493

*Os miRNAs que aparecem com as designações 3p e 5p foram originados das regiões 3' e 5' do miRNA precursor, respectivamente. Os outros miRNAs com as letras 1 e 2 pertencem à mesma família mas são transcritos em regiões cromossômicas diferentes. Finalmente, as designações a e b estão relacionados aos miRNAs da mesma família transcritos nas mesmas regiões cromossômicas.

4.3. Validação dos dados de miRNA microarray por qRT-PCR

Para validação dos dados obtidos pelo miRNA *microarray* foi utilizado outro grupo de 15 pacientes com GBM comparado com amostras de cérebro normal por qRT-PCR. Foram selecionados os miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a, que na análise por miRNA microarray estão hipoexpressos em GBM e que foram apontados pela análise *in silico* como potenciais reguladores da podoplanina (Tabela 6). Os dados obtidos foram validados por qRT-PCR para os miRNAs miR-29b ($p=0,03$) e miR-125a ($p=0,001$) (Figura 9). Para os miR-149 e miR-181a foi observado uma hipoexpressão nas amostras dos pacientes com GBM. Contudo, devido a um amplo desvio padrão entre as amostras os valores não foram estatisticamente significativos, com os valores de p sendo 0,27 e 0,23, respectivamente (Figura 10).

Tabela 6 - MiRNAs selecionados para validação dos dados de miRNA microarray por qRT-PCR. Foram selecionados os miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a apontados pela análise *in silico* como potenciais reguladores da podoplanina. Estão descritos o nome, gene, região cromossômica, alvos validados e artigos relacionados aos miRNAs selecionados.

miRNA	Gene	Região cromossômica	Alvos validados*	Referências
miR- 29b	MIRN29B2	1q32.2	<i>MCL1, DNMT3B, DNMT3A</i>	Mott et al., 2007; Fabbri et al., 2007
miR-125a	MIRN125A	19q13.33	<i>LIN28, ERBB3, ERBB2</i>	Wu et al., 2005; Scott et al., 2007
miR-149	MIRN149	2q37.3	-	-
miR-181a	MIRN181A1	1q31.3	<i>TCL1</i>	Pekarsky et al., 2006

*Dados obtidos do TarBase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>).

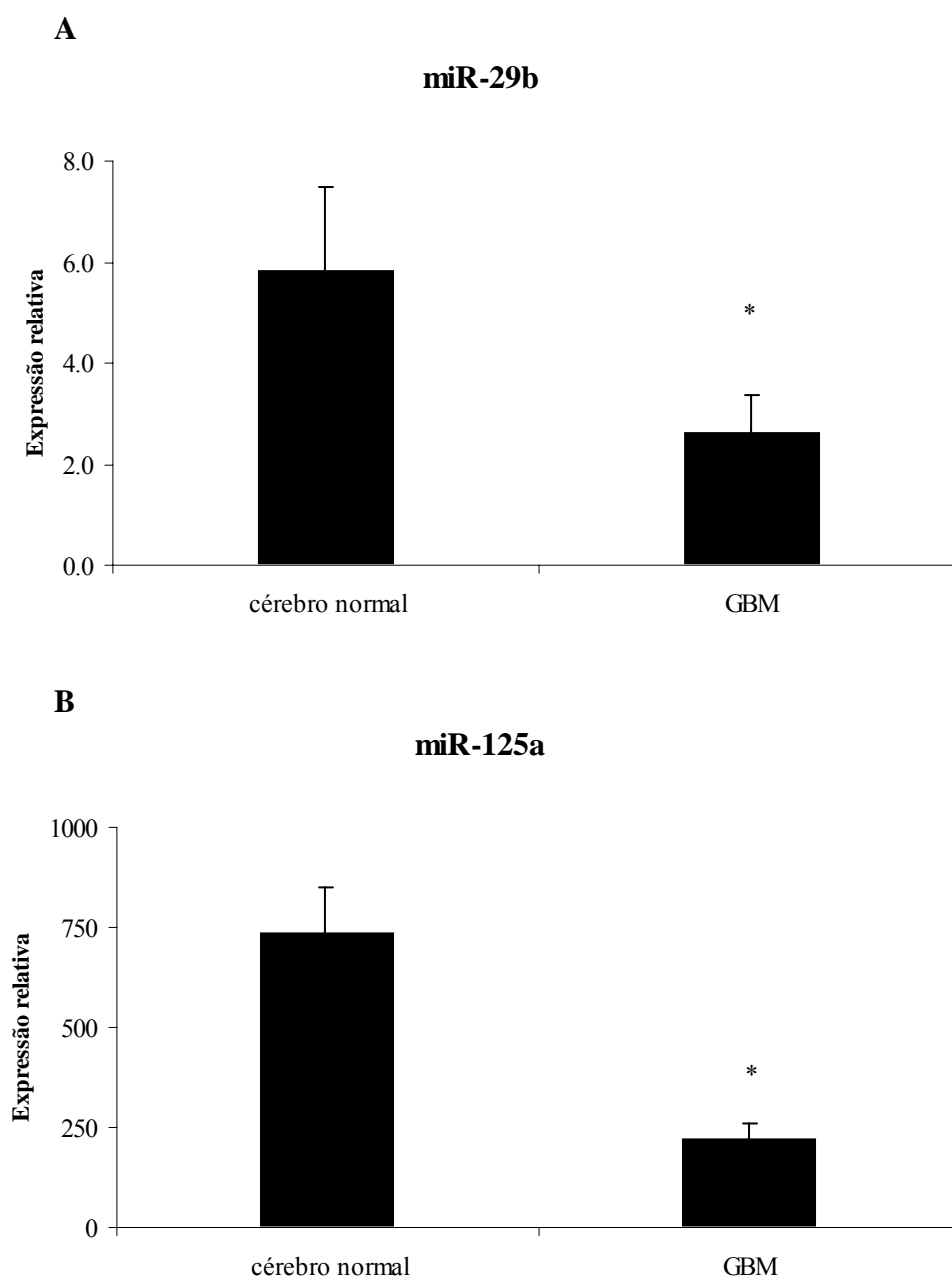


Figura 9 - Validação dos dados obtidos por miRNA microarray por qRT-PCR. Estudo da expressão do miR-29b (A) e miR-125a (B) por qRT-PCR. O miR-29b ($p=0,03$) e miR-125a ($p=0,001$) estão hipoexpressos em GBM. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

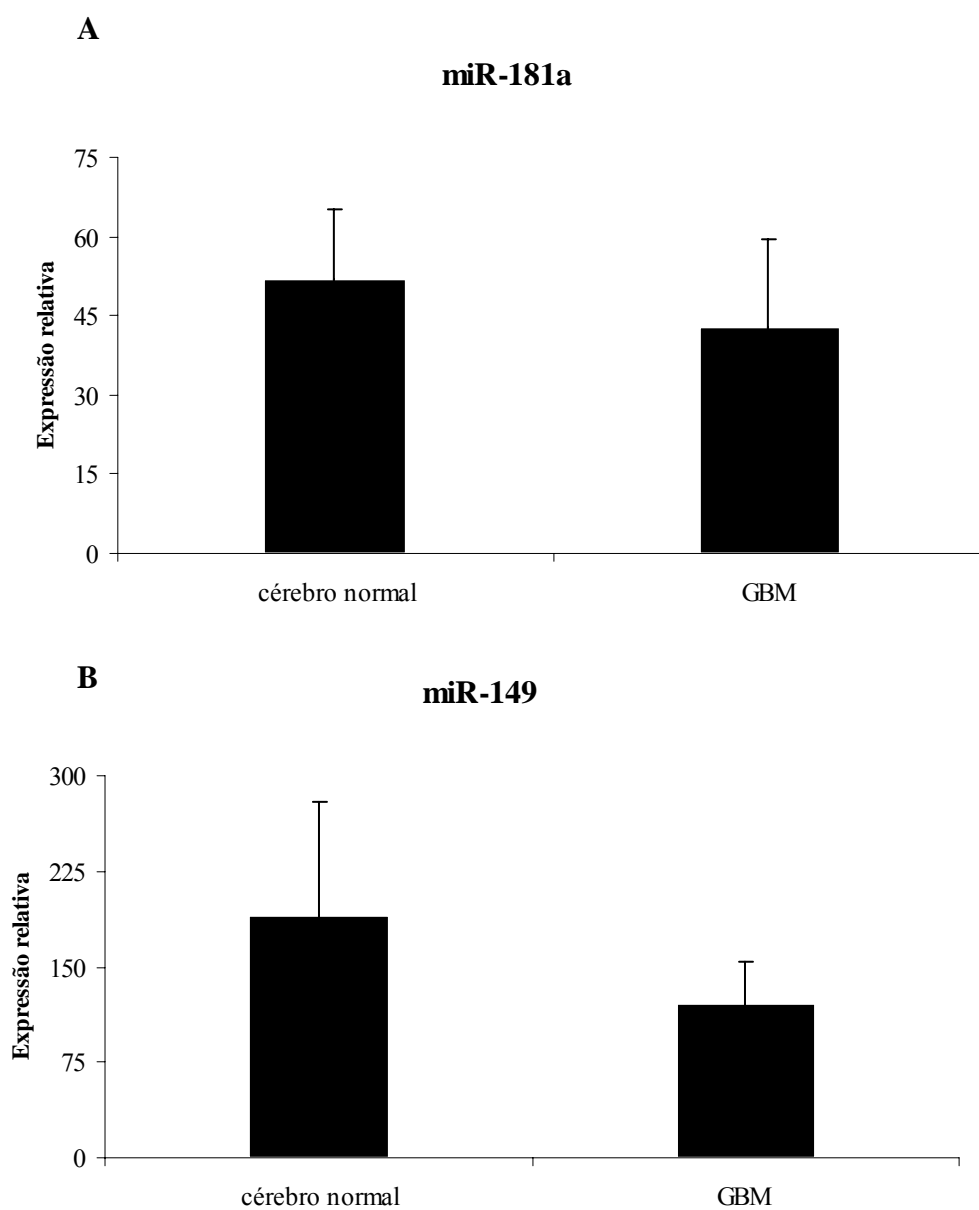


Figura 10 - Estudo da expressão do miR-149 e miR-181a em amostras de GBM comparadas com cérebro normal por qRT-PCR. O miR-149 (A) e miR-181a (B) estão hipoexpressos em GBM. No entanto devido ao alto desvio padrão os valores de expressão encontrados não foram estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os valores de p foram 0,27 e 0,23 para o miR-149 e miR-181a, respectivamente.

4.4. Estudo da expressão dos miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a em células tronco neurais NS2 CD133⁺ e sua contraparte negativa

Devido às células tronco neurais CD133⁺ compartilharem importantes características com as células de GBM e, além disso, promoverem a iniciação de tumor em modelos in vivo, o perfil de expressão dos miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a foi estudado nas células CD133⁺ e CD133⁻ por qRT-PCR. Para este estudo foram isoladas células CD133⁺ e CD133⁻ da linhagem U87. Interessantemente, os miRNAs de estudo que estão hipoexpressos nas amostras de GBM também apresentaram-se hipoexpressos nas células CD133⁺ comparado com o cérebro normal e células CD133⁻, respectivamente. Foram encontrados valores significativos para o miR-29b ($p=0,02$), miR-125a (0,0005) (Figura 11), miR-149 ($p=0,014$) e miR-181a ($p=0,01$) (Figura 12). Estes resultados sugerem que as células CD133⁺ e o GBM apresentam perfis semelhantes de expressão dos miRNAs estudados. A hipoexpressão de miRNAs em células CD133⁺ comparado com CD133⁻ sugere uma potencial participação destes miRNAs na regulação de processos celulares como a diferenciação celular, auto-renovação e tumorigênese.

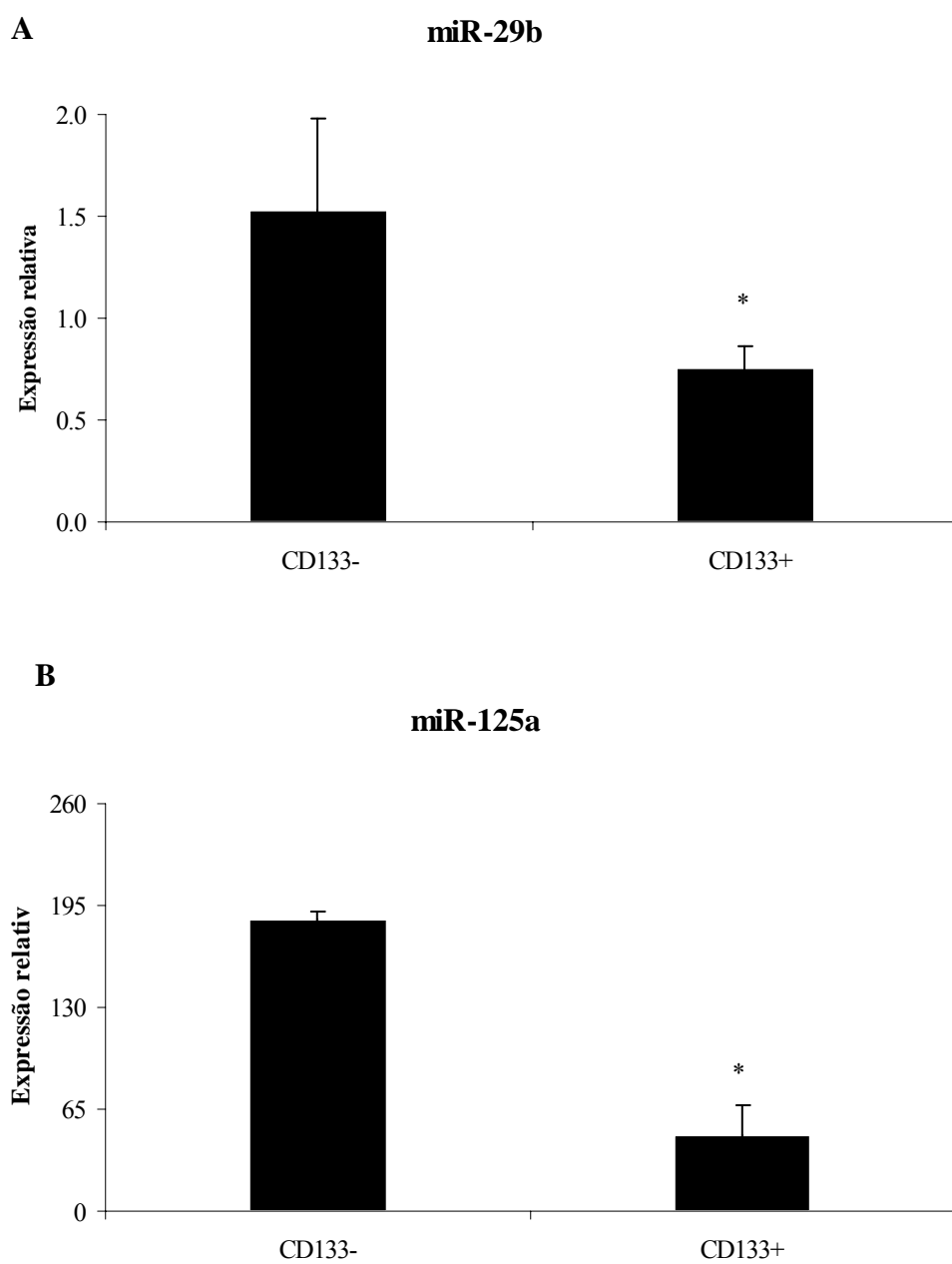


Figura 11 - Estudo da expressão dos miRNAs miR-29b e miR-125a em células NS2 CD133⁺ e NS2 CD133⁻ por qRT-PCR. O miR-29b ($p=0,02$) (A) e miR-125a (B) ($p=0,0005$) estão hipoeexpressos em células CD133⁺. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

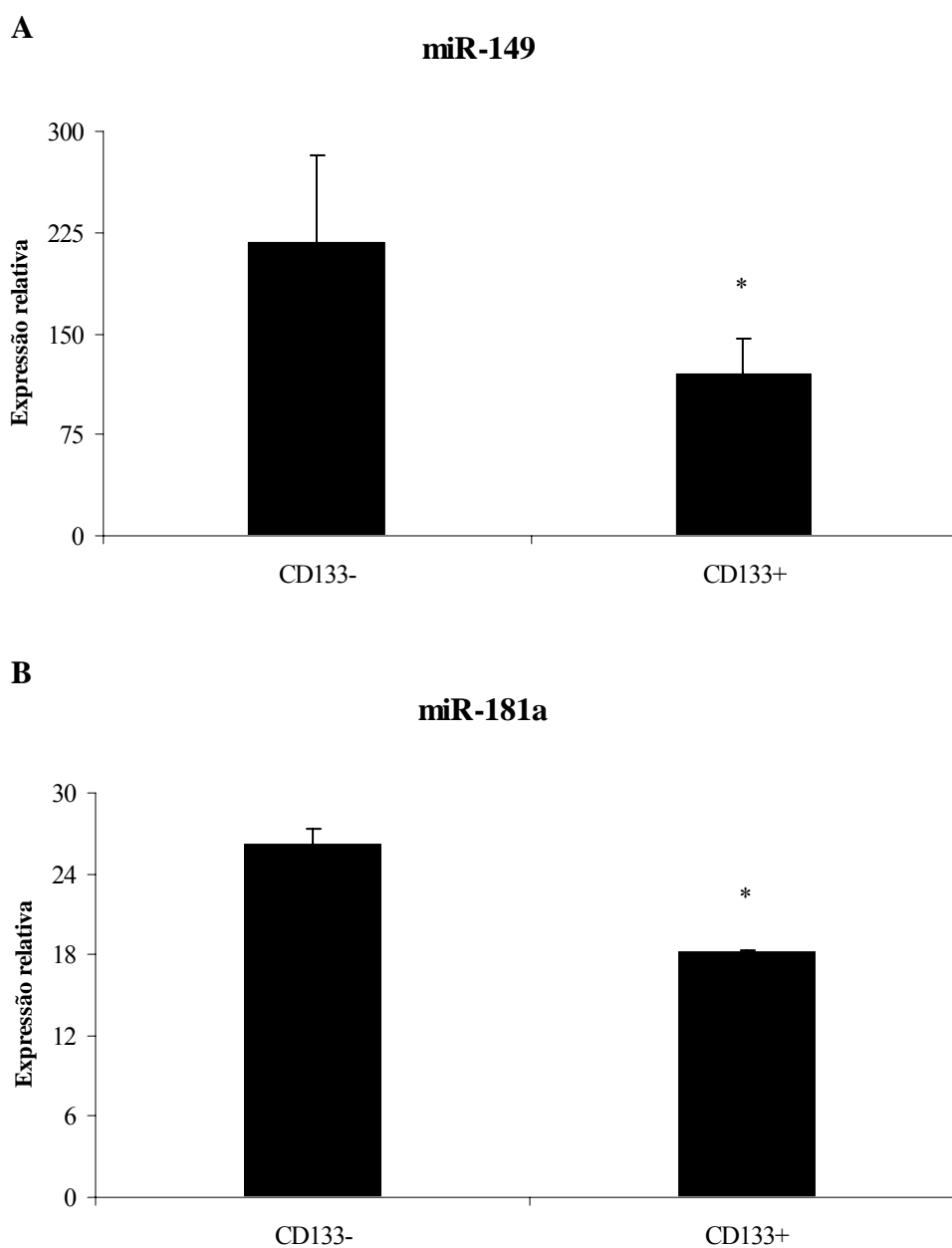
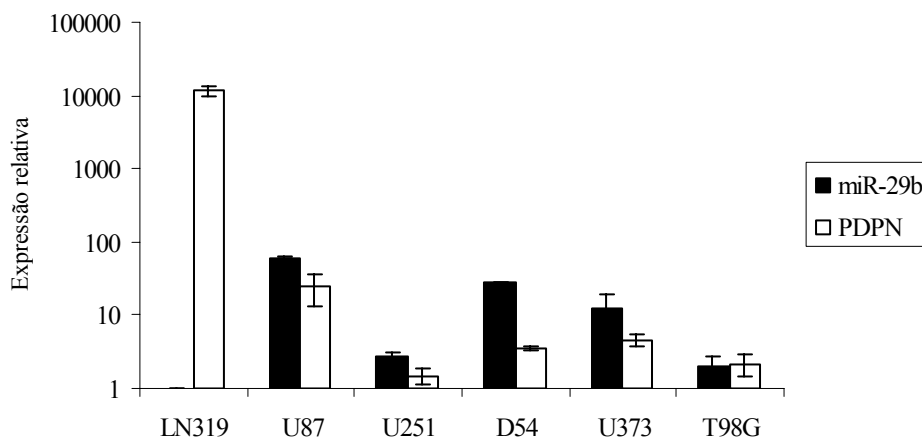


Figura 12 - Estudo da expressão dos miRNAs miR-149 e miR-181a em células NS2 CD133⁺ e NS2 CD133⁻ por qRT-PCR. O miR-149 ($p=0,014$) (A) e miR-181a (A) ($p=0,01$) estão hipoexpressos em células CD133⁺. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

4.5. Correlação inversa entre a expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina nas linhagens de GBM

Baseado nos resultados da validação dos dados de *microarray* por qRT-PCR, foram selecionados os miR-29b e miR-125a no intuito de correlacionar a expressão entre estes miRNAs e a podoplanina. A expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina foi analisada nas linhagens de GBM LN319, U87, U251, D54, U373 e T98G por qRT-PCR. Os resultados demonstraram que a linhagem LN319 expressa altos níveis da podoplanina, mas não expressa o miR-29b (Figura 13A). Além disso, foi observada menor expressão do miR-125a em relação à podoplanina. Em contraste, as linhagens U87, U251, D54, U373 e T98G apresentaram maior expressão do miR-125a em relação à expressão da podoplanina (Figura 13B). Para o miR-29b também foi observado maior expressão nas linhagens U87, U251, D54 e U373 comparado à podoplanina. Entretanto, a linhagem T98G apresentou valores semelhantes tanto para o miR-29b quanto para a podoplanina. Estes resultados sugerem uma correlação inversa entre os níveis de expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina nas linhagens de GBM.

A

Expressão do miR-29b e podoplanina

B

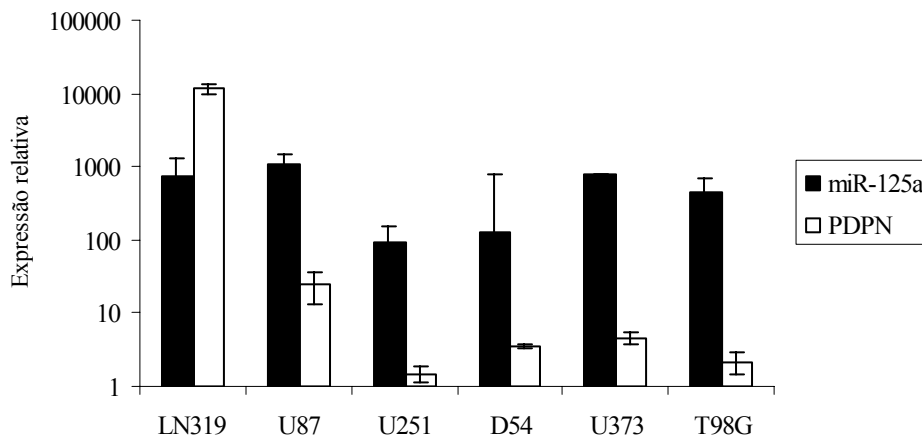
Expressão do miR-125a e podoplanina

Figura 13 - Estudo comparativo de expressão do miR-29b e miR-125a e da podoplanina em linhagens de GBM. A linhagem LN319 hiperexpressa a podoplanina e não expressa o miR-29b (A). Com relação ao miR-125a, a LN319 apresenta uma expressão maior da podoplanina (B). Nas outras linhagens analisadas, exceto a linhagem T98G para o miR-29b, foi observada uma maior expressão dos miRNAs estudados em relação à podoplanina (A;B).

4.6. Regulação da podoplanina pelos miRNAs miR29b e miR-125a

No intuito de confirmar a regulação do gene *PDPN* pelos miR-29b e miR-125a foi analisada a expressão da podoplanina por Western blot e imunofluorescência após a transfecção destes miRNAs. Para confirmação final foi realizado o ensaio da luciferase com vetores mutantes como controle. Primeiramente, foi analisado a eficiência da transfecção por qRT-PCR nas linhagens de GBM após 24 horas. Neste estudo foi analisado quantas vezes o miRNA estudado foi mais expresso do que o controle quando transfectado nas linhagens de GBM. Para a linhagem LN319 foram encontrados os valores 589,57 e 718,5 vezes mais expressos que o controle para o miR-29b e miR-125a, respectivamente. Para a linhagem U87 foram encontrados os valores 1332,78 e 3045,39 vezes mais expressos que o controle para o miR-29b e miR-125a, respectivamente. Finalmente, para a linhagem U251 foram encontrados os valores 808,22 e 1558,0 vezes mais expressos que o controle para o miR-29b e miR-125a, respectivamente (Figuras 14A e 14B). No intuito de identificar possíveis miRNAs reguladores da podoplanina, a linhagem LN319 foi transfectada com os miR-29b e miR-125a e após 48 horas a expressão da podoplanina foi analisada por Western blot e imunofluorescência. Foi observada uma significativa diminuição da expressão da podoplanina nas células da linhagem LN319 transfectadas com miR-29b e miR-125a comparado com o controle (Figuras 15 e 16). A regulação pelo miR-29b e miR-125a da expressão da podoplanina foi confirmada pelo ensaio da luciferase. Baseado na análise in silico, os miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a foram preditos como potenciais reguladores do gene *PDPN*. No entanto, foram escolhidos os miR-29b e miR-125a baseado nos resultados obtidos na validação dos dados por qRT-PCR. As regiões 3'UTR do gene *PDPN* preditas para miR-29b e miR-125a estão dispostas na Figura 17. Para a realização do ensaio da luciferase foram clonadas as regiões 3'UTR do gene *PDPN* em vetores pGL3-básico. Para amplificação das regiões 3'UTR foi

utilizada uma amostra de DNA genômico da linhagem MRC5. A qualidade da amostra foi testada por PCR para o gene *GAPDH* (Figura 18A). Os produtos de PCR da amplificação das regiões 3'UTR foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (Figura 18B). Para seleção dos clones foi realizada a digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Figura 19). Foi observada uma diminuição significativa da atividade da luciferase nas células transfectadas com os miRNAs miR-29b e miR-125a comparado com o controle. Com relação ao miR-29b, houve uma diminuição significativa da atividade da luciferase quando as células foram transfectadas com o vetor pGL3 wt1 e miR-29b comparado com o controle ($p=0,0017$) (Figura 20). A mutação dos sítios de interação do miR-29b resgatou a atividade da luciferase confirmando portanto, a interação direta do miR-29b na região 3'UTR do gene *PDPN*. Para o miR-125a foi observada uma diminuição significativa da atividade da luciferase quando as células foram transfectadas com o vetor pGL3 wt2 e miR-125a comparado com o controle ($p=0,003$) (Figura 21). A mutação dos sítios de interação do miR-125a resgatou a atividade da luciferase confirmando portanto, a interação direta do miR-125a na região 3'UTR do gene *PDPN*.

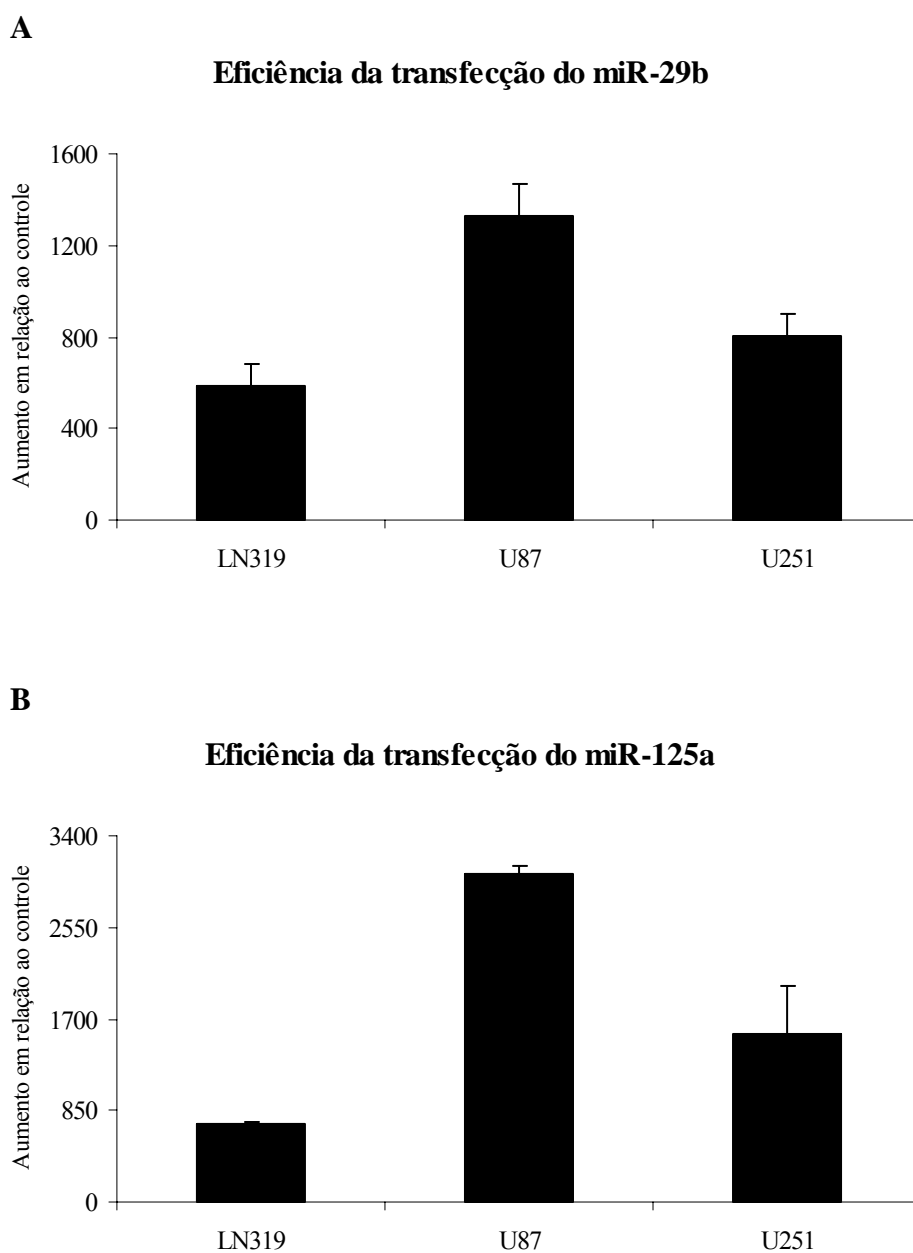


Figura 14 - Análise da eficiência da transfecção do miR-29b e miR-125a nas linhagens LN319, U87 e U251 por qRT-PCR. As linhagens LN319, U87 e U251 foram transfectadas com os precursores do miR-29b, miR-125a e controle na concentração de 100nM com a utilização de lipofectamina. Após 24 horas da transfecção a eficiência por qRT-PCR foi confirmada para o miR-29b (A) e miR-125a (B). O valor de expressão do controle foi considerado como 1.

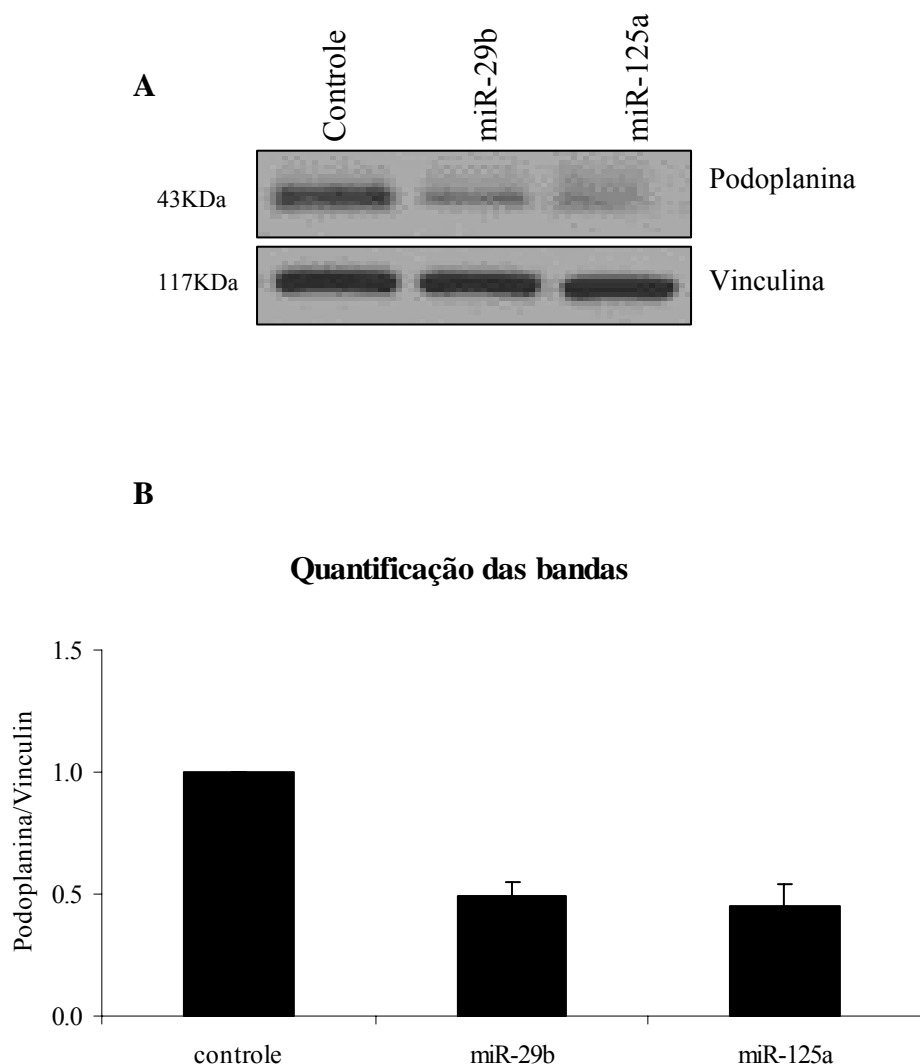


Figura 15 - Western blot após extração de proteínas da linhagem LN319 transfectada com os miRNAs miR-29b e miR-125a. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com os precursores do miR-29b, miR-125a e controle na concentração de 100nM, com a utilização de lipofectamina. Após 48 horas foi analisada a expressão da podoplanina por Western blot mostrando a redução da expressão da podoplanina nas células transfectadas com o miR-29b e miR-125a comparado com o controle. As bandas foram normalizadas com relação à intensidade encontrada para a vinculina sendo atribuído ao controle o valor de 1 (B).

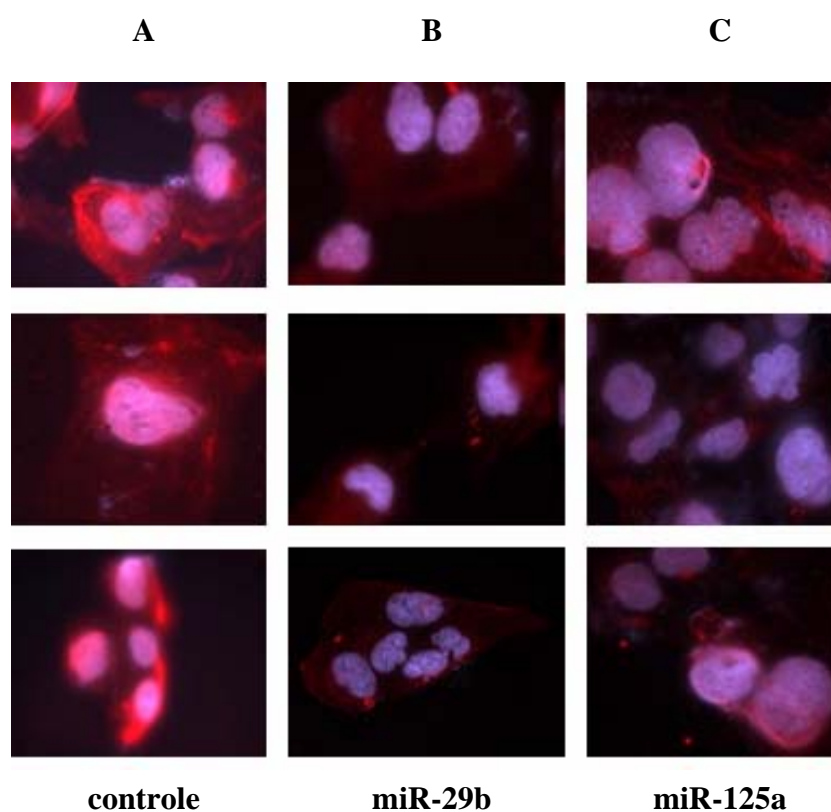


Figura 16 - Imunofluorescência da linhagem LN319 transfectada com o miR-29b , miR-125 e controle. A linhagem LN319 foi transfectada com o miR-29b , miR-125 e controle na concentração de 100nM com lipofectamina. Após 48 horas foi analisado a expressão da podoplanina por imunofluorescência. Foi observada uma redução na intensidade da expressão da podoplanina na linhagem LN319 transfectada com o miR-29b (B) e miR-125a (C) comparado com o controle (A).

A

Posição 1114-1135 do PDPN 3' UTR	5' ...GAATAATCAACTAG—GAAATCTA...
miR-29b	3' G--AUUCGGUGGUACACUUUGGUC
Posição 1192-1213 do PDPN 3' UTR	5' ...A-AAGACATCCATTTTAGATCAC...
miR-29b	3' GAUUCGGU-GGUACACUUUGGUC
Posição 1968-1974 do PDPN 3' UTR	5' ...UGGUCACACCUGUGUUGGUGCUC...
miR-29b	3' UUGUGACUAAAGUUUACCACGAU

B

Posição 779-785 do PDPN 3' UTR	5'...CCCUCAGAUGAUGAGGAGCCAGG...
miR-125a	3' CCCUCACUUCUGUGCCUCGGUCU
Posição 933-939 do PDPN 3' UTR	5' ...UGUGUUUGAAACCAA-GAGCCAGU...
miR-125a	3' CCCUCACUUCUGUGCCUCGGUCU

Figura 17 - Regiões 3'UTR do gene *PDPN* preditos para interação com o miR-29b e miR-125a. Alvos preditos para o miR-29b (A) e miR-125a (B) por meio da análise *in silico* com a utilização dos programas os programas Target Scan (<http://www.targetscan.org/>), miRanda (<http://microna.sanger.ac.uk/index.shtml>), RNAhybrid (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>) e PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) dentro da região 3'UTR.

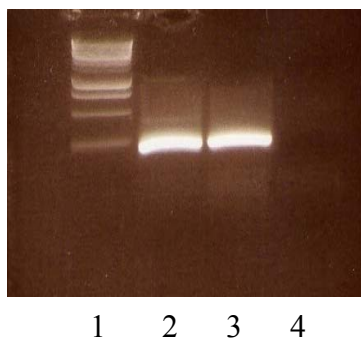
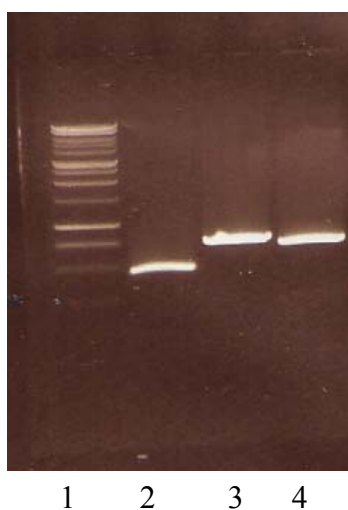
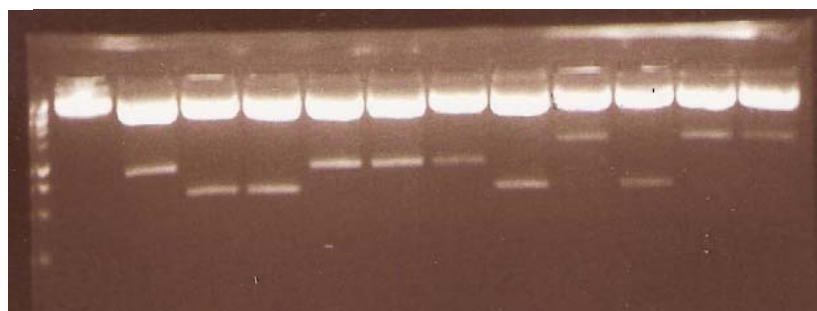
A**B**

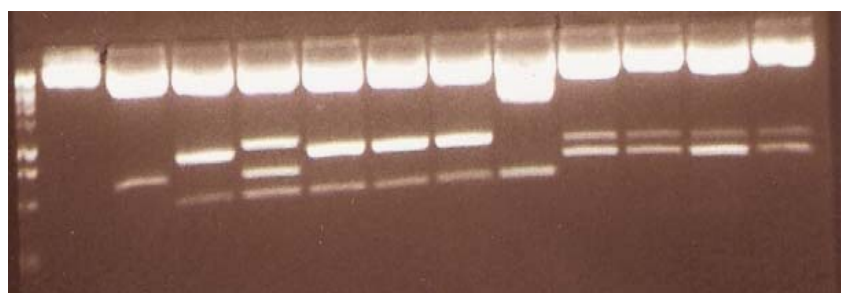
Figura 18 - Verificação da qualidade do DNA genômico e amplificação das regiões 3'UTR do gene *PDPN*. Foi analisada por PCR a qualidade do DNA genômico utilizado para amplificação das regiões 3'UTR do gene *PDPN* por meio da amplificação do *GAPDH* (A). (1) Marcador molecular de 1kb, (2) amostra de DNA da linhagem 293, (3) amostra de DNA da linhagem MRC5 (4) branco. Para amplificação das regiões 3'UTR do gene *PDPN* foi utilizado a amostra de DNA genômico da linhagem MRC5 (B). (1) Marcador molecular de 1kb, (2) região 3'UTR amplificada com os primers 1 (200bp), (3) região 3'UTR amplificada com os primers 2 (600bp) e (3) região 3'UTR amplificada com os primers 3 (600bp). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE com brometo de etídeo durante 1 hora a 100 V.

A



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

B



M 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

Figura 19 - Seleção dos clones com as regiões 3'UTR do gene *PDPN* com a enzima de restrição *ECORI*. Para verificar se os clones gerados continham os insertos com as regiões 3'UTR foi realizada a digestão dos plasmídeos TOPO TA com a enzima *ECORI*. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. Os clones selecionados foram 2, 3, 10 e 11 (A) e 14 e 20 (B). (M) Marcador molecular de 1kb, (1) e (13) plasmídeo sem digestão.

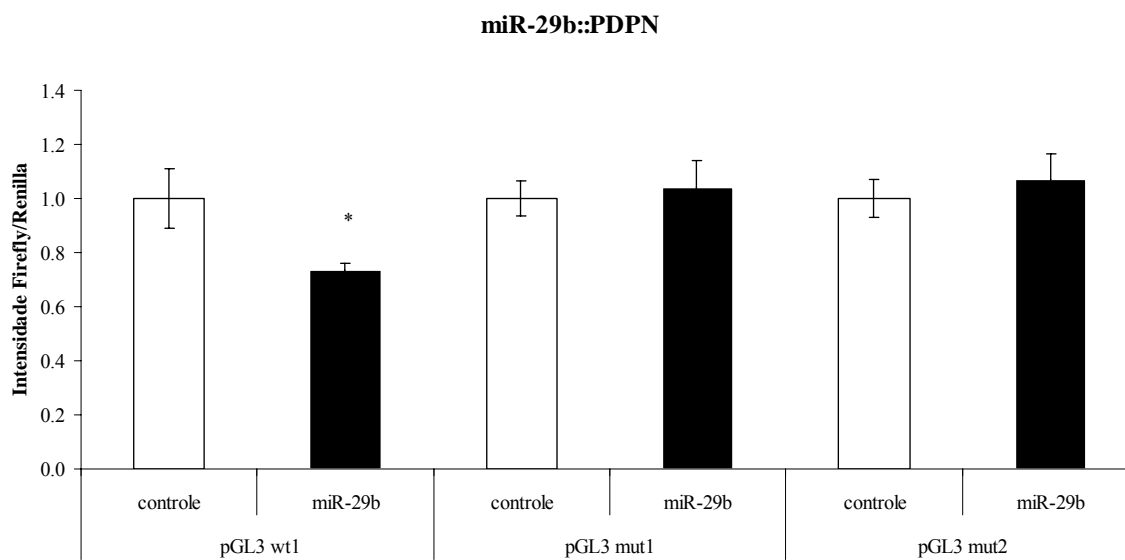


Figura 20 - Ensaio da luciferase demonstrando que o miR-29b regula a expressão da podoplanina pela interação direta com a região 3'UTR. Para o miR-29b foi observado que a região contendo o sítio de interação estava presente no vetor pGL3wt1. As diferenças foram estatisticamente significativas quando comparadas com o controle ($p=0,0017$). A mutação dos sítios de interação do miR-29b resgatou a atividade da luciferase confirmando portanto, a interação direta do miR-29b na região 3'UTR do gene *PDPN*. Os dados apresentados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste-*t* de Student).

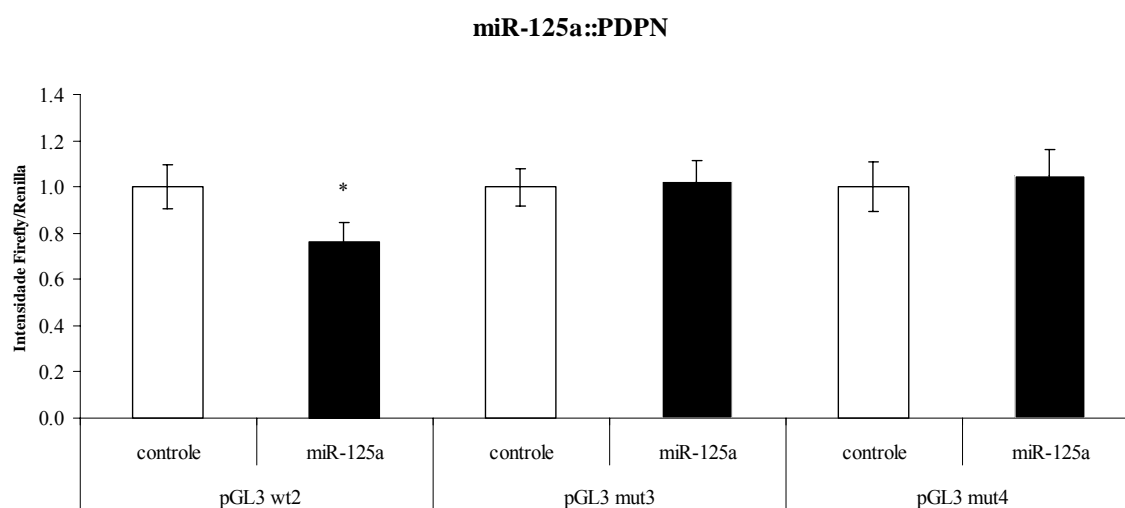


Figura 21 - Ensaio da luciferase demonstrando que o miR-125a regula a expressão da podoplanina pela interação direta com a região 3'UTR. Para o miR-125a foi observado que a região contendo o sítio de interação estava presente no vetor pGL3wt2. As diferenças foram estatisticamente significativas quando comparadas com o controle ($p=0,003$). A mutação dos sítios de interação do miR-125a resgatou a atividade da luciferase confirmando portanto, a interação direta do miR-125a na região 3'UTR do gene *PDPN*. Os dados apresentados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste-*t* de Student).

4.7. Inibição da invasão celular pelos miRNAs miR-29b e miR-125a em linhagens de GBM

Como foi demonstrado que os miR-29b e miR-125a interagem com a região 3'UTR do gene *PDPN* diminuindo os níveis de expressão da podoplanina, o efeito destes miRNAs na invasão celular foi avaliado. Uma significativa redução na habilidade de invasão das células transfectadas foi observada comparado com o controle. Foi também demonstrada uma redução de 40% ($p=0,0003$) e de 23% ($p=0,005$) na invasão na linhagem LN319 transfectada com o miR-29b e miR-125a, respectivamente, comparado ao controle (Figura 22). Na linhagem U251 transfectada com o miR-29b e miR-125a foi observado uma redução de 23,5% ($p=0,03$) e 56% ($p=0,0008$), respectivamente. (Figura 23). Estes resultados sugerem uma participação dos miRNAs-29b e miR-125a no processo de invasão em GBMs.

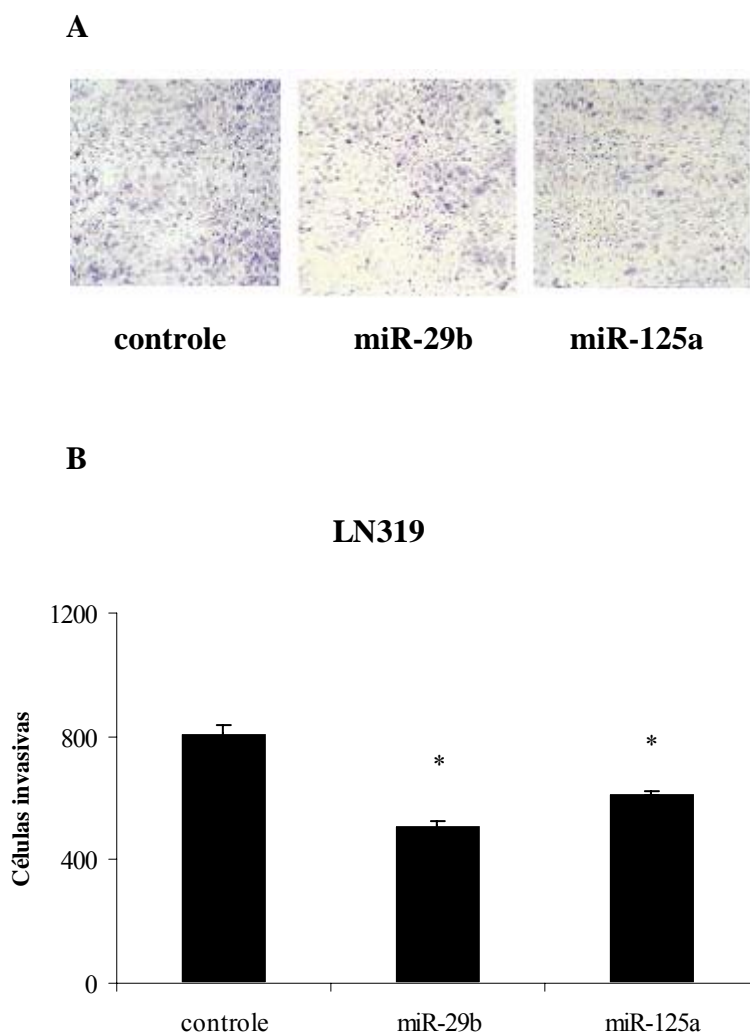


Figura 22 - Análise da invasão celular em após a transfecção da linhagem LN319 com o miR-29b e miR-125a. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com 100nM dos precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Após 96 horas foi analisada a capacidade das células de invasão in vitro por meio da utilização de insertos de 8µm contendo matrigel. Após 22 horas as células que invadiram foram fixadas e contadas. Foi observado uma diminuição significativa na invasão das células transfectadas com o miR-29b ($p=0,0003$) e miR-125a ($p=0,005$), comparado com o controle. Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste-*t* de Student).

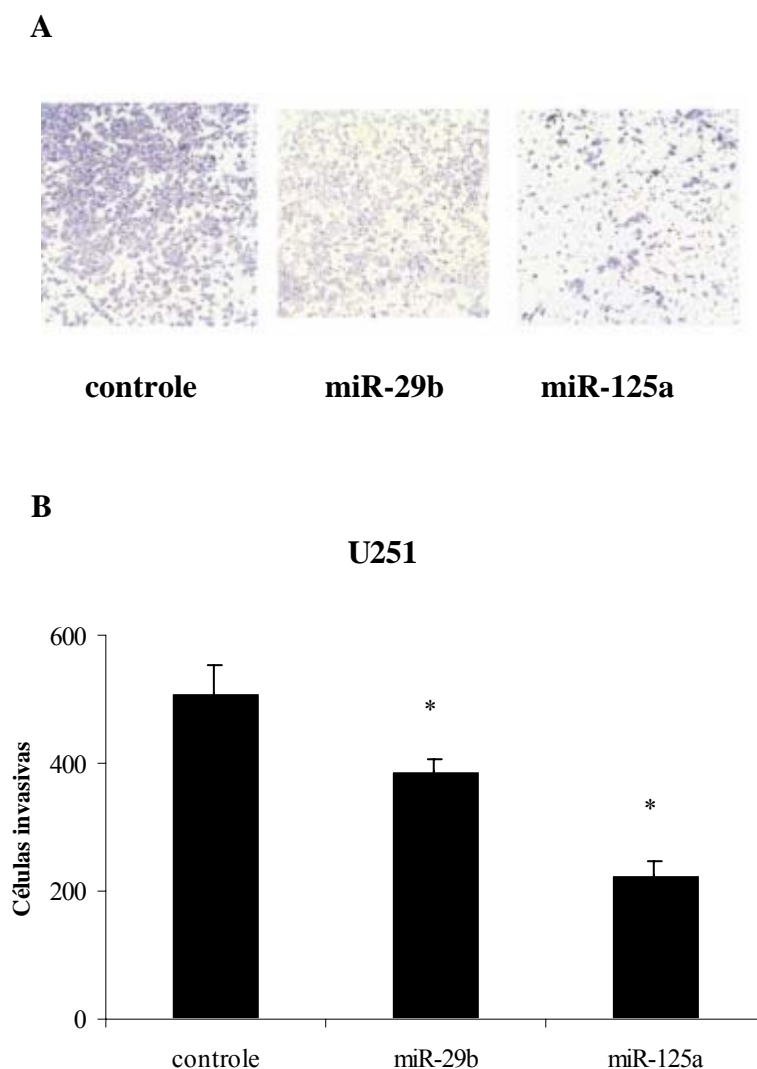


Figura 23 - Análise da invasão celular em após a transfecção da linhagem U251 com o miR-29b e miR-125a. As células da linhagem U251 foram transfectadas com 100nM dos precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Após 96 horas foi analisada a capacidade das células de invasão *in vitro* por meio da utilização de insertos de 8µm contendo matrigel. Após 22 horas as células que invadiram foram fixadas e contadas. Foi observado uma diminuição significativa na invasão das células transfectadas com o miR-29b ($p=0,03$) e miR-125a ($p=0,0008$), comparado com o controle. Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste-*t* de Student).

4.8. Expressão dos miR-29b e miR-125a em amostras de tumor xenográfico de camundongos SCID

No intuito de verificar a dinâmica da expressão dos miR-29b e miR-125a em modelo in vivo, a expressão destes miRNAs foi analisada nas amostras de tumor xenográfico originado de células parentais da linhagem U251 administradas por meio de injeções intracranianas em camundongos SCID. Após o sacrifício dos animais, foram separadas as células da região central do tumor (células não invasivas) e as células que invadiram o tecido normal (células invasivas). Foi realizada a análise da expressão do miR-29b e miR-125a por qRT-PCR. A expressão do miR-29b e miR-125a foi comparada entre as células parentais e as células selecionadas em matrigel e entre as células invasivas e não invasivas provenientes do tumor xenográfico. Foi observada diminuição da expressão do miR-29b nas células com alto perfil invasivo selecionadas em matrigel comparado com as células parentais. Não houve diferença na expressão do miR-29b entre as células não invasivas e invasivas do tumor xenográfico (Figura 24A). Houve uma diminuição da expressão do miR-125a nas células selecionadas em matrigel comparado com as células parentais e nas células invasivas comparadas com as células não invasivas do tumor xenográfico ($p=0,001$) (Figura 24B).

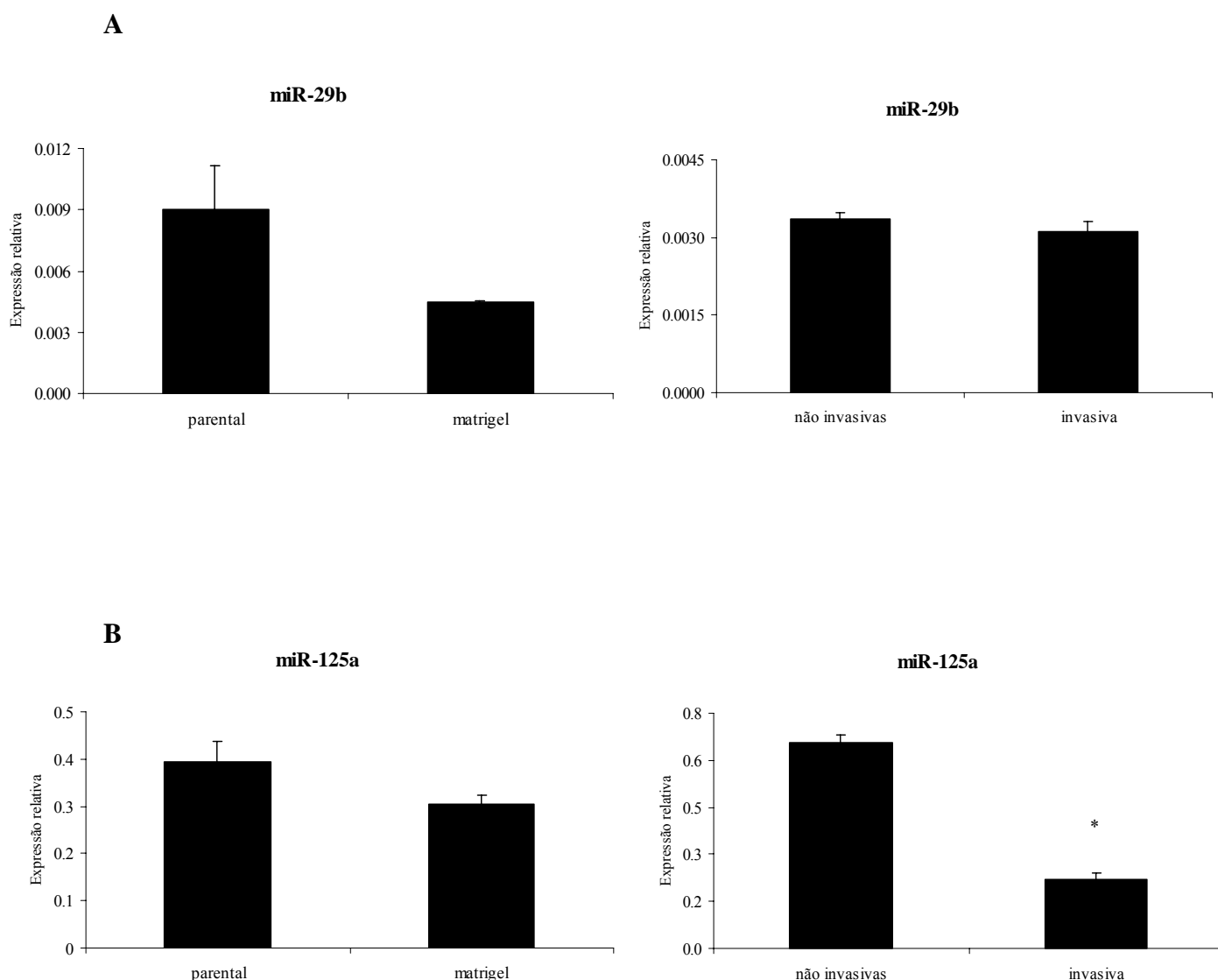


Figura 24 - Análise da expressão do miR-29b e miR-125a em tumor xenográfico em camundongos SCID. Foi comparada a expressão do miR-29b e miR-125a entre as células do tumor xenográfico não invasivas e invasivas e entre as células parentais e as selecionadas em matrigel. Foi observada diminuição da expressão do miR-29b nas células parentais comparado com as células selecionadas em matrigel. Não houve diferença na expressão do miR-29b entre as células não invasivas e invasivas do tumor xenográfico (A). Houve uma diminuição da expressão do miR-125a nas células parentais comparados com as células selecionadas em matrigel e nas células não invasivas comparadas com as células invasivas do tumor xenográfico ($p=0,001$) (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

4.9. Indução da apoptose pelo miR-29b e miR-125a nas linhagens de GBM

No intuito de analisar qual o papel desempenhado pelos miRNAs miR-29b e miR-125a na apoptose em GBMs, foram utilizadas as linhagens U251 com a TP53 mutada (CGT→CAT/Arginina→Histidina) e a linhagem U87, que apresenta a TP53 selvagem (Van Meir et al., 1994). As células com a TP53 selvagem transfectadas com o miR-29b apresentaram um número significativamente maior de células apoptóticas em relação ao controle ($p=0,01$). No entanto, as células com TP53 selvagem transfectadas com o miR-125a apresentaram um número significativamente menor de células apoptóticas comparado com o controle ($p=0,02$) (Figura 25). Não foi observada diferença significativa entre as células com a TP53 mutada transfectadas com o miR-29b e o controle. Entretanto, as células com TP53 mutada quando transfectadas com o miR-125a apresentaram um número de células apoptóticas significativamente maior em relação ao controle ($p=0,04$) (Figura 26).

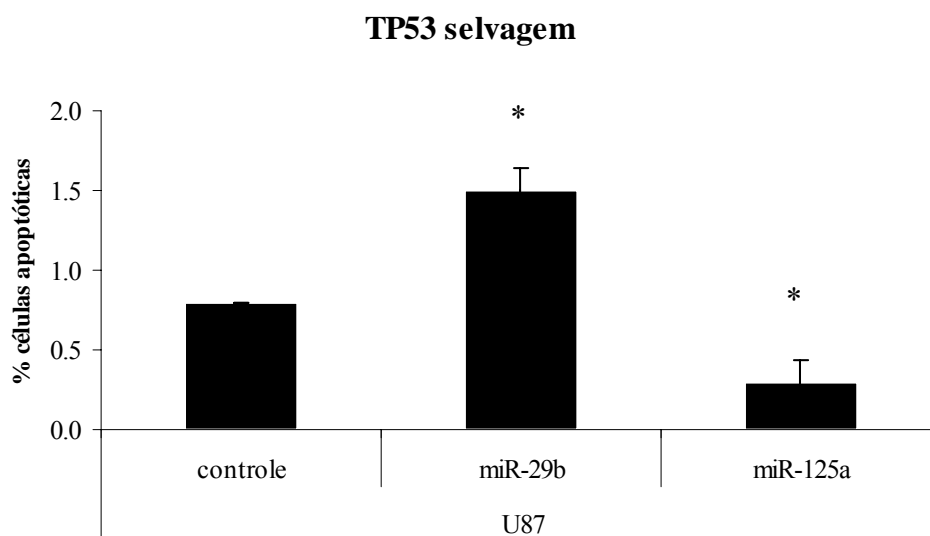


Figura 25 - Análise da apoptose celular após a transfecção da linhagem U87 e U251 com o miR-29b e miR-125a. As células foram transfectadas com 100nM dos precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Após 48 horas foi analisada a porcentagem das células apoptóticas em relação ao controle. As células U87 transfectadas com o miR-29b apresentaram um número significativamente maior de células apoptóticas em relação ao controle ($p=0,01$). Por outro lado, quando estas células foram transfectadas com o miR-125a apresentaram um número significativamente menor comparado com o controle ($p=0,02$). Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

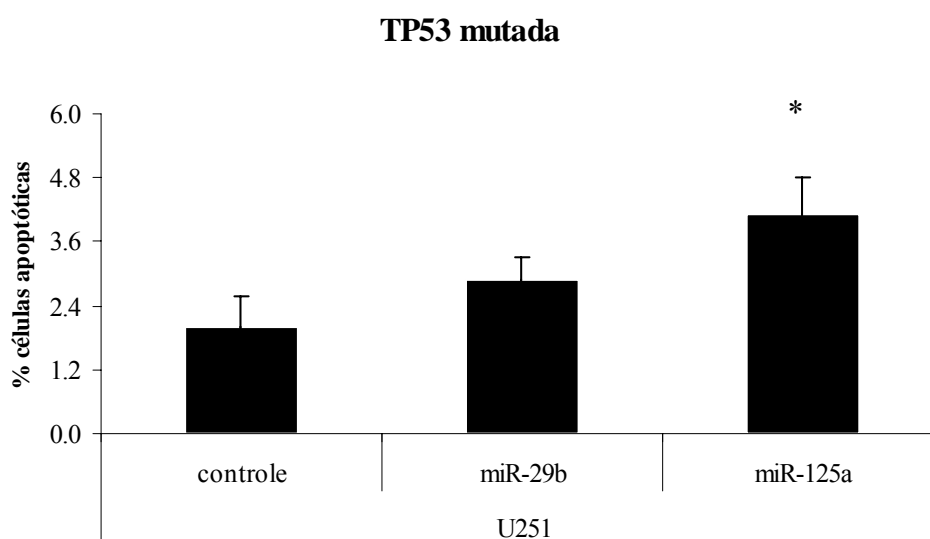


Figura 26 - Análise da apoptose celular após a transfecção da linhagem U251 com o miR-29b e miR-125a. As células foram transfectadas com 100nM dos precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Após 48 horas foi analisada a porcentagem das células apoptóticas em relação ao controle. Não foi observada diferença significativa nas células transfectadas com o miR-29b em relação ao controle. Entretanto, as células transfectadas com o miR-125a apresentaram um número de células apoptóticas significativamente maior em relação ao controle ($p=0,04$). Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

4.10. Impacto da hiperexpressão do miR-29b e miR-125a na proliferação em GBMs

Foi analisado o impacto da hiperexpressão dos miR-29b e miR-125a na proliferação em linhagens de GBM. Interessantemente, não foi observado diferença significativa nas linhagens U251 e LN319 transfectadas com o miR-29b e miR-125a, comparado com o controle (Figuras 27 e 28, respectivamente). É interessante notar que a linhagem LN319 também apresenta mutação em TP53 (CGC→CAC/Arginina→Histidina) (Van Meir et al., 1994). Em contraste, na linhagem U87, com a TP53 selvagem, foi observado uma diminuição significativa na proliferação nas células transfectadas com miR-29b em relação ao controle ($p=0,0002$). No entanto, foi observado um aumento na proliferação das células transfectadas com o miR-125a comparado com o controle ($p=0,003$) (Figura 29). Estes resultados sugerem que, como foi também observado na apoptose, o miR-29b atua na proliferação de forma dependente da presença da TP53 selvagem. Por outro lado, o miR-125a aumenta a proliferação das células transfectadas na presença da TP53 mutada.

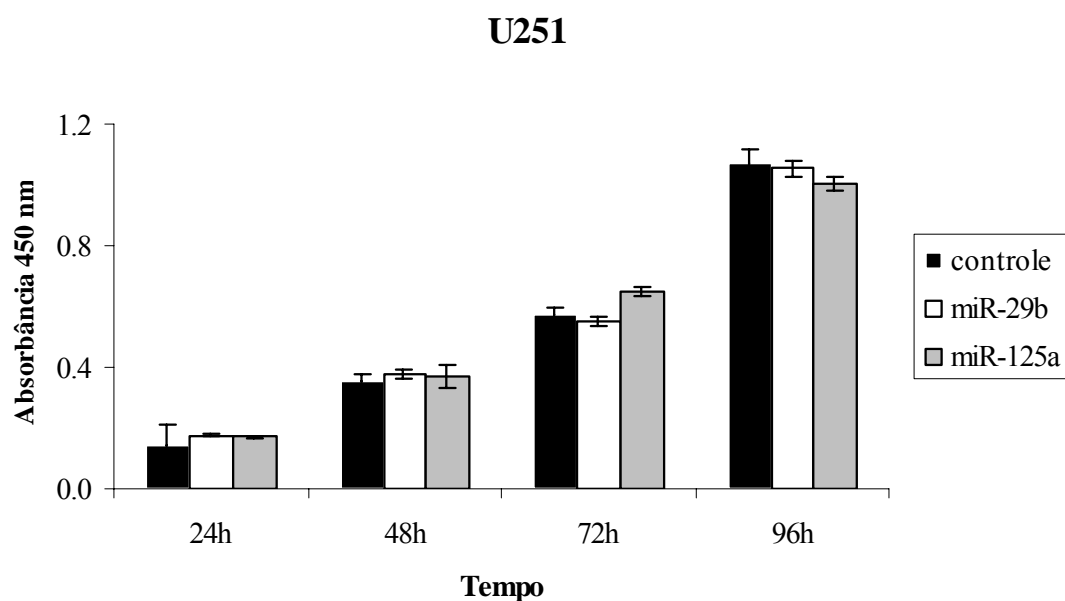


Figura 27 - Análise da proliferação celular após a transfecção da linhagem U251 com o miR-29b e miR-125a. As células da linhagem U251 foram transfectadas com 100nM com os precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Foi analisada a capacidade de proliferação das células transfectadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Não foram observadas diferenças significativas. Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ (teste-*t* de Student).

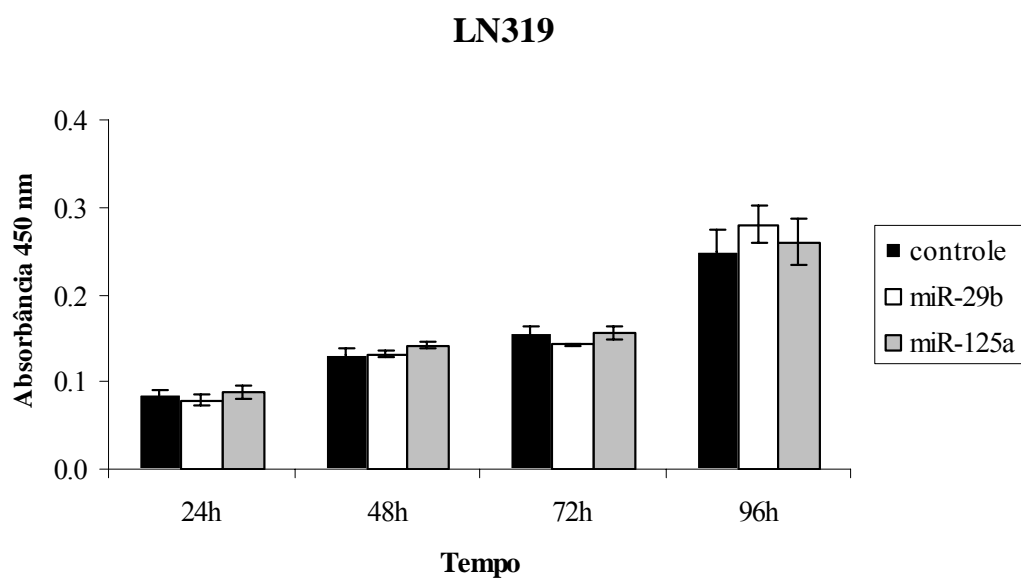


Figura 28 - Análise da proliferação celular após a transfecção da linhagem LN319 com o miR-29b e miR-125a. As células da linhagem LN319 foram transfectadas com 100nM com os precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Foi analisada a capacidade de proliferação das células transfectadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Não foram observadas diferenças significativas. Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ (teste-*t* de Student).

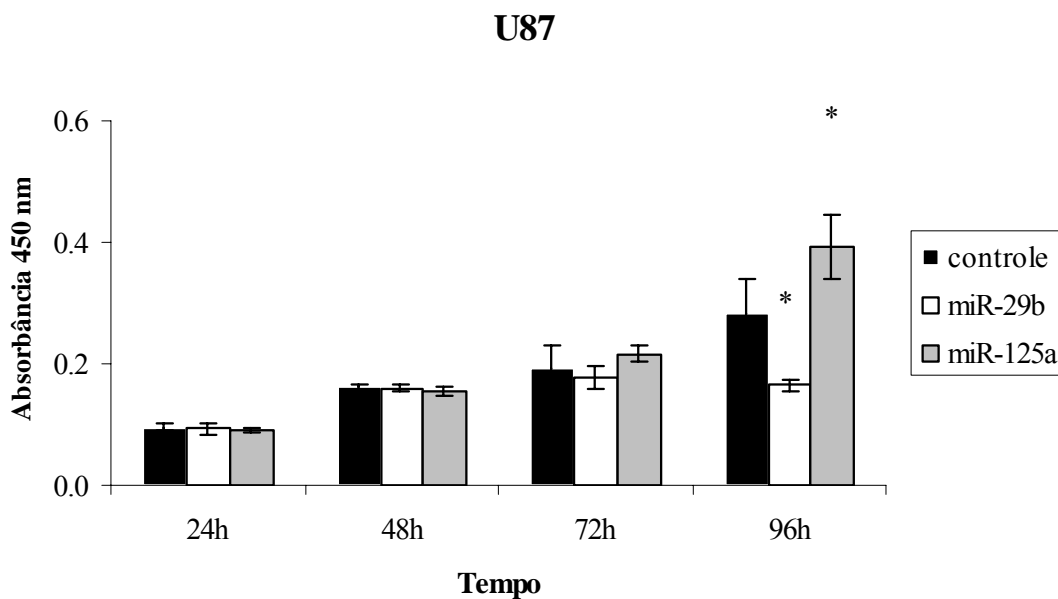


Figura 29 - Análise da proliferação celular após a transfecção da linhagem U87 com o miR-29b e miR-125a. As células da linhagem U87 foram transfectadas com 100nM com os precursores do miR-29b e miR-125a e controle com a utilização da lipofectamina. Foi analisada a capacidade de proliferação das células transfectadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Foi observado uma diminuição significativa na proliferação nas células transfectadas com miR-29b ($p=0,0002$) em relação ao controle. Os dados apresentados nessa figura são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0.05$ (teste- t de Student).

5. DISCUSSÃO

A habilidade do tumor de invadir os tecidos adjacentes normais, juntamente com a alta capacidade proliferativa e resistência à apoptose, são os principais determinantes da mortalidade dos pacientes com GBM. Portanto, a elucidação das vias moleculares essenciais para a ocorrência deste processo nas células tumorais é importante para o desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento dos pacientes e identificação de novos alvos potencialmente terapêuticos. Tendo em vista estes aspectos, no presente estudo foi analisado o impacto do silenciamento da podoplanina na invasão e proliferação celular em GBMs e o papel dos miRNAs reguladores desta proteína na invasão, apoptose e proliferação em GBMs.

A podoplanina está hiperexpressa em diversos tumores e representa um marcador putativo de CTNs e células progenitoras. Mishima et al. (2006) realizaram um estudo de expressão da podoplanina em amostras de tumores astrocíticos onde foi relatada uma maior expressão deste gene em GBMs quando comparado com astrocitomas anaplásicos, sugerindo uma associação da podoplanina com a malignidade nestes tumores. Em nossos estudos prévios (Scrideli et al., 2008) foi observada a hiperexpressão da podoplanina em amostras de pacientes com GBM comparado com tecido não neoplásico. Wicki et al. (2006) demonstraram que a podoplanina é expressa no fronte de invasão dos tumores em cerca de 80% dos carcinomas de células escamosas em humanos. No entanto, pouco se sabe sobre a relação entre esta proteína e a patogênese do GBM. Neste presente estudo, foi analisado o impacto do silenciamento da podoplanina na invasão e proliferação celular em GBMs. Foi observado que após a depleção da podoplanina ocorreu uma diminuição significativa na taxa de invasão das células silenciadas ($p=0,003$). Em estudos iniciais sobre a podoplanina, foi observada a inibição de metástase pulmonar do adenocarcinoma do cólon em modelo in vivo por meio do uso de anticorpo monoclonal específico para esta proteína (Tsuruo et al., 1983;

Sugimoto et al., 1991). Nas células vasculares endoteliais, a hiperexpressão da podoplanina induz o alongamento das extensões celulares e aumenta consideravelmente a adesão e migração pela promoção do rearranjo do citoesqueleto de actina (Schacht et al., 2003). Kato et al. (2007) desenvolveram um anticorpo anti-podoplanina humana denominado NZ-1 e após a injeção em modelo animal foi observada uma inibição da agregação plaquetária e metástase. Martín-Villar et al. (2005) relataram que a podoplanina está co-localizada com a ezrina, uma proteína de membrana que liga o citoesqueleto à membrana plasmática. A expressão ectópica da podoplanina nas linhagens HeLa e HaCaT promoveu a redistribuição da ezrina e além disso, a expressão da podoplanina foi associada à uma hipoexpressão da E-caderina em modelos *in vivo*. Scholl et al. (1999) mostraram que a podoplanina induz a conversão da morfologia epitelial para uma morfologia semelhante ao fibroblasto, quando ectopicamente expressa em queratinócitos. Estudos posteriores demonstraram que a expressão da podoplanina em cultura imortalizada ou pré-maligna de queratinócitos estimulou a dispersão celular (Martin-Villar et al., 2005) e promoveu a transição epitelial-mesenquimal (EMT) associada ao aumento de características invasivas e metastáticas (Scholl et al., 2000). No entanto, outros estudos revelaram que a podoplanina é capaz de promover a migração e invasão tanto na ausência ou presença da EMT e da mudança no padrão de expressão de E-caderina para N-caderina (EN-switch), dependendo do tipo do tumor (Wicki et al., 2006b; Martin-Villar et al., 2006; Wicki et al., 2007). Estudos realizados em outros tipos de tumores demonstraram que a indução da expressão da podoplanina resulta na ativação de vários processos, levando à modulação das Rho GTPases, fosforilação das proteínas ERM, rearranjo do citoesqueleto de actina e aumento da invasão e migração celular (Wicki; Christofori, 2007). Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais esta proteína induz a invasão permanecem elusivos para a maioria dos tumores que a hiperexpressam, incluindo os GBMs. Os resultados sugerem que a podoplanina está relacionada com o processo de invasão em

GBMs. No entanto, são necessários estudos em modelos *in vivo* para confirmação destes achados. Neste estudo também foi avaliado o impacto do silenciamento da podoplanina na proliferação em linhagens de GBM. Foi observado uma diminuição significativa da taxa de proliferação nas células silenciadas com siRNA específico para podoplanina no tempo de 96 horas, comparando com o controle ($p=0,02$). Não foram encontrados estudos relacionando a podoplanina com a proliferação em tumores. Portanto, são necessários mais estudos para a elucidação de qual é o papel da podoplanina na proliferação celular em GBMs.

Alguns estudos baseados na análise global de expressão revelaram importantes miRNAs relacionados com a patogênese do GBM. O primeiro trabalho utilizando a tecnologia do miRNA *microarray* em GBMs foi publicado por Ciafrè et al., 2005, que relatou a hiperexpressão do miR-21 e miR-10b e hipoxpressão dos miRNAs da família miR-181 e o miR-128-1. Outros miRNAs foram identificados por trabalhos posteriores como o miR-451 (Gal et al., 2008; Godlewski et al., 2008), miR-124 e miR-137 (Godlewski et al., 2008), miR-7 e miR-153 (Silber et al., 2008). Um dos primeiros estudos de expressão de miRNAs em GBMs foi realizado por Chan et al. (2005), onde foi estabelecida a participação do miR-21 na patogênese do GBM. Neste estudo foi demonstrado que o miR-21 está hiperexpresso e que representa um fator antiapoptótico em GBMs. Posteriormente, alguns alvos moleculares do miR-21 foram validados como *PTEN* (Meng et al., 2006), *PDCD4* (Asangani et al., 2007), *TPM1* (Zhu et al., 2007) e o regulador de metaloproteinases *TIMP3* (Gabriely et al., 2008). Além disso, outros estudos demonstraram uma potencial aplicação deste miRNA na terapia devido a redução da proliferação em experimentos *in vivo* (Corsten et al., 2007; Krichevsky et al., 2009). Por outro lado, miRNAs hipoexpressos responsáveis pela regulação de genes relacionados com a patogênese do GBM foram identificados em diversos trabalhos como miR-7 que inibe a expressão do gene *EGFR* (Kefas et al., 2008), miR-221 e miR-222 que regulam o inibidor da ciclina dependente de quinase 1B (p27, Kip1) (Gillies; Lorimer, 2007) e

miR-153 que diminui a expressão de importantes genes relacionados com a apoptose como o *MCL1* e *BCL2* (Xu et al., 2009). É interessante notar que, apesar de serem vastos os dados gerados por miRNA *microarray*, pouquíssimos miRNAs foram explorados e apenas alguns alvos foram completamente validados. Portanto, há a necessidade de mais estudos que tenham como objetivo a elucidação da importância da participação dos miRNAs na causa e progressão do GBM. No presente trabalho, amostras de GBM foram analisadas por miRNA *microarray* em comparação com tecido cerebral normal. Em concordância com trabalhos anteriormente publicados, os miRNAs miR-21 e miR-10b apresentaram-se hiperexpressos em GBM comparado com o controle (Chan et al., 2005; Ciafrè et al., 2005; Chen et al., 2008; Gabriely et al., 2008). Outros miRNAs também apresentaram-se hiperexpressos em relação ao tecido normal como miR-383 (Godlewisk et al., 2008) e miR-155 (Ciafrè et al., 2005; Chan et al., 2005). Contudo, foram identificados miRNAs hiperexpressos em GBM que ainda não tinham sido citados na literatura como o miR-627 e miR-196a, para os quais foram preditos alvos importantes pelo Target Scan como o inibidor do ciclo celular *CDKN1B* e o regulador do ciclo celular *CDK6*, respectivamente. Com relação aos miRNAs hipoexpressos, foram encontrados miRNAs já relatados por outros autores como o miR-149, miR-29b (Silber et al., 2008), miR-181a (Ciafrè et al., 2005; Shi et al., 2008) e miR-128a (Ciafrè et al., 2005; Silber et al., 2008; Godlewisk et al., 2008). Além destes, outros miRNAs hipoexpressos não citados na literatura como o miR-125a, miR-338 e miR-211/204 foram identificados para os quais foram preditos genes alvos importantes como *DICER1*, *VEGFC* e *BCL2*, respectivamente. Após a identificação de miRNAs diferencialmente expressos, foi selecionado um grupo de miRNAs para a validação com a utilização de qRT-PCR. Foram selecionados os miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a que apresentaram-se hipoexpressos em GBM pela análise de miRNA *microarray* e que foram apontados pela análise *in silico* como potenciais reguladores da podoplanina. Na análise por qRT-PCR foi observado que os miR-149 e miR-

181 apresentaram-se hipoexpressos nas amostras de GBM, mas os valores não foram estatisticamente significativos devido ao alto desvio padrão. Este resultado pode ser explicado em parte devido à utilização de grupos distintos de pacientes para validação dos dados e a necessidade de inclusão de um maior número de amostras no estudo. Os resultados obtidos pela análise por miRNA *microarray* foram validados para os miRNAs miR-29b ($p=0,03$) e miR-125a ($p=0,001$). Apenas no estudo realizado por Silber et al. (2008) com a utilização de qRT-PCR foi relatado a hipoexpressão do miR-29b em GBMs. O miR-29b também foi encontrado hipoexpresso em vários tipos de tumores como câncer de mama invasivo (Iorio et al., 2005), câncer de pulmão (Yanaiharu et al., 2006), LLC (Calin et al., 2005; Pekarsky et al., 2006), câncer da próstata (Porkka et al., 2007), câncer do cólon (Cummins et al., 2006) e leiomioma uterino (Wang et al., 2007). Com relação ao miR-125a, este foi o primeiro estudo demonstrando a hipoexpressão deste miRNA em GBMs. Em outros estudos foi demonstrado que o miR-125a está hipoexpresso em câncer de mama (Iorio et al., 2005), neuroblastoma (Laneve et al., 2007), carcinoma seroso de ovário (Nam et al., 2008) e meduloblastoma (Ferretti et al., 2009). Estes resultados sugerem que os miRNAs miR-29b e miR-125a estão relacionados com a supressão tumoral no câncer.

Previamente foi demonstrado que vários miRNAs associados ao GBM regulam importantes mecanismos moleculares nas CTNs como diferenciação e auto-renovação (Hatfield et al., 2008). Além disso, outro estudo revelou que genes relacionados com a auto-renovação celular também estão implicados em importantes vias na carcinogênese (Godlewski et al., 2009). Silber et al. (2008) demonstraram que os miR-124 e miR-137 induziram diferenciação em células tronco derivadas de GBM e ainda promoveram uma parada no ciclo celular. Interessantemente, foi demonstrado que alguns miRNAs alterados em GBMs também participam do desenvolvimento do SNC. Como por exemplo, os miR-7, miR-9, miR-124, miR-128 e miR-137 que atuam em diversos processos ao longo do

desenvolvimento como diferenciação neuronal e que ao mesmo tempo apresentam-se hipoexpressos em GBMs (Godlewski et al., 2009). Os miRNAs mais expressos nas células precursoras neurais são a família let-7, miR-9, miR15/16, miR-17-20, miR-21, miR-26, miR-130/301 e miR-181a/b (Marson et al., 2008; Shi et al., 2008). Recentemente, Yoo et al. (2009) demonstraram que os miR-9 e miR-124 são responsáveis pela repressão do *BAF53a* (*ACTL6A*), que codifica um membro da família do complexo das proteínas relacionadas à actina (ARPs) associada ao remodelamento da cromatina e que também atua no desenvolvimento do SNC. Após determinar que os miR-29b, miR-125a, miR-149 e miR-181a estão hipoexpressos em GBM, o perfil de expressão destes miRNAs foi analisado nas células CD133⁺ e CD133⁻ isoladas da linhagem U87. Interessantemente, também foi observado que os miR-29b ($p=0,02$), miR-125a ($p=0,0005$), miR-149 ($p=0,014$) e miR-181a ($p=0,01$) estão hipoexpressos nas células CD133⁺ em relação à sua contraparte negativa. Assim, os resultados sobre a hipoexpressão dos miRNAs estudados nas células CD133⁺ e no GBM sugerem uma relação desses miRNAs com a regulação da diferenciação celular, auto-renovação e tumorigênese. Concordando com os nossos resultados, em estudos realizados por Smirnova et al. (2005) e Krichevsky et al. (2006) foi demonstrado que o miR-29b é preferencialmente expresso em células precursoras da glia. No entanto, o miR-125 é expresso tanto em células precursoras de neurônios como da glia (Smirnova et al., 2005; Wulczyn et al., 2007; Rybak et al., 2008). A expressão de miRNAs ocorre de maneira seqüencial durante a diferenciação das células progenitoras, com a conseqüente expressão de genes específicos de cada linhagem (Shi et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a hiperexpressão do miR-29b promove a diferenciação das células de rabdomiosarcoma RH30 em modelo in vivo (Wang et al., 2008). O miR-125b induz a diferenciação das células p19 de carcinoma embrionário em neurônios, sugerindo um papel no desenvolvimento neuronal (Wu et al., 2005). Chen et al. (2004) demonstraram que o miR-181a regula positivamente a diferenciação

de células B na medula óssea de modelos in vivo. Contudo, atualmente a idéia de que somente o marcador CD133⁺ seja capaz de diferenciar as CTCs do glioma é questionável (Beier et al., 2007; Joo et al., 2008; Ogden et al., 2008; Wang et al., 2008). Além de outros marcadores como BMI-1, nestina, Sox2 e CD15 terem sido sugeridos, alguns estudos apontam que é tecnicamente difícil realizar uma separação precisa de células CD133⁺ e CD133⁻. No entanto, devido ao fato de ter sido encontrada células CD133⁻ com capacidade tumorigênica não há atualmente um marcador que defina as CTCs do glioma (Park ; Rich, 2009). Portanto, há uma necessidade de maiores estudos para elucidação da relação entre as células CD133⁺ e o GBM. Como recentes estudos demonstraram que vários miRNAs relacionados com o desenvolvimento neural estão alterados em GBMs, o estudo destes miRNAs poderá levar a descoberta de novas vias moleculares importantes para a evolução do GBM.

Com base nos resultados obtidos por qRT-PCR nas amostras de GBM, os miRNAs miR-29b e miR-125a foram selecionados para a validação como potenciais reguladores da podoplanina e avaliados quanto à participação na invasão, apoptose e proliferação em GBMs.

No presente estudo, foi analisado a correlação entre a expressão da podoplanina e dos miR-29b e miR-125a nas linhagens de GBM LN319, U87, U251, D54, U373 e T98G por qRT-PCR. Como demonstrado por Kato et al. (2006), foi observada uma hiperexpressão da podoplanina nas células da linhagem LN319. Interessantemente, não foi detectada a expressão do miR-29b, e além disso, foi evidenciada uma menor expressão do miR-125a em relação à expressão da podoplanina nesta linhagem. O oposto foi observado para as linhagens U87, U251, D54, U373 e T98G que apresentaram maior expressão do miR-125a com relação à podoplanina. Para o miR-29b foi também observado maior expressão nas linhagens U87, U251, D54 e U373 comparado à podoplanina. Entretanto, a linhagem T98G apresentou valores de expressão similares tanto para o miR-29b quanto para a podoplanina. Estes resultados sugerem uma correlação inversa entre os níveis dos miR-29b e miR-125a em

relação à expressão da podoplanina nas linhagens de GBM. Com base nestes resultados foram realizados estudos para demonstrar a regulação da podoplanina pelo miR-29b e miR-125a.

Um dos primeiros alvos validados do miR-29b foi publicado por Mott et al. (2007), demonstrando que o miR-29b regula o gene *MCL1* que está relacionado com a apoptose. Fabbri et al. (2007), corroboraram que o miR-29b regula os genes *DNMT3A* e *DNMT 3B*, que codificam duas enzimas hiperexpressas em câncer de pulmão e que são responsáveis pela metilação do DNA. Interessantemente, a expressão forçada do miR-29b em linhagens de câncer de pulmão foi capaz de restaurar o padrão normal de metilação, induzindo a reexpressão de genes como *FHIT* e *WWOX*, supressores tumorais que estão metilados neste tipo de tumor. Park et al. (2008) demonstraram que o miR-29b regula a subunidade da PI3K denominada p85a e a proteína Cdc42 pertencente à família das Rho GTPases. Outros alvos do miR-29b já validados são os genes *TCL1* (Pekarsky et al., 2006) e *YY1* (Wang et al., 2008), relacionados com a progressão da LLC-B e com a repressão da diferenciação muscular, respectivamente. Normalmente a maioria dos miRNAs regula múltiplos genes que participam de processos biológicos relacionados. Alguns alvos importantes também foram validados para o miR-125a, demonstrando que o mesmo regula o miRNA lin-28 junto ao seu homólogo miR-125b (Wu et al., 2005). Em outro estudo foi demonstrado que os miR-125a e miR-125b regulam os genes *ERBB2* e *ERBB3*, receptores de tirosina quinases relacionados à indução da transformação celular em câncer de mama, e além disso, promovem a supressão da fosforilação da via ERK1/2 e AKT in vitro (Scott et al., 2007). Juntamente com o miR-9, o miR-125a e miR-125b regulam a expressão de uma forma truncada do receptor trkC, relacionado ao controle da proliferação celular (Laneve et al., 2007; Ferretti et al., 2009). Levando-se em conta que apenas um microRNA pode regular aproximadamente uns 200 genes (Chen ; Meister, 2005), são necessários vários estudos para a validação de novos alvos para o entendimento da amplitude da regulação gênica mediada por miRNAs. Neste presente

estudo, foi demonstrado que o miR-29b e o miR-125a regulam a podoplanina. Primeiramente, após a transfecção da linhagem LN319 com precursores do miR-29b e miR-125a, os níveis de expressão da podoplanina foram analisados por Western blot. Foi observado uma significativa diminuição da expressão da podoplanina nas células da linhagem LN319 transfectadas com miR-29b e miR-125a comparado com o controle. A regulação da podoplanina pelos miR-29b e miR-125a foi confirmada pelo ensaio da luciferase, onde foi demonstrado a interação direta do miR-29b e miR-125a na região 3'UTR do gene *PDPN*. Este estudo é o primeiro a identificar a podoplanina como alvo dos miR-29b e miR-125a.

Como foi demonstrado que os miR-29b e miR-125a regulam a podoplanina, proteína relacionada com a invasão celular, foi então analisado o impacto da hiperexpressão destes miRNAs na invasão em GBMs. A invasão local envolve o desprendimento de células do sítio original, promovendo a hipoexpressão de moléculas neurais de adesão (Sasaki et al., 1998) e da E-caderina (Cavallaro; Christofori, 2004) assim como a hiperexpressão do receptor CD44 (Ranuncolo et al., 2002) e N-caderina (Cavallaro; Christofori, 2004). Posteriormente, ocorre a fixação na matriz extracelular (ECM) via integrinas (D'Abaco; Kaye, 2007) e tenascina-C (Mahesparan et al., 2003). O próximo passo é a degradação e o remodelamento da ECM realizados por vários tipos de proteases incluindo metaloproteinases (MMPs), ADAMs, plasminas e catepsinas (Nakada et al., 2007). Finalmente, as proteínas da família das Rho GTPases realizam o rearranjo do citoesqueleto, onde a proteína Rho estimula a formação de fibras de estresse e adesões focais (Ridley et al., 2003) e as proteínas Rac e Cdc42 regulam a formação da lamilipódia e filipódia, respectivamente (Nobes ; Hall, 1999; Ridley et al., 2003; Raftopoulou ; Hall, 2004). Estas proteínas desempenham um papel importante na reorganização do citoesqueleto de actina durante a migração celular (Raftopoulou ; Hall, 2004), além de estarem relacionadas ao processo de transformação celular (Prendergast et al., 1995; Qiu et al., 1995; Lin et al., 1997) e invasão tumoral (Keely et al., 1997; Chan et al.,

2005). Portanto, a invasão representa um processo complexo que envolve a participação de várias proteínas. Sendo assim, é razoável inferir a participação dos miRNAs na regulação deste processo pela capacidade que apresentam de regular vários genes simultaneamente. No presente estudo, os miRNAs miR-29b e miR-125a promoveram uma redução significativa na habilidade de invasão das células transfectadas comparado com o controle. Foi demonstrado que houve uma redução de 40% ($p=0,0003$) e de 23% ($p=0,005$) na invasão na linhagem LN319 transfectada com o miR-29b e miR-125a, respectivamente, comparado ao controle. Na linhagem U251 transfectada com o miR-29b e miR-125a foi observado uma redução de 23.5% ($p=0,03$) e 56% ($p=0,0008$), respectivamente. Estes resultados sugerem uma participação dos miRNAs-29b e miR-125a no processo de invasão em GBMs. Além dos estudos *in vitro*, foi verificada a dinâmica da expressão do miR-29b e miR-125a em modelo *in vivo*. A expressão destes miRNAs nas amostras de tumor xenográfico originados de células parentais da linhagem U251 administradas por meio de injeções intracranianas em camundongos SCID foi analisada. Foram separadas as células da região central do tumor denominadas de células não invasivas e as células que invadiram o tecido normal chamadas de células invasivas. Além disso, foram selecionadas células com alto perfil invasivo *in vitro* com a utilização do matrigel. Foi analisada a expressão dos miR-29b e miR-125a por qRT-PCR nestas amostras. A expressão do miR-29b e miR-125a foi comparada entre as células parentais e as células selecionadas em matrigel e entre as células invasivas e não invasivas provenientes do tumor xenográfico. Foi observada diminuição da expressão do miR-29b nas células com alto perfil invasivo selecionadas em matrigel comparado com as células parentais. Apesar dos resultados *in vitro* sugerirem que o miR-29b está relacionado com a invasão em GBMs, não houve diferença na expressão do miR-29b entre as células não invasivas e invasivas do modelo *in vivo*. Alguns estudos demonstraram o envolvimento do miR-29b na invasão celular e metástase por meio da regulação de proteínas da matriz extracelular como o colágeno

(Sengupta et al., 2008) e pela regulação da subunidade da PI3K denominada p85a e a proteína Cdc42 (Park et al., 2008). Contudo, são necessários mais estudos para elucidar a relação entre a expressão do miR-29b e a invasão celular em GBMs. Com relação ao miR-125a, houve uma diminuição da expressão deste miRNA nas células parentais comparados com as células selecionadas em matrigel e nas células não invasivas comparadas com as células invasivas do tumor xenográfico ($p=0,001$). Corroborando com os nossos resultados, Scott et al. 2007 demonstraram que a hiperexpressão do miR-125a e miR-125b em células de neuroblastoma SKBR3 promove uma diminuição do crescimento dependente de ancoragem e redução da migração e invasão. Este estudo também demonstrou que a hiperexpressão do miR-125a e miR-125b em células de câncer de mama ERBB2-positivas produz uma diminuição do crescimento e motilidade celular. Wang et al. (2009) demonstraram que o miR-125a é regulado pela via do fator de crescimento epidérmico (EGF) e promove a inibição da migração e invasão em células de câncer de pulmão (Wang et al., 2009). Estes autores sugeriram uma função de supressor de metástase para o miR-125a. Estes resultados, juntamente com os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, sugerem que o miR-125a desempenha um papel importante na regulação do processo de invasão celular em GBMs.

No presente estudo, foi analisado o papel desempenhado pelos miRNAs miR-29b e miR-125 na apoptose em GBMs. Foram utilizadas as linhagens U251 com a TP53 mutada e a linhagem U87, que apresenta a TP53 selvagem. As células U87 transfectadas com o miR-29b e miR-125a apresentaram um comportamento oposto com relação à apoptose. A hiperexpressão do miR-29b somente induziu a apoptose nas células com TP53 selvagem ($p=0,01$). Nas células com a TP53 mutada transfectada com o miR-29b foi observado um número de células apoptóticas semelhantes ao controle. Portanto, não houve indução da apoptose nestas células. Estes resultados sugerem que a indução da apoptose pelo miR-29b é dependente da presença da TP53 selvagem. Nossos achados concordam com os resultados

relatados por Park et al. (2008), onde foi demonstrado que a família do miR-29 (a, b e c) aumentam a expressão da TP53 e induz apoptose de maneira dependente da TP53. Neste estudo foi demonstrado que a indução da apoptose pelo miR-29b ocorre somente em células que expressam o tipo selvagem do gene *TP53*, como as linhagens HeLa e MCF-7. As células que carregam mutações no gene *TP53* não responderam ao tratamento com o miR-29b como as células MDA-MB-231 e SW480. O envolvimento do miR-29b na apoptose também foi relatado por Mott et al. (2008), onde foi demonstrado que o miR-29b regula o gene *MCL1*, que codifica uma proteína anti-apoptótica membro da família BCL-2. Neste mesmo estudo foi observada a sensibilização das células de colagiocarcinoma KMCH à apoptose mediada pelo tratamento com TRAIL, após a transfecção com o precursor do miR-29b. Os resultados apresentados aqui confirmam os resultados encontrados por outros estudos em outros tipos de tumores e sugerem um importante papel desempenhado pelo miR-29b na apoptose em GBMs que expressam a TP53. Além disso, os mesmos demonstraram que na linhagem com TP53 selvagem ha uma diminuição significativa na proliferação das células transfectadas com miR-29b ($p=0,0002$) em relação ao controle, não sendo observadas alterações na proliferação nas linhagens com TP53 mutado. Estes resultados sugerem que, como foi também observado na apoptose, o miR-29b atua na proliferação de forma dependente da presença da TP53 selvagem em GBMs. Em um estudo foi demonstrado uma redução da proliferação em células de rhabdomyosarcoma RH30 e também em modelo in vivo após a transfecção do miR-29b (Wang et al., 2008). Recentemente foi demonstrado por Suzuki et al. (2009) que a TP53 promove o processamento de certos miRNAs pela Drosha em resposta ao dano ao DNA. Foi observado também que a TP53 mutante suprime o nível de vários precursores e miRNAs maduros e a TP53 selvagem aumenta a maturação pós-transcricional de miRNAs o que suprime o crescimento celular. Este resultado sugere que nas células em que há a presença da TP53 selvagem existem mais miRNAs expressos do que em células onde o TP53 está mutado. A

dependência do miR-29b em relação à TP53 selvagem pode estar relacionada com a necessidade de expressão de outros miRNAs que atuam na mesma via do miR-29b para promover a apoptose e reduzir a proliferação. Com relação ao miR-125a, na presença da TP53 selvagem houve uma diminuição das células apoptóticas ($p=0,02$). Interessantemente, em um estudo publicado por Le et al. (2009) foi demonstrado que o miR-125b regula a expressão da TP53 pela interação direta com a região 3'UTR em células HEK-293T humanas e em *Danio rerio* (*zebrafish*). Foi também demonstrado que o miR-125b regula negativamente a TP53 selvagem em células H1229. Além disso, foi observado que a expressão ectópica do miR-125b suprimiu significativamente a apoptose mediada pela TP53 em células de neuroblastoma SH-SY5Y, que apresenta a TP53 selvagem. No presente projeto foi demonstrado que a hiperexpressão do miR-125a promoveu um aumento na proliferação das células com TP53 selvagem transfectadas com o miR-125a ($p=0,003$) comparado com o controle. Portanto, a hiperexpressão do miR-125a em células com TP53 selvagem de GBM promoveu a inibição da apoptose e o aumento da proliferação celular. Estes estudos e os resultados encontrados sugerem que, levando em consideração a homologia entre o miR-125a e miR-125b, é plausível supor que na linhagem com TP53 selvagem o miR-125a regule negativamente a TP53, inibindo a apoptose e promovendo a proliferação. Concordando com esta hipótese, no estudo publicado por Xia et al. (2009) foi demonstrado que a hiperexpressão do miR-125b restaurou parcialmente a viabilidade celular e inibiu a apoptose na linhagem U343 que apresenta a TP53 selvagem, tratadas com ATRA. Além disso, foi observado que a hipoexpressão do miR-125b diminuiu a proliferação em linhagens de glioma e aumentou a sensibilidade destas células à indução da apoptose ao ATRA. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o miR-125b regula o gene *BMF*, que codifica uma proteína que se liga a membros da família da BCL2 e funciona como um ativador da apoptose. Interessantemente, no presente estudo foi demonstrado que na linhagem com a TP53 mutada houve um aumento

das células apoptóticas ($p=0,04$), após a hiperexpressão do miR-125a. Além disso, não foi observado diferença significativa na proliferação nas linhagens com a TP53 mutada. Uma hipótese que explicaria estes achados seria que a mutação na TP53 levaria a modificações na interação com o miR-125a que consequentemente, ativaria a TP53 levando à indução da apoptose. Portanto, o miR-125a regularia negativamente a TP53 selvagem e promoveria a ativação da TP53 mutada. É interessante notar que as mutações observadas nas linhagens LN319 e U251 produzem as mesmas modificações, ou seja a troca da Arginina pela Histidina (Van Meir et al., 1994).

Em um estudo realizado em meduloblastoma por Ferretti et al. (2009) foi observado que após a hiperexpressão do miR-125a houve a indução da apoptose na linhagem Daoy que apresenta a TP53 mutada (Saylor et al., 1991), no entanto foi observado uma redução no crescimento independente de ancoragem na linhagem D283 Med, com a TP53 selvagem. Em outro estudo, foi observada uma redução da proliferação em linhagens de neuroblastoma SK-N-BE (Laneve et al., 2007), que apresentam a forma mutada da TP53 (Nakagawa et al., 2003). Estes resultados sugerem que um miRNA pode agir como oncogene ou supressor tumoral ou ainda induzir ou inibir um determinado processo biológico em um mesmo tipo de tumor, dependendo do perfil genético de cada paciente. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar a relação entre a TP53 selvagem e mutada e o miR-125a em GBMs.

No presente estudo foi demonstrado que miRNAs diferencialmente expressos podem regular vias relacionadas com o surgimento e progressão do tumor. A utilização da restauração da expressão de miRNAs hipoexpressos representa uma ferramenta importante no estudo das vias moleculares alteradas no câncer que proporcionam uma vantagem seletiva aos tumores comparado com as células normais. Foi demonstrado que o miR-29b e miR-125a estão hipoexpressos em GBM e que estão relacionados com importantes processos biológicos como apoptose, proliferação e invasão celular. Com relação à invasão celular, foi

demonstrado que o miR-29b e miR-125a regulam a podoplanina, uma proteína relacionada com a invasão e a malignidade em tumores astrocíticos. Além disso, os resultados obtidos em modelo *in vivo* sugeriram uma importante participação do miR-125a na invasão celular em GBMs. O silenciamento da podoplanina promoveu uma redução da invasão e proliferação *in vitro*. Contudo mais estudos são necessários para elucidação dos resultados encontrados no modelo *in vivo*. Estes achados podem ser importantes para o desenvolvimento de terapias futuras contra o câncer baseada na utilização de miRNAs. Além disso, demonstra que ainda são necessários vários estudos para a completa elucidação do envolvimento dos miRNAs na patogênese do câncer.

6. CONCLUSÕES

- O silenciamento da podoplanina promoveu a redução da invasão e proliferação *in vitro*, sugerindo um importante papel desta proteína na patogênese do GBM. No entanto são necessários estudos em modelo *in vivo* para confirmação dos resultados obtidos;
- miR-29b e miR-125a estão hipoexpressos em GBM e também em células CD133⁺, sugerindo que estes miRNAs poderiam estar relacionados com a regulação de processos de diferenciação celular, auto-renovação e tumorigênese em GBMs;
- O miR-29b e o miR-125a regulam a podoplanina através da interação direta com os sítios alvo da região 3'UTR do gene;
- O miR-29b e miR-125a inibiram a invasão celular *in vitro*. Além disso, estudos *in vivo* sugerem uma importante participação do miR-125a na regulação da invasão celular em GBMs;
- Na linhagem U87 com TP53 selvagem houve a indução da apoptose e diminuição da proliferação celular após a hiperexpressão do miR-29b, sugerindo que o miR-29b induz a apoptose e diminui a proliferação de forma dependente da TP53;
- O miR-125a apresenta ações opostas em linhagens com TP53 selvagem e TP53 mutada sugerindo que a presença de alterações nos sítios de interação entre miRNAs e RNAs podem influenciar a função desempenhada por miRNAs específicos. Contudo são necessários estudos para determinar a relação entre a TP53 e o miR-125a.
- O miR-29b e miR-125a podem representar interessantes alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas do GBM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350-5.

Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27(15):2128-36.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.

Barcellos-Hoff MH, Newcomb EW, Zagzag D, Narayana A. Therapeutic targets in malignant glioblastoma microenvironment. *Semin Radiat Oncol*. 2009;19(3):163-70.

Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonné R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(22):6593-7.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007;67(9):4010-5.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097-101.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*. 1997;151(4):1141-52.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-66.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;27;353(17):1793-801. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006;355(5):533.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11755-60.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2999-3004 (b).

Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*. 2004;104(2):397-401.

Capocaccia R, Gatta G, Roazzi P, Carrani E, Santaquilani M, De Angelis R, Tavilla A; EURO CARE Working Group. The EURO CARE-3 database: methodology of data collection, standardisation, quality control and statistical analysis. *Ann Oncol*. 2003;14(Suppl 5):v14-27.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):118-32.

Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, Michaelson D, Knaus UG, Philips MR, Symons M. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene*. 2005;24(53):7821-9.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65(14):6029-33.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004;303: 83–86.

Chen JF, Callis TE, Wang DZ. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci.* 2009;122:13-20.

Chen PY, Meister G. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol Chem.* 2005;386(12):1205-18.

Chen Y, Liu W, Chao T, Zhang Y, Yan X, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Sun M, Peng X. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett.* 2008;272(2):197-205.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005;436(7051):740-4.

Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1351-8.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13944-9.

Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res.* 2007;67(19):8994-9000.

Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell.* 2004;16(6):861-5.

Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr., Sjoblom T, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:3687–92.

D'Abaco GM, Kaye AH. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci.* 2007;14(11):1041-8.

Davis FG, McCarthy BJ. Current epidemiological trends and surveillance issues in brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2001;1(3):395-401.

Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, Andrew Lister T, Young BD, Debernardi S. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One.* 2008;14;3(5):e2141.

Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet.* 2007;16(9):1124-31.

Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, Acs G. Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol.* 2006;19(5):708-16.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6: 259–269.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(40):15805-10.

Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science.* 2005;310(5755):1817-21.

Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Di Rocco C, Riccardi R, Giangaspero F, Farcomeni A, Nofroni I, Laneve P, Gioia U, Caffarelli E, Bozzoni I, Screpanti I, Gulino A. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer.* 2009;124(3):568-77.

Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007;25(4):867-90, vii.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683-710.

Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5369-80.

Gal H, Pandi G, Kanner AA, Ram Z, Lithwick-Yanai G, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(1):86-90.

Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15:352-8.

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 2003;21(8):1624-36.

Gillies JK, Lorimer IA. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle*. 2007;6(16):2005-9.

Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res*. 2003;63(20):6613-25.

Godlewski J, Newton HB, Chiocca EA, Lawler SE. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death Differ*. 2009 Jun 12. No prelo.

Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res*. 2008;68(22):9125-30.

Gomez GG, Kruse CA. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol*. 2006;10(A):133-146.

Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 2006; 342:129–138.

Gu J, Liu Y, Kyritsis AP, Bondy ML. Molecular epidemiology of primary brain tumors. *Neurotherapeutics*. 2009;6(3):427-35.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-6.

Hatfield S, Ruohola-Baker H. MicroRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res*. 2008; 331: 57–66.

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:19075-80.

He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:819-22.

Huntly BJP, Gilliland DG. Leukemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;445: 111-115.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065-70.

Jannot G, Simard MJ. Tumour-related microRNA functions in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene*. 2006;25:6197-201.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120:635-47.

Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Löwenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111:5078-85.

Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JI, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong SC, Park WY, Lee DS, Kim H, Nam DH. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest*. 2008;88(8):808-15.

Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, Yan H, Adamson DC. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(6):701-18.

Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2005;26(4):195-200.

Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu H. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci*. 2008;99(1):54-61.

Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Uchiyama N, Amano K, Chiba Y, Hasegawa Y, Hirabayashi J, Narimatsu H, Mishima K, Osawa M. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(4):1301-7.

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature.* 1997; 11;390(6660):632-6.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* 2008;68(10):3566-72.

Khatua S, Peterson KM, Brown KM, Lawlor C, Santi MR, LaFleur B, Dressman D, Stephan DA, MacDonald TJ. Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. *Cancer Res.* 2003;63(8):1865-70.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(3):215-25.

Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37:495-500.

Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):39-53.

Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells.* 2006; 24: 857–864.

Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, et al. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med.* 2001;194:797–808.

Lall S, Grün D, Krek A, Chen K, Wang YL, Dewey CN, Sood P, Colombo T, Bray N, Macmenamin P, Kao HL, Gunsalus KC, Pachter L, Piano F, Rajewsky N. A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2006;16:460-71.

Laneve P, Di Marcotullio L, Gioia U, Fiori ME, Ferretti E, Gulino A, Bozzoni I, Caffarelli E. The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):7957-62.

Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*. 2009;23(7):862-76.

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006;9: 391–403.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415-9.

Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006;25(3):522-32.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21:4663-70.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787-98.

Li HY, Cao K, Zheng Y. Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol*. 2003;13(11):553-7.

Liang H, Wu H, Giorgadze TA, Sariya D, Bellucci KS, Veerappan R, Liegl B, Acs G, Elenitsas R, Shukla S, Youngberg GA, Coogan PS, Pasha T, Zhang PJ, Xu X. Podoplanin is a highly sensitive and specific marker to distinguish primary skin adnexal carcinomas from adenocarcinomas metastatic to skin. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(2):304-10.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005; 433:769–773.

Lin R, Bagrodia S, Cerione R, Manor D. A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr Biol*. 1997;7(10):794-7.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.

Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, Ohgaki H, Wiestler OD, Thor AD, Seizinger BR. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993;52(1):31-8.

Lu F, Weidmer A, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Lieberman PM. Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *J Virol.* 2008;82(21):10436-43.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004;303(5654):95-8.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(23):9667-72.

Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Engebraaten O. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol.* 2003;105(1):49-57.

Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* 2005;19(24):2979-90.

Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, Guenther MG, Johnston WK, Wernig M, Newman J, Calabrese JM, Dennis LM, Volkert TL, Gupta S, Love J, Hannett N, Sharp PA, Bartel DP, Jaenisch R, Young RA. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.* 2008;134(3):521-33.

Martín-Villar E, Megías D, Castel S, Yurrita MM, Vilaró S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2006;119(pt 21):4541-53.

Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2005;113(6):899-910.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 2004;15(2):185-97.

Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*. 2008;133:217-22.

Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130:2113-29.

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133:647-58.

Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003;1:882-91.

miRbase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)

miRmap (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>)

Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nakazawa Y, Kunita A, Fujita N, Tsuruo T, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol*. 2006;111(6):563-8.

Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:563-8.

Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26(42):6133-40.

Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 2006;25:2537-45.

Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(4):458-78.

Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe K, Hayashi S, Hosoda M, Todo S, Nakagawara A. Negative autoregulation of p73 and p53 by DeltaNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*. 2003;197(1-2):105-9.

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Kakudo K. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(1):77-82.

Nakayama Y, Matsumoto K, Nagato M, Inoue Y, Katsuki T, Minagawa N, Shibao K, Tsurudome Y, Hirata K, Higure A, Sako T, Nagata N. Significance of lymphangiogenesis as assessed by immunohistochemistry for podoplanin in patients with esophageal carcinoma. *Anticancer Res.* 2007;27(1B):619-25.

Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, Kim JW, Kim S. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2690-5.

Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(7):425-30.

Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr, Li FP. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(2):83-7.

Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 1999;144(6):1235-44.

Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, Kang J, Assanah M, McKhann GM, Sisti MB, McCormick PC, Canoll P, Bruce JN. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery.* 2008;62(2):505-14.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1445-53.

Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schüler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lütolf, P. Kleihues, Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study, *Cancer Res.* 2005;64:6892–6899.

Ohgaki, P. Kleihues, Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005;64:479–489.

Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol.* 2006;13(2):83-8.

Park DM, Rich JN. Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells.* 2009;28(1):7-12.

Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(1):23-9.

Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:R101.

Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* 2006;66(24):11590-3.

Philippe C, Philippe B, Fouqueray B, Perez J, Lebret M, Baud L. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. *Am J Pathol.* 1993;143(6):1713-23.

Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature.* 2006;444:761–765.

PictaR (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)

Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67(13):6130-5.

Prendergast GC, Khosravi-Far R, Solski PA, Kurzawa H, Lebowitz PF, Der CJ. Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene.* 1995;10(12):2289-96.

Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M. A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(25):11781-5.

Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004;265(1):23-32.

Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res.* 2008;28(5B):2997-3006.

Ramirez MI, Millien G, Hinds A, Cao Y, Seldin DC, Williams MC. T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol.* 2003;256(1):61-72.

Ranuncolo SM, Ladeda V, Specterman S, Varela M, Lastiri J, Morandi A, Matos E, Bal de Kier Joffé E, Puricelli L, Pallotta MG. CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol.* 2002;79(1):30-5.

Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(8):1253-65.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-9.

Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4677-84.

Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):987-93.

Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T. Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer.* 1998;82(10):1921-31.

Saylor RL 3rd, Sidransky D, Friedman HS, Bigner SH, Bigner DD, Vogelstein B, Brodeur GM. Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. *Cancer Res.* 1991;51(17):4721-3.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol.* 2005;166(3):913-21.

Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 2003;22(14):3546-56.

Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003;22:3546–3556.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.

Scholl FG, Gamallo C, Vilaró S, Quintanilla M. Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 24):4601-13.

Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. 2007;282(2):1479-86.

Scrideli CA, Carlotti CG Jr, Okamoto OK, Andrade VS, Cortez MA, Motta FJ, Lucio-Eterovic AK, Neder L, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Tone LG. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Neurooncol*. 2008;88(3):281-91.

Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B, Ahlquist P. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5874-8.

Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2008;67 Suppl 3:iii50-iii55.

Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res*. 2008;1236:185-93.

Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;65(1):43-53.

Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci*. 2009 Jul 21. No prelo.

Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008;24;6:14.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432: 396–401.

Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*. 2005;21(6):1469–1477.

Stiles CD, Rowitch DH. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*. 2008;58: 832–846.

Stiller CA, Nectoux J. International incidence of childhood brain and spinal tumours. *Int J Epidemiol*. 1994;23(3):458-64.

Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):791-9.

Sugimoto Y, Watanabe M, Oh-hara T, Sato S, Isoe T, Tsuruo T. Suppression of experimental lung colonization of a metastatic variant of murine colon adenocarcinoma 26 by a monoclonal antibody 8F11 inhibiting tumor cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res*. 1991;51:921–925.

Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009; 23;460(7254):529-33.

Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;282(36):25993-6001.

Tang X, Tang G, Ozcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779:697-701.

TaRbase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>)

Target Scan (<http://www.targetscan.org/>)

Teodorczyk M, Martin-Villalba A. Sensing invasion: Cell surface receptors driving spreading of glioblastoma. *J Cell Physiol*. 2009 Aug 17. No prelo.

Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*. 2008;79:562-70.

Tsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373(1):36-41.

Tsuruo T, Yamori T, Naganuma K, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26. *Cancer Res.* 1983;43(11):5437-42.

Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454:780-3.

Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, Li H, Diserens AC, Wojcik BE, Huang HJ, Friedmann T, de Tribolet N, Cavenee WK. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 1994;54(3):649-52.

Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science.* 2008;322:16959.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science.* 2007;318:1931–1934.

Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, Ganser A, Eder M, Scherr M. *Blood.* 2007;109(10):4399-405.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2257-61.

Wan XW, Jiang M, Cao HF, He YQ, Liu SQ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(2):100-6.

Wang G, Mao W, Zheng S, Ye J. Epidermal growth factor receptor-regulated miR-125a-5p-a metastatic inhibitor of lung cancer. *FEBS J.* 2009;276(19):5571-8.

Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2008;14(5):369-81.

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, Mittal K, Soteropoulos P, Wei JJ. A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(4):336-47.

Ware ML, Berger MS, Binder DK. Molecular biology of glioma tumorigenesis. *Histol Histopathol*. 2003;18(1):207-16.

Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, Atkinson M. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*. 1996;18(2):125-32.

Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2007;96(1):1-5.

Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*. 2006;9(4):261-72.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.

Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*. 2002;4(4):278-99.

Wu L, Belasco JG. Micro-RNA regulation of the mammalian *lin-28* gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9198-208.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4034-9.

Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R. Post-transcriptional regulation of the *let-7* microRNA during neural cell specification. *FASEB J*. 2007;21(2):415-26.

Xia HF, He TZ, Liu CM, Cui Y, Song PP, Jin XH, Ma X. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting *Bmf*. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23(4-6):347-58.

Xie X, Mikkelsen TS, Gnirke A, Lindblad-Toh K, Kellis M, Lander ES. Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:7145-50.

Xu J, Liao X, Wong C. Down-regulations of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) by MicroRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG. *Int J Cancer*. 2009 Aug 12. No prelo.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):189-98.

Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature*. 2009;460(7255):642-6.

Yu S, Zhang JZ, Zhao CL, Zhang HY, Xu Q. Isolation and characterization of the CD133+ precursors from the ventricular zone of human fetal brain by magnetic affinity cell sorting. *Biotechnol Lett*. 2004;26(14):1131-6.

Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2004;23(58):9392-400.

Zamore PD, Haley B. Ribo-genome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005;309:151924.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9779-84.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G.. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9136-41.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 13;103(24):9136-41.

Zhu S, Si M-L, Wu H, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J BiolChem*. 2007;282:14328–36.

Zimmer G, Oeffner F, Von Messling V, Tschernig T, Grönness HJ, Klenk HD, Herrler G. Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J*. 1999;341(Pt 2):277-84.

Anexo – Manuscrito do artigo**Study of microRNAs regulating podoplanin and cellular invasion in glioblastoma multiform**

Maria Angelica Cortez¹, Milena Sabrina Nicoloso², Simona Rossi², Carlos Carlotti Junior³, Daniela Tirapelli³, Luciano Neder⁴, Maria Sol Brassesco⁵, Carlos Alberto Scrideli⁵, Maria-Magdalena Georgescu⁷, Wei Zhang⁶, Vinay Puduvalli⁷, George Adrian Calin², Luiz Gonzaga Tone⁵.

¹Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil

²Department of Experimental Therapeutics, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil

⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil

⁵Department of Pediatrics, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil

⁶Department of Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

⁷Department of Neuro-Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and malignant brain tumor, that presents elevated capacity of proliferation and cellular invasion. Recently, it was demonstrated that podoplanin, a membrane sialo-glycoprotein, is related to cellular invasion and malignancy in astrocytic tumors. However, its role in GBMs invasion remains elusive. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that regulate gene expression and several biological processes and diseases, including cancer. Nevertheless, their role in invasion, proliferation and apoptosis is not completely understood in GBMs. The objectives of this study were, first, evaluate the impact of podoplanin silencing in cellular invasion and proliferation in GBMs. Second, identify differentially expressed miRNAs predicted to regulate podoplanin and compare the expression profile of miRNAs between GBM and CD133 positive cells (CD133⁺). Third, evaluate the expression of the selected miRNAs in xenograph model and analyze the impact of miRNAs replacement in invasion, apoptosis and cellular proliferation in GBMs. Podoplanin silencing promoted a significant reduction in cellular invasion ($p=0,03$) and proliferation ($p=0,02$) *in vitro*. We analyzed 40 samples from GBM patients by miRNA microarray compared to normal brain samples in order to identify differentially expressed miRNAs. Data analysis indicated 47 under expressed miRNAs and 41 overexpressed miRNAs in GBMs. For microarray data validation we selected miRNAs predicted by *in silico* analysis to regulate podoplanin. MiRNA microarray data were validated by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) for miR-29b ($p=0,03$) and miR-125a ($p=0,001$). As seen in GBMs, the selected miRNAs miR-29b ($p=0,02$), miR-125a ($p=0,0005$), miR-149 ($p=0,014$) and miR-181a ($p=0,01$) were also underexpressed in CD133⁺ when compared to negative cells. In GBM cell lines study, it was observed a inverse correlation between miR-29b and miR-125a and podoplanin. Cells transfected with miR-29b and miR-125a presented a reduction in podoplanin expression compared to scrambled. It was observed a reduction of luciferase activity after miR-29b ($p=0,0017$) and miR-125a ($p=0,003$) transfection. Mutations in miR-29b and miR-125a 3'UTR interaction sites rescued luciferase activity, confirming the regulation of podoplanin by these miRNAs through direct 3'UTR interaction. In invasion studies, a reduction of invasive cells was observed in transfected LN319 and U251 cells with miR-29b ($p=0,0003$ and $p=0,03$, respectively) and with miR-125a ($p=0,005$ and $p=0,0008$, respectively). *In vitro* and *in vivo* models, the expression of miR-125a was decreased in cells with high invasive profile selected in matrigel and in invasive cells from xenograph tumor ($p=0,001$). In wild-type TP53 cell line apoptosis induction ($p=0,01$) and proliferation reduction ($p=0,02$) were observed after miR-29b transfection, suggesting that miR-29b is TP53-dependent. These results indicate a participation of podoplanin in GBM invasion and suggest an important role of miR-29b and miR-125a in GBM pathogenesis and progression and thus, may represent interesting targets for new therapeutical approaches in GBM treatment.

Keywords: glioblastoma; microRNAs; podoplanin; invasion; apoptosis; proliferation.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is an aggressive and fatal tumor which represents the majority of primary brain tumors in adults, characterized by genetics alterations which affect proliferation, apoptosis, angiogenesis and invasion control (Furnari et al., 2007; Ohgaki & Kleihues, 2009). One of the main causes for treatment failure is apoptosis resistance and ability to invade adjacent normal tissues (Gomez & Kruse, 2006; Tate & Aghi, 2009). Several proteins have been related to invasion process in GBMs. We and others previously reported that *PDPN*, which encodes a mucin-type transmembrane sialoglycoprotein named podoplanin, is up-regulated in GBMs and has been correlated to invasion and malignancy in astrocytic tumors and was suggested as a putative marker for neural stem cells and progenitor cells (Nakamura et al., 2006). In addition, podoplanin is overexpressed in a variety of cancers including squamous cell carcinomas (Kato et al., 2005; Dumoff et al., 2006; Liang et al., 2007; Nakayama et al., 2007), malignant mesotheliomas (Ordóñez, 2006), colorectal adenocarcinomas (Kato et al., 2003) and in many central nervous system (CNS) tumors (Shibahara et al., 2006; Mishima et al., 2006). However, the role of podoplanin in GBM pathogenesis remains elusive. In this regard, the discover of new molecular targets potentially applicable in practice medicine is highly necessary, since recent advances did not prevent tumor recurrence. Despite the modest improvement in patients therapy, recent advances in GBM molecular pathogenesis understanding opened up the possibility of new therapeutic approaches. One of them is the connection between microRNAs (miRNAs) and cancer. MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs non coding for protein which regulate gene expression at the posttranscriptional level by degrading or repressing translation of messenger RNA (mRNA) targets (Bartel, 2004; Chu & Rana, 2007). Mature miRNAs regulate gene expression through imperfect complementary base-pairing within the targeted transcript's 3'-untranslated region (UTR) (Ambros, 2004; Bohnsack et al, 2004). Recent studies suggest that

miRNA function is not limited to repressing individual key targets, but may also act by fine-tuning target activity, modulating multiple genes simultaneously (Flynt & Lai, 2008). Although biological functions of the most miRNAs are not completely revealed, several reports demonstrated that aberrant expression levels of miRNAs is involved in GBM initiation and progression. Notably, miR-21 is highly overexpressed in GBMs and presents important roles in cellular proliferation, invasion and apoptosis (Chan et al., 2005; Ciafrè et al., 2005; Krichevsky & Gabriely, 2009). Alternately, important down-regulated miRNAs have been also studied in GBMs as miR-124, miR-137 (Silber et al., 2008), miR-7 (Kefas et al., 2008) and miR-128 (Godlewski et al., 2008). Nonetheless, little is yet known about how altered miRNA expression influence GBM molecular basis. Thus, we investigated the potential role of differentially expressed miRNAs in podoplanin regulation and in invasion, apoptosis and proliferation in GBMs.

In the current report, we identified differentially expressed miRNAs which are down-regulated in GBMs and also in CD133 positive cells (CD133⁺) and focused on miR-29b and miR-125a, which were predicted to regulate podoplanin. We showed an inverse correlation between podoplanin and these miRNAs expression in GBM cell lines. We demonstrated that these miRNAs directly target the 3'UTR of *PDPN*, leading to down-regulation of protein expression. Podoplanin silencing promoted invasion and proliferation reduction in GBM cells. Also, miR-29b and miR-125a replacement promoted a significant reduction in invasion in GBM cells. Moreover, we demonstrated that miR-125a is down-regulated in invasive cells of *in vivo* model compared to non invasive cells. Furthermore, we showed that miR-29b replacement induced apoptosis and reduced proliferation in a TP53-dependent manner in GBMs. Taken together, these results suggest that miR-29b and miR-125a play important roles in invasion, apoptosis and proliferation in GBMs, with potential therapeutic implications.

Methods

Patients and brain normal samples: Two different groups of patients were analyzed. In miRNA microarray study we analyzed 40 microdissected GBMs (WHO grade IV) (13 men and 2 women) ranging in age from 17 to 73 years (average age 54 years, with a median and a standard deviation of 54 ± 16.42 years) samples compared to a pool of normal brain samples purchased from Ambion. To validate the miRNA microarray data we used another group of patients samples composed by 15 microdissected GBMs (WHO grade IV) (12 men and 3 women) ranging in age from 29 to 73 years (average age 57 years, with a median and a standard deviation of 60 ± 12.73 years) obtained from the Department of Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo. Diagnoses were based on 2007 World Health Organization criteria (Louis et al., 2007). The study was approved by the Research Ethics Committee of the University Hospital of the Faculty of Medicine of University of Sao Paulo, process number 7645/99. As normal samples we used FistChoice® Human Brain Reference RNA (Applied Biosystems), Human Brain MVPTM Total RNA (Stratagene Agilent Technologies) and Human Brain total RNA (BioChain Institute).

miRNA microarrays and computational data analysis: Expression profile of GBM samples was analyzed by miRNA microarray compared to normal brain samples by using a custom microarray composed by in situ synthesized oligonucleotides by Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc, CA, EUA). 5µg of total RNA were reversely transcribed by using octamers random primers biotin-conjugated and tail 5' poli (A). The chips were washed and processed to detect the transcripts with biotin by streptavidin- Alexa647 and scanned by PerkinElmer ScanArray XL5K Scanner (PerkinElmer, MA, EUA). Scanned images were quantified with the software Genespring (Silicon Genetics, CA, EUA).

RNA extraction, Retrotranscription and analysis of mRNAs and mature miRNAs by RT-qPCR: Total RNA was isolated from tissues and cell lines using Triazol reagent

(Invitrogen) for miRNA analysis, according to the manufacturer's protocol. For mature microRNA expression analysis, total RNA was retrotranscribed with microRNA specific primers using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and then qRT-PCR was performed using Taqman® MicroRNA assays according to the manufacturer's protocol. The comparative Ct method was used to calculate the relative abundance of miRNA compared with *RNAU6B* small nuclear RNA expression (Livak & Schmittgen, 2008).

Isolation of CD133 positive cells from U87 cell line: 20×10^6 cells were centrifuged and resuspended in 1 mL of PBS and were dissociated to a single cell suspension using 35µm BD Falcon Round-Bottom tubes (BD-Becton, Dickinson and Company). Cells were centrifuged and resuspended in separation autoMACS™ Running Buffer (Miltenyi Biotec). 50 µL of FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) were added in each sample, after and before specific antibodies addition. For CD133⁺ cells, 100µL of magnetic beads AC133 (CD133/1) Microbeads (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) by using Miltenyi Biotec CD133 Direct Cell Isolation (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) kit and 20µL of mouse IgG2b-PE (Miltenyi Biotec) were added. Cells were incubated for 30 minutes at 4°C. 50µL of the antibody CD133/2 (293C3) (Miltenyi Biotec Inc., CA, EUA) conjugated with R-phycoeritrine (PE) was added and the cells were incubated for 10 minutes at 48°C for efficiency analysis of flow cytometry isolation. Cells were centrifuged, resuspended in separation buffer and analyzed by flux cytometer. CD133⁺ cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) (Mediatech, Inc) supplemented with B-27 (Gibco Invitrogen), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprotech) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Cell lines: Established GBM cell line LN229, U373, D54, U87 and U251 were acquired from the American Type Culture collection (ATCC), whereas LN319 cell line were kindly provided by Dr. Frank Furnari (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA, USA).

Cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. Cell count and viability were determined using a Vi-Cell XR cell viability analyzer (Beckman Coulter).

Transfection: Mimics Pre-miRs miR-29b, miR-125a and negative control (scrambled) and siRNA specific for *PDPN* and negative control (Ambion) were reversely transfected into GBM cell lines using lipofectamine 2000 (Invitrogen) at a final concentration of 100 nM. The transfection efficiency analysis was monitored 24 hours after by qRT-PCR for miRNAs. The efficiency of siRNAs transfection was verified by qRT-PCR 48 hours after and by Western blot.

Target prediction and network analysis: Potential podoplanin microRNAs regulators were identified comparing the information from the known target prediction databases: TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), miRanda (<http://microrna.sanger.ac.uk/index.shtml>), RNAhybrid (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) and TarBase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>)

Protein extraction and Western blot analysis: Total protein was extracted using NP40 lysis buffer (0.5% NP40, 250mM NaCl, 50 mM Hepes, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5 mM egtazic acid) supplemented with protease inhibitors cocktails (Roche). Lysates was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min, and the supernatant was collected for experiments. 40 µg of protein lysates were resolved on denaturing SDS-polyacrylamide gels ranging from 4% to 20% and transferred to nitrocellulose membranes (Biorad). Membranes were probed with the following antibodies: primary antibodies anti-Podoplanin (Abcam) and anti-Vinculin (Santa Cruz) and secondary antibody labeled by horseradish peroxidase (Amersham Biosciences). The secondary antibody was visualized using chemiluminescent reagent ECL kit (Amersham Biosciences).

Mouse Intracranial Model: U251 cells were injected intracerebrally. After 21 to 35 days, animals were sacrificed and xenograph tumors were collected. Tumor cells were selected based on their invasion pattern. Non invasive cells (core) were collected from tumor core and invasive cells (out) were collected from dispersed malignant focus elsewhere. Total RNA and protein were isolated and miRNAs and podoplanin expression were analyzed by qRT-PCR and Western blot, respectively.

Vector construction: For luciferase assay, the three regions of about 200-700 pb, 750-1250 pb and 1500-2000 pb of *PDPN* 3'UTR (NM_001006624.1) were amplified by PCR from human genomic DNA and inserted into the pGL3 control vector (wild-type, wt) (Promega). The primers is shown in Supplementary Table 1. Four Mutants (mut) vectors were generated with deletions by using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) using the primers shown in Supplementary Table 2.

Luciferase Assay: LN229 cells were plated in 96-well dishes at 10^4 cells/well. Cells were transfected with miR-29b, miR-125a and scrambled (100nM) with *PDPN* 3'UTR constructs (wt and mut) and with pRLTK vector. Thirty six hours post-transfection, cells were incubated for 10 min with 20 μ l/well 1x Passive Lysis Buffer (Promega). Firefly and renilla luciferase activities were measured sequentially using dual-luciferase assays (Promega) by a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems). The experiments were performed in quadruplicate in three independent experiments. Values are shown as means \pm SEM.

Invasion Assay: GBM cells were transfected with miRNAs, siRNAs and controls and cultured for 48 hours, and transferred on the top of Matrigel-coated invasion chambers (24-well insert, 8 μ m pore size; BD Biosciences), according to the manufacturer's protocol. The invasive cells attached to the lower surface of the membrane insert were fixed in 100% methanol at room temperature for 2 mins and stained with toluidine blue 1% (Sigma) before counting under an inverted microscope. The experiments were performed in triplicate in three

independent experiments. Values are shown as means \pm SEM. In order to select cells with high invasive profile, we performed the invasion assay with U251 cells and cultured the invasive cells. Later, we repeated this procedure several times. These cells (high) were used to compare the expression of miRNAs with invasive and non invasive cells of *in vivo* model.

XTT Proliferation assay: GBM cells were seeded in 96-well plates at 2×10^4 per well and transfected with miRNAs, siRNAs and control. At different time points (24 h, 48 h, 72 h and 96 h), the culture medium was removed and replaced with culture medium containing 60 μ l of XTT dye (3 mg/ml) (XTT II, Roche, Molecular Biochemicals, IN, USA) to each well. The plates were incubated for 2 hours at 37°C and the product formazan was measured at 450 nm by using a microplate reader iMark (BioRad). The experiments were performed in triplicate in four independent experiments. Values are shown as means \pm SEM.

Apoptosis Assay: After transfection with miRNAs and controls, 1×10^6 GBM cells were incubated with 5 μ L of NucViewTM 488 caspase-3 substrate and 5 μ L of sulforhodamine 101-annexin V (Biotium Inc., USA) at room temperature in the dark for 30 min. Cells were also labeled with DAPI and examined by fluorescence microscopy. Levels of apoptosis were expressed as percentages of the NucView-positive cells over the total cell counts. The values of four independent experiments are shown as means \pm SEM.

Statistical Analysis: The results were analyzed by Student's test (two-tailed) ($P < 0.05$ was considered significant). All statistical analyses and graphing were performed using the SPSS 12.0 Windows version software (SPSS, USA). The data were analyzed by using Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Stanford University Labs, CA, EUA). MiRNAs with expression values smaller than 0.7 were considered under expressed and greater than 1.7 were overexpressed.

Results

Podoplanin depletion impaired invasion and proliferation in GBMs

Previous reports demonstrated that podoplanin is overexpressed in GBMs. Nonetheless, the participation of podoplanin in invasion process in GBMs is not completely elucidated. In this present study, we analyzed the impact of podoplanin depletion in cellular invasion and proliferation in GBMs. Podoplanin silencing by interference RNA was confirmed by qRT-PCR and Western blot analysis (Fig 1A). After podoplanin silencing, it was observed a decrease in invasion ($p=0,003$) (Fig 1B) and in proliferation ($p=0,02$) (Fig 1C) in silenced cells compared to control. These results suggest a important role of podoplanin in GBM tumorigenesis.

Differentially expressed miRNAs in GBMs compared to normal brain

In order to identify new miRNAs potentially relevant in GBM pathogenesis, we evaluate GBM patients samples by miRNA microarray, compared to normal brain. SAM Data analysis showed that are 47 miRNAs significantly under expressed and 41 significantly overexpressed in GBMs. The most down-regulated miRNAs were miR-128-1, miR-204, miR-128-2, miR-211, miR-139, miR-299-5p, miR-338, miR-486 , miR-495 and miR-129-2. Interestingly, miR-229 and miR-495 belong to the same cluster with 38 members. The most highly expressed miRNAs were miR-21, miR-383, miR-627, miR-10b, miR-196a-2, miR-206, miR-196a-1, miR-554, miR-595 and miR-219-1 (Table 1). No significant differences were observed among specific probes for the same miRNA. Our results confirmed the data published by others which found altered expression for miR-21, miR-383, miR-10b, miR-155, miR-29b, miR-149, miR-181a and miR-128-1. In addition, we identified miRNAs with significantly up-regulated in GBMs as miR-627, miR-196a, miR-206, miR-554, miR-595, miR-219-1 and miR-20a and down-regulated miRNAs as miR-99b, miR-145, miR-125a,

miR-495, miR-338, miR-211 and miR-204. As far as we know, the involvement of these miRNAs with GBM had not been reported to date. Thus, the study of these miRNAs would provide new insights in GBM molecular basis.

miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR-181a are down-regulated in GBMs and in CD133⁺ cells

To validate our microarray results, we analyzed another group of 15 GBM patients samples compared to normal brain by qRT-PCR. We selected miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR-181a, which were down-regulated in microarray analysis. The selection was based on *in silico* analysis which indicated these miRNAs as potential regulators of podoplanin. qRT-PCR analysis confirmed the data obtained by using the microarray for miR-29b (P=0.03) and miR-125a (P=0.001) (Fig 2A and 2B). MiR-149 and miR-181a were down-regulated in GBMs, yet the values were not significant (Fig 2C and 2D, respectively). Due to CD133⁺ cells isolated from GBMs express significantly higher levels of neural stem cell genes and promote tumor initiation in *in vivo* models, we analyzed if the down-regulated GBM miRNAs miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR-181a were also under expressed in CD133⁺ cells by qRT-PCR. CD133⁺ and CD133⁻ cells were isolated from U87 GBM cell line. Interestingly, the studied miRNAs miR-29b (P=0.02), miR-125a (0.0005), miR-149 (P=0.014) and miR-181a (P=0.01) were also down-regulated in CD133⁺ cells, compared to their negative counterpart (Fig 2A, 2B, 2C and 2D, respectively). These results and the fact that GBMs are poorly differentiated tumors suggest a potential role of these miRNAs in regulation of signaling pathways related to stem cell properties maintenance as differentiation and self-renewal. Based on our results by qRT-PCR and *in silico* analysis, we focused on miR29b and mi-125a.

miR-29b and miR-125a levels correlate with podoplanin expression in GBM cell lines

In order to correlate the expression of miR-29b and miR-125a and podoplanin, we analyzed their expression in 6 GBM cell lines by qRT-PCR. The results showed that LN319 cell line overexpresses podoplanin, as seen in others data, and does not express miR-29b (Fig 3A). In addition, these cells expressed lower levels of miR-125a compared to podoplanin (Fig 3B). By contrast, cell lines U87, U251, D54, U373 and T98G showed higher levels of miR-125a compared to podoplanin (Fig 3B). Also, miR-29b expression was higher in U87, U251, D54 and U373 cells compared to podoplanin (Fig 3A). However for T98G cell line, no significant differences between miR-29b and podoplanin expressions were observed (Fig 3A). The results suggest a inverse correlation between miR-29b and miR-125a and podoplanin expression. We and others previously demonstrated that podoplanin is overexpressed in GBMs (Shibahara et al., 2006; Scrideli et al., 2008). In the present study we demonstrated that miR-29b and miR-125a are under expressed in GBM patients, strengthening the results found in GBM cells.

Podoplanin is a direct target of miR-29b and miR-125a

In order to confirm the regulation of podoplanin by miR-29b and miR-125a, we analyzed the *PDPN* expression by Western blot 48 hours after the replacement of these miRNAs in LN319 cell line. Podoplanin expression decreased significantly after miR-29b and miR-125a replacement, compared to control (Fig 4A and 4B). Regulation of podoplanin by miR-29b and miR-125a was confirmed by luciferase assay. The results showed a significant reduction on luciferase activity in cells transfected with miR-29b ($P=0.0017$) and miR-125a ($P=0.003$), compared to scrambled (Fig 4C). Mutation of miR-29b and miR-125a interaction sites rescued the luciferase activity thus confirming a direct interaction of *PDPN* 3'UTR by these miRNAs. Therefore, we next analyzed the effect of these miRNAs on invasion in GBMs. In

addition, we sought to determine the role of miR-29b and miR-125a in apoptosis and proliferation in GBMs.

miR-29b and miR-125a impaired invasion in GBM cells

Knowing that miR-29b and miR-125a regulate podoplanin, we analyzed the involvement of these miRNAs in invasion regulation in GBMs. The results showed a significant reduction of 40% ($p=0.0003$) and 23% ($p=0.005$) of invasion compared to control in LN319 cells transfected with miR-29b and miR125a, respectively (Fig 5A). Also, a reduction of 23.5% ($p=0.03$) and 56% ($p=0.0008$) of invasion in U251 cells, after transfection with miR-29b and miR-125a, respectively (Fig 5B). In addition, we analyzed the expression dynamics of miR29b and miR-125a in *in vivo* models. After tumor growth arised from U251 cells intracerebrally injected in SCID mouse, we selected the xenograph tumor cells based on their invasion pattern. Non invasive cells were collected from tumor core and invasive cells were collected from dispersed malignant focus elsewhere. Also, in order to compare the invasive patterns between *in vivo* and *in vitro* models, we selected U251 cells with high invasive profile by using matrigel-coated transwell (high). We analyzed the expression of miR-29b and miR-125a in these cells by qRT-PCR. MiR-29b and miR-125a expression was compared between parental and high cells and between invasive and non-invasive cells from xenograph tumor. A reduction of miR-29b expression was observed in high cells compared to parental cells (Fig 6A). However, in *in vivo* studies, no differences were observed between non-invasive and invasive cells in miR-29b expression. MiR-125a expression was decreased in high cells compared to parental cells and in non-invasive cells compared to invasive cells ($p=0,001$) (Fig 6B). These results together with *in vitro* data suggest an important role of miR-125a in regulation of GBM invasion.

MiR-29b induces apoptosis in a TP53-dependent manner in GBM cells

In a previous study, miR-29b was reported to upregulate TP53 levels and induce apoptosis in a TP53-dependent manner. Thus, we sought to determine the role of miR-29b in apoptosis in GBMs by using the mutant TP53 GBM cell line U251 (CGT→CAT/arginine→histidine) and the wild-type TP53 cell line U87 (Van Meir et al., 1994). No significant differences were observed in mutant TP53 cells transfected with miR-29b compared to control (Fig 7A). However, miR-29b induced apoptosis in wild-type TP53 cells (P=0.01) (Fig 7B). Moreover, we analyzed if TP53 status influences miR-29b role in proliferation in GBM cells. No significant differences were observed in the two mutant TP53 cell lines, U251 and LN319, transfected with miR-29b, compared to control (Fig 7C and 7D). Interestingly, miR-29b reduced proliferation in wild-type *TP53* cells (P=0.0002) (Fig 7E). LN319 cells presents a mutation on *TP53* that also promotes a change of arginine for histidine (CGC→CAC/arginine→histidine) (Van Meir et al., 1994). These results confirm that miR-29b induces apoptosis as well as reduces proliferation in a TP53-dependent manner.

MiR-125a induces apoptosis in mutant TP53 cells and inhibit apoptosis and increases proliferation in wild-type TP53 cells

A report demonstrated that miR-125b is an important negative regulator of TP53 and promotes TP53-induced apoptosis during development and during the stress response. Here, we analyzed the impact of miR-125a replacement in apoptosis, considering the homology between miR-125a and miR-125b. Also, we investigated if miR-125a replacement affects proliferation in GBMs cells. MiR-125a inhibited apoptosis (P=0.02) and increased proliferation in wild-type TP53 cells (P=0.003) (Fig 7B and Fig 7E). These results suggest a regulation of TP53 by miR-125a, as demonstrated for miR-125b. Contrarily, miR-125a induced apoptosis in TP53 mutant cells (P=0.04) without affect proliferation (Fig 7C and 7D).

and 7E, respectively). These results suggest that the mutation on TP53 may influence the supposed regulation by miR-125a, instead of negatively regulating, it would promote the activation of mutant TP53. However, more studies have to demonstrate the relationship between miR-125a and TP53.

Discussion

In the present study we demonstrated that podoplanin depletion impaired invasion and proliferation in GBMs and is regulated by differentially GBM expressed miRNAs miR-29b and miR-125a. In addition, we demonstrated that the altered signaling pathways of invasion, apoptosis and proliferation which provide a selective advantage to tumors are affected by these miRNAs.

Podoplanin is up-regulated in several types of cancer compared to normal tissues, and is related to progression and malignancy in high grade gliomas. Nonetheless, the role in invasion process is unclear in GBMs. In this present study, we showed that podoplanin silencing impaired invasion and reduced proliferation in GBM cell lines. Interestingly, Wicki and colleagues (2006) have showed that podoplanin is expressed at the invasive edge of the tumours in about 80% of human squamous cell carcinomas, often in a one-cell layer. In high-grade gliomas, increased expression of podoplanin was associated malignant phenotype (Shibahara et al., 2006; Mishima et al., 2006). Podoplanin promotes migration and invasion by modulation of RhoA activity and actin cytoskeleton via phosphorylation of ezrin, one of the ERM (ezrin, radixin and moesin) proteins (Scholl et al., 1999; Martin-Villar et al, 2006; Wicki et al, 2006). It seems that depending on the type of tumor, podoplanin expression promotes migration and invasion in the absence or presence of cadherin switch and epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Wicki et al., 2006b; Martin-Villar et al., 2006; Wicki et al.,

2007). Podoplanin has been suggested as a novel marker for neural stem/progenitor cells and their derivative cells and for characterizing tumor properties and for examining *in situ* the analogy between normal neural stem/progenitor cells and brain tumor cells (Nakamura et al., 2007). Atsumi et al. (2008) and Shimada et al. (2009) suggested that podoplanin is a new marker for tumor-initiating cells with stem-cell like features and that the expression of this protein is related to immature state in squamous cell carcinomas differentiation process. The results suggest that podoplanin is related with invasion in GBMs. Nonetheless, *in vivo* studies are necessary to confirm our data.

In agreement with previous expression profiling studies, our results showed that miR-21, miR-10b (Chan et al., 2005; Ciafrè et al., 2005; Chen et al., 2008; Gabriely et al., 2008), miR-383 (Godlewisk et al., 2008) and miR-155 (Ciafrè et al., 2005; Chan et al., 2005) were up-regulated in GBMs and miR-149, miR-29b (Silber et al., 2008), miR-181a (Ciafrè et al., 2005; Shi et al., 2008) and miR-128-1 (Ciafrè et al., 2005; Silber et al., 2008; Godlewisk et al., 2008) were down-regulated in GBMs. Also, we identified up-regulated miRNAs which not have been cited yet as miR-627, miR-196a-2, miR-206, miR-554, miR-595 and miR-219 and down-regulated as miR-125a, miR-338, miR-204 and miR-211 to date. Based on others previous data and our results, we selected miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR-181a to validate miRNA microarray data by qRT-PCR. Also, these miRNAs were predicted for *PDPN* regulation by *in silico* analysis. MiR-149 and miR-181a were underexpressed in GBM yet the values were not significant. These results may be related to the fact that we used macrodissected GBM samples in miRNA microarray analysis and we wanted to validate the data using microdissected GBM samples. MiRNA microarray data were validated for miR-29b and miR-125a. MiR-29b is also down-regulated in several types of tumor as invasive breast cancer (Iorio et al., 2005), lung cancer (Yanaihara et al., 2006), chronic lymphocytic leukemia (Calin et al., 2005; Pekarsky et al., 2006), prostate cancer (Porkka et al., 2007),

colon cancer (Cummins et al., 2006) and uterine leiomyomas (Wang et al., 2007). To date, this is the first report of miR-125a down-regulation in GBMs. Others studies showed that miR-125a is down-regulated in breast cancer (Iorio et al., 2005), neuroblastoma (Laneve et al., 2007), ovarian cancer (Nam et al., 2008) and medulloblastoma (Ferretti et al., 2009). These results suggest that miR-29b and miR-125a are related to tumoral suppression roles in several types of cancer.

Recent reports demonstrated that some miRNAs related to GBMs regulate important molecular mechanism in neural stem cells (NSCs) as differentiation and self-renewal (Hatfield et al., 2008). Conversely, several studies revealed that genes related to self-renewal are also implicated in important vias in carcinogenesis (Godlewski et al., 2009). For example, it was demonstrated that the GBM down-regulated miRNAs miR-7, miR-9, miR-124, miR-128 and miR-137 act in various processes along the development as neuronal differentiation (Godlewski et al., 2009). It is interesting to note that we found miR-486 down-regulated in GBMs in microarray data analysis. Gal et al. (2008) demonstrated that miR-486 are down-regulated in CD133⁺ GBM cells and the transfection with this miRNA inhibited neurosphere formation, suggesting a role in cellular differentiation. Our findings showed that miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR-181a are under expressed in CD133⁺ cells compared to their counterpart, CD133⁻ cells. Interestingly, reports indicated that these miRNAs are expressed during development of brain and hematopoietic cells and are related to differentiation of precursor cells in many types of tumors. Smirnova et al. (2005) and Krichevsky et al. (2006) demonstrated that miR-125 are expressed during mouse brain development and is strongly induced during neural differentiation of embryonic stem cells (Rybak et al., 2008). Moreover, miR-125 induced P19 murine embryonal carcinoma cells development to neurons (Wu et al., 2005). The reconstitution of miR-29 expression promoted differentiation of rhabdomyosarcoma RH30 cells *in vivo* (Wang et al., 2008). In addition, Chen et al. (2004)

showed that miR-181a positively regulates B cells differentiation in bone marrow *in vivo*. Taken together, these results suggest that miR-29b, miR-125a and miR-181a present a potential role in differentiation of precursor cells in many tissues, including the brain. Also, the down-regulation of these miRNAs both in CD133⁺ cells and in GBM suggest a relationship of miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR-181a in self-renewal and tumorigenesis and the study of these miRNAs is important to reveal new essential molecular vias related to GBM progression. Nonetheless, the capacity of CD133 marker to distinguishes glioma CSCs is questionable at the moment. Reports showed that CD133 marker may also be expressed by progenitor cells and that CD133- tumors still demonstrate stem cell-like properties of self-renewal, multilineage differentiation, and xenograft tumor formation (Beier et al., 2007; Grey et al., 2009). Although other markers for CSCs have been suggested as BMI-1, nestin, Sox2 and CD15, (Joo et al., 2008; Ogden et al., 2008; Wang et al., 2008), there is no universal marker for GBMs to date (Gilbert & Ross, 2009; Park & Rich, 2009). However, CD133 marker is still useful to isolate a population of cells with stem cell-like features. It has been demonstrated that CD133⁺ GBM cells express significantly higher levels of NSC genes (Liu et al., 2006) and that CD133⁺ cells differentiation by BMP4 caused inhibition of tumor growth *in vivo* (Piccirillo et al., 2006). In addition, CD133⁺ cells present a significant tumorigenic potential *in vivo*, capacity of angiogenesis and multilineage differentiation, high resistance to radiation and chemotherapy (Bao et al., 2006). Moreover, a recent study demonstrated that differentially methylated genes are highly enriched for Polycomb repressive complex 2 targets in embryonic stem cells, suggesting that GBM may derived from precursor cells with stem cell-like characteristics (Martinez et al., 2009). Thus, these findings suggest that similar signaling pathways may be involved in normal NSCs and brain cancers (Gilbert & Ross, 2009).

As we found that miR-29b and miR-125a are down-regulated in GBMs and also were predicted by *in silico* analysis to regulate podoplanin, we sought to determine the relationship between these miRNAs and podoplanin and the impact of these miRNAs in invasion, apoptosis and proliferation in GBMs.

Our results indicated that there is an inverse correlation between miR-29b and miR-125a and podoplanin expression in GBM cell lines. Next, we demonstrated that miR-29b and miR-125a specifically interact with the 3'UTR of *PDPN* and regulate its expression levels. Podoplanin promotes tumor cell-induced platelet aggregation which is directly related with tumor protection from immune response (Philippe et al., 1993; Nash et al., 2002), promotion of tumor growth (Camerer et al., 2004), adhesion to the vascular endothelium via integrins, extravasation and metastasis (Nash et al., 2002). Also, podoplanin is a specific marker for lymphatic endothelial cells (LECs) and tumor-associated lymphangiogenesis (Breiteneder-Geleff et al., 1999; Ordonez, 2006). Thus, our results suggest that miR-29b and miR-125a might be related to these processes regulated by podoplanin. Important targets were validated for miR-125a and its homolog miR-125b as *lin-28* (Wu et al., 2005), *ERBB2* and *ERBB3* (Scott et al., 2007) and a truncated form of *trkC* receptor (Laneve et al., 2007; Ferretti et al., 2009). Regarding to miR29b, reports demonstrated that *TCLI* (Pekarsky et al., 2006), *MCL1* (Mott et al., 2007), *DNMT3A* and *DNMT3B* (Fabbri et al., 2007), *p85 α* (the regulatory subunit of PI3 kinase) (Park et al., 2008) and *YY1* (Wang et al., 2008) are validated targets. Interestingly, Park et al. (2008) also demonstrated that miR-29b regulates *Cdc42*, a small GTPase of Rho-subfamily, which regulates signaling pathways that control diverse cellular functions including cell morphology and migration. Likewise, podoplanin is related to migration and invasion by modulation the activity of *RhoA*, a member of Rho-subfamily as *Cdc42* (Martin-Villar et al., 2006; Wicki et al., 2006), confirming that most of miRNAs

regulate multiples genes which participate in related biological processes. In this regard, we analyzed the potential role of miR-29b and miR-125a in invasion in GBMs.

In this report, we showed that miR-29b and miR-125a replacement promoted a significant reduction in invasion processes in GBM cells. Moreover, our findings indicated that miR-125a expression decreases in invasive cells compared to non-invasive cells from xenograph model. Previous studies demonstrated that miR-29b is related to invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma via extracellular matrix proteins regulation (Sengupta et al., 2008). Nonetheless, more studies are necessary to confirm the participation of miR-29b in GBM invasion. Also, miR-125a and miR-125b reduced migration and invasion in neuroblastoma SKBR3 cells (Scott et al., 2007). The same study showed that miR-125a and miR-125a overexpression decreased motility in ERBB2 positive cells in breast cancer. Importantly, it was demonstrated that miR-125a is regulated by EGF signaling pathway and promoted migration and invasion inhibition in lung cancer cells (Wang et al., 2009). These results strongly suggest a important role of miR-125a in invasion in GBMs.

Park et al. (2008) showed that miR-29 (a, b and c) activate TP53 and induce apoptosis in a TP53-dependent manner. In this study it was demonstrated that miR-29b only induced apoptosis in wild-type TP53 cell lines as HeLa and MCF-7 to the detriment of MDA-MB-231 and SW480 cells, which present mutant TP53. Our results demonstrated that miR-29b induced apoptosis and also reduced proliferation in a TP53-dependent manner in GBMs. In the mutant TP53 GBM cell lines no effect was observed in proliferation and the differences in apoptosis was not significant compared to the control. MiR-29b also reduced proliferation of rhabdomyosarcoma RH30 cells *in vivo* (Wang et al., 2008). MiR-29b involvement was also showed by previous report which demonstrated that this miRNA regulates *MCL1*, member of BCL-2 family, and sensitized cholangiocarcinoma KMCH cells to apoptosis mediated by TRAIL treatment (Mott et al., 2008). These results strongly suggest that miR-29b has an

important role in apoptosis. This is particularly important in GBMs because TP53 mutations are significantly more frequent in secondary GBMs than in primary. (Ohgaki & Kleihues, 2009). Thus, these findings might be taken into consideration in the rational development of new therapeutic approaches in GBMs. Recently, Suzuki et al. (2009) demonstrated that TP53 promotes miRNAs processing by Drosha in response of DNA damage. Also, it was observed that mutant TP53 suppresses the expression of mature miRNAs and that wild-type TP53 increases post transcriptional maturation of miRNAs related to cellular growth. These findings suggest that there are more expressed miRNAs in the presence of wild-type TP53 and may explain the miR-29b dependency of TP53.

Our findings showed that miR-125a inhibited apoptosis and increased proliferation in wild-type TP53 GBM cell line. Previous studies demonstrated that miR-125b is an important negative regulator of TP53 and TP53-induced apoptosis during development and during the stress response (Le et al., 2009). It was also shown that ectopic expression of miR-125b significantly suppressed apoptosis mediated by TP53 in wild-type TP53 neuroblastoma cells SH-SY5Y. In other study it was demonstrated that miR-125b overexpression partially restored cellular viability and inhibited apoptosis in the GBM cell line U343, which present wild-type TP53, treated with ATRA (Xia et al., 2009). Moreover, miR-125b under expression reduced proliferation and increased the sensitivity of glioma cell lines to apoptosis induction by ATRA. In the same study, it was shown that miR-125b regulated *BMF*, which binds to BCL2 proteins and function as an apoptotic activator. These results suggest that miR-125a may also regulate wild-type TP53, taking into account the homology between miR-125a and miR-125b, inhibiting apoptosis and promoting cellular proliferation. Further study is needed to prove TP53 regulation by miR-125a.

Opposite results were found for miR-125a in mutant TP53 GBM cell lines. Our results showed that miR-125a induced apoptosis in mutant TP53 cell line. In addition, no significant

differences were observed in proliferation in two mutant TP53 cell lines. One hypothesis that would explain these results is that the *TP53* mutation promotes modifications in the supposed interaction sites of miR-125a and consequently, instead of negatively regulating, induces the activation of TP53 by miR-125a. However, further study is needed to elucidate these results. GBMs are characterized by cellular heterogeneity and these results may be important in the design of new therapeutic targets as it suggests that a miRNA may act as an oncogene or tumoral suppressor depending on the genetic profile differences in the same type of tumor.

In conclusion, miR-29b and miR-125a are down-regulated in GBMs and in CD133+ cells and are related to important biological processes as apoptosis, proliferation and invasion. We showed that miR-29b and miR-125a regulate podoplanin, a putative marker of neural stem cells and related to invasion and malignancy in GBMs. Our findings *in vitro* and *in vivo* demonstrated that miR-125a is a potential regulator of invasion in GBMs. MiR-29b induced apoptosis in GBM cell lines in a TP53-dependent manner. These findings may be important for the development of future therapies based on miRNAs.

References

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-5.

Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(1):36-41.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444(7120):756-60.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007; 67(9):4010-5.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91.

Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*. 1999;154(2):385-94.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 27;353(17):1793-801. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006; 355(5):533.

Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*. 2004;104(2):397-401.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65(14):6029-33.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83–86.

Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):412-9.

Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1351-8.

Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr., Sjoblom T, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:3687–92.

Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, Acs G. Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol.* 2006;19(5):708-16.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(40):15805-10.

Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Di Rocco C, Riccardi R, Giangaspero F, Farcomeni A, Nofroni I, Laneve P, Gioia U, Caffarelli E, Bozzoni I, Screpanti I, Gulino A. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer.* 2009; 124(3):568-77.

Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet.* 2008;9(11):831-42.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683-710.

Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5369-80.

Gal H, Pandi G, Kanner AA, Ram Z, Lithwick-Yanai G, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376(1):86-90.

Gilbert CA, Ross AH. Cancer stem cells: Cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem.* 2009 Sep 16. [Epub ahead of print]

Godlewski J, Newton HB, Chiocca EA, Lawler SE. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death Differ.* 2009 Jun 12. [Epub ahead of print]

Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* 2008;68(22):9125-30.

Gomez GG, Kruse CA. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol.* 2006;10(A):133-146.

Grey BR, Oates JE, Brown MD, Clarke NW. Cd133: a marker of transit amplification rather than stem cell phenotype in the prostate? *BJU Int.* 2009;103(7):856-8.

Hatfield S, Ruohola-Baker H. MicroRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 57–66.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-70.

Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JI, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong SC, Park WY, Lee DS, Kim H, Nam DH. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest.* 2008;88(8):808-15.

Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, Tsuruo T. Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem.* 2003;278(51):51599-605.

Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2005;26(4):195-200.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* 2008;68(10):3566-72.

Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):39-53.

Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 2006; 24: 857–864.

Laneve P, Di Marcotullio L, Gioia U, Fiori ME, Ferretti E, Gulino A, Bozzoni I, Caffarelli E. The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(19):7957-62.

Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* 2009; 23(7):862-76.

Liang H, Wu H, Giorgadze TA, Sariya D, Bellucci KS, Veerappan R, Liegl B, Acs G, Elenitsas R, Shukla S, Youngberg GA, Coogan PS, Pasha T, Zhang PJ, Xu X. Podoplanin is a highly sensitive and specific marker to distinguish primary skin adnexal carcinomas from adenocarcinomas metastatic to skin. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(2):304-10.

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2007;114(5):547.

Martinez R, Martin-Subero JI, Rohde V, Kirsch M, Alaminos M, Fernandez AF, Ropero S, Schackert G, Esteller M. A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics.* 2009;4(4):255-64.

Martín-Villar E, Megías D, Castel S, Yurrita MM, Vilaró S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 21):4541-53.

miRanda (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)

Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nakazawa Y, Kunita A, Fujita N, Tsuruo T, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol.* 2006;111(6):563-8.

Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26(42):6133-40.

Nakamura Y, Kanemura Y, Yamada T, Sugita Y, Higaki K, Yamamoto M, Takahashi M, Yamasaki M. D2-40 antibody immunoreactivity in developing human brain, brain tumors and cultured neural cells. *Mod Pathol*. 2006;19(7):974-85.

Nakayama Y, Matsumoto K, Nagato M, Inoue Y, Katsuki T, Minagawa N, Shibao K, Tsurudome Y, Hirata K, Higure A, Sako T, Nagata N. Significance of lymphangiogenesis as assessed by immunohistochemistry for podoplanin in patients with esophageal carcinoma. *Anticancer Res*. 2007;27(1B):619-25.

Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, Kim JW, Kim S. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2690-5.

Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*. 2002;3(7):425-30.

Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, Kang J, Assanah M, McKhann GM, Sisti MB, McCormick PC, Canoll P, Bruce JN. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*. 2008;62(2):505-14; discussion 514-5.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*. 2009 Aug 6. [Epub ahead of print]

Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006;13(2):83-8.

Park DM, Rich JN. Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells*. 2009;28(1):7-12.

Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(1):23-9.

Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006;66(24):11590-3.

Philippe C, Philippe B, Fouqueray B, Perez J, Lebret M, Baud L. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. *Am J Pathol*. 1993;143(6):1713-23.

Piccirillo SG, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006;(5):59-81.

PictaR (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)

Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(13):6130-5.

RNAhybrid (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>)

Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):987-93.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1479-86.

Scrideli CA, Carlotti CG Jr, Okamoto OK, Andrade VS, Cortez MA, Motta FJ, Lucio-Eterovic AK, Neder L, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Tone LG. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Neurooncol.* 2008;88(3):281-91.

Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B, Ahlquist P. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(15):5874-8.

Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* 2008;1236:185-93.

Shibahara J, Kashima T, Kikuchi Y, Kunita A, Fukayama M. Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system. *Virchows Arch.* 2006;448(4):493-9.

Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci.* 2009 Jul 21. [Epub ahead of print]

Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 2008;6:14.

Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature.* 2009;460(7254):529-33.

TaRbase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>)

Target Scan (<http://www.targetscan.org/>)

Tate MC, Aghi MK. Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics.* 2009;6(3):447-57.

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, Mittal K, Soteropoulos P, Wei JJ. A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(4):336-47.

Wang, H. et al. NF- κ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2008; 14:369–381.

Wang, H. et al. NF- κ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2008; 369–381.

Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* 2006;9(4):261-72.

Wu L, Belasco JG. Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9198-208.

Wu L, Belasco JG. Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9198-208.

Xia HF, He TZ, Liu CM, Cui Y, Song PP, Jin XH, Ma X. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf. *Cell Physiol Biochem.* 2009;23(4-6):347-58.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006; 9(3):189-98.

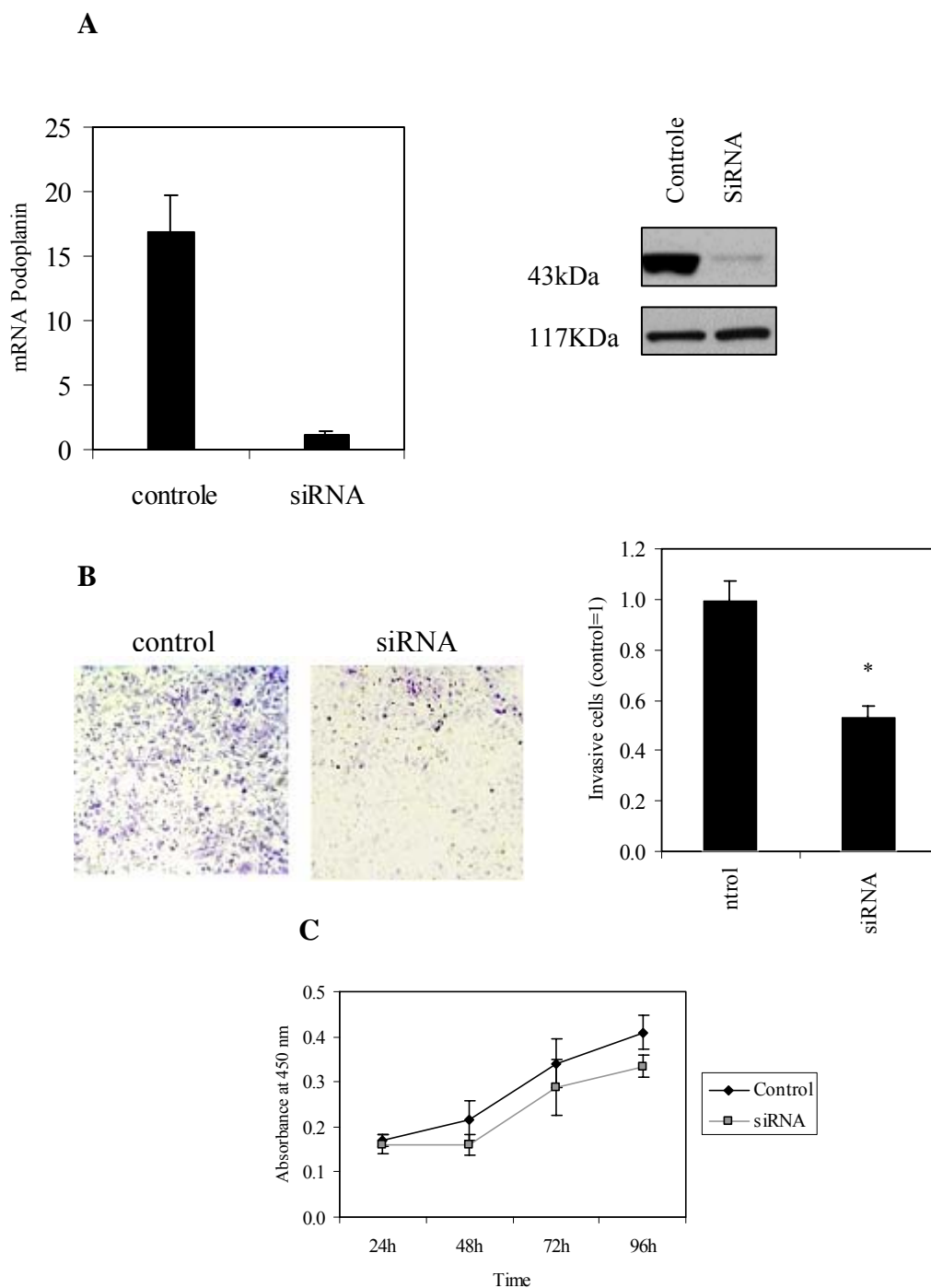


Figure 1. *PDPN* silencing impaired invasion and reduced proliferation. LN319 cells were transfected with siRNAs and control (100nM) with lipofectamine. *PDPN* silencing was confirmed by qRT-PCR and Western blot (A). Vinculin was used as a loading control. Invasion assay using transwell chambers coated with matrigel was performed 96 hours after transfection and control (B). Cellular proliferation was assessed 24, 48, 72 and 96 hours after transfection with siRNAs and control (C).

Table 1. MiRNAs with significantly different expression patterns between GBM and normal brain.

miRNA	chromosomic region	location/organization	main validated targets*	related reports in GBM
Up-regulated (>1.7)				
miR-21	17q23.1	intergenic/single	<i>PTEN</i> , <i>PDCD4</i> , <i>TPMI</i>	Ciafrè et al., 2005; Silber et al., 2008; Godlewski et al., 2008
miR-383	8p22	intronic/single	-	Godlewski et al., 2008
miR-627	15q15.1	intronic/single	-	-
miR-10b	2q31.1	intergenic/single	-	Ciafrè et al., 2005; Silber et al., 2008; Godlewski et al., 2008
miR-196a-2	12q13.13	intergenic/single	-	-
miR-206	6p12.2	intergenic/cluster	<i>ERalpha</i>	-
miR-196a-1	17q21.32	intergenic/single	-	-
miR-554	1q21.3	intronic/single	-	-
miR-595	7q36.3	intronic/single	-	-
miR-219-1	6p21.32	-	-	-
Down-regulated (<0.7)				
miR-128-1	2q21.3	intronic/single	<i>E2F3a</i>	Ciafrè et al., 2005; Silber et al., 2008; Godlewski et al., 2008
miR-204	9q21.11	intronic/single	-	-
miR-128-2	3p22.3	intronic/single	-	-
miR-211	15q13.3	intronic/single	-	-
miR-139	11q13.4	intronic/single	-	Silber et al., 2008; Godlewski et al., 2008
miR-299	14q32.31	intergenic/cluster ¹	-	Godlewski et al., 2008
miR-338	17q25.3	intronic/cluster	<i>COXIV</i>	-
miR-486	8p11.21	intronic/single	-	Godlewski et al., 2008
miR-495	14q32.31	intergenic/cluster ¹	-	-
miR-129-2	11p11.2	intergenic/single	-	Silber et al., 2008

*TarBase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>). ¹ member of the same cluster.

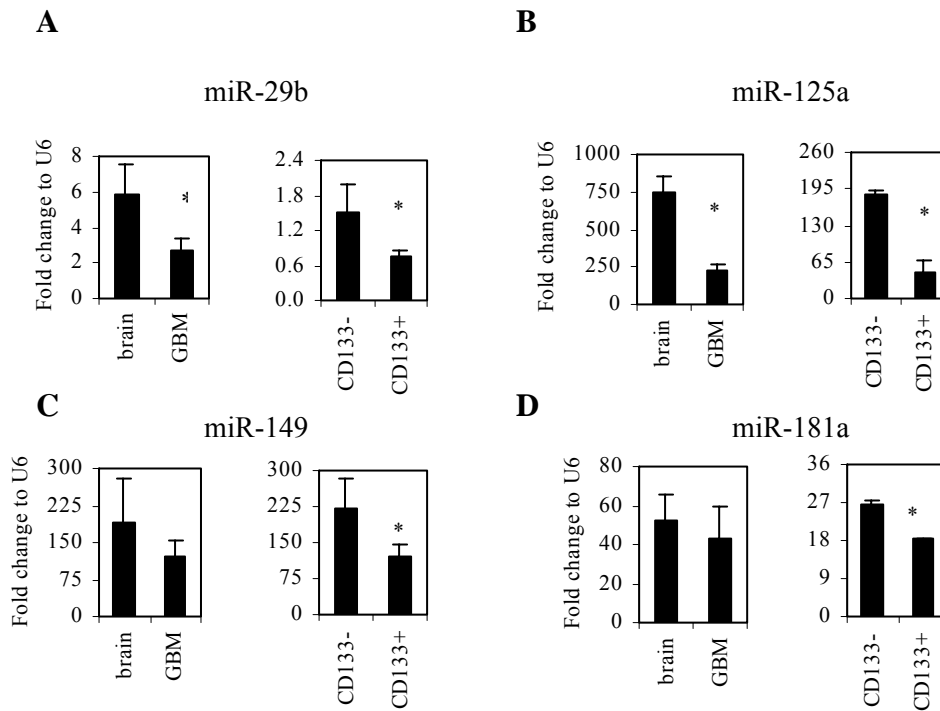


Figure 2. miR-29b (A), miR-125a (B), miR-149 (C) and miR-181a (D) are down-regulated in GBMs and in CD133⁺ cells. miR-29b, miR-125a, miR-149 and miR181a levels were measured by qRT-PCR using U6 levels as internal control. The comparative Ct method was used to calculate the fold changes of miRNA compared with *RNAU6B* small nuclear RNA expression. Results were expressed as mean \pm SEM. The asterisk represents a significant difference ($P < 0.05$) by Student's *t*-test.

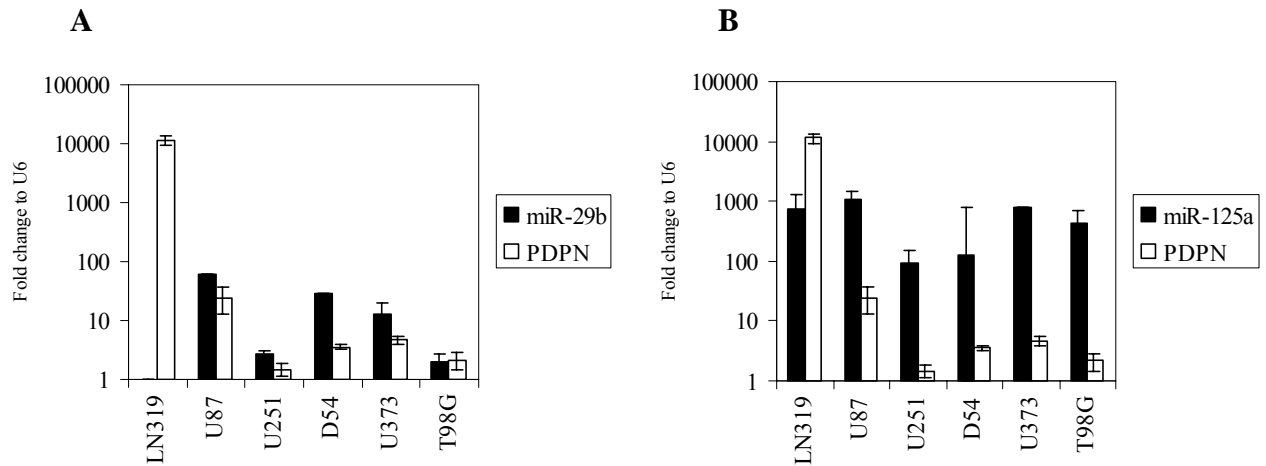


Figure 3. Inverse correlation of miR-29b and miR-125a levels with podoplanin expression in GBM cell lines. qRT-PCR for *PDPN* expression compared to miR-29b (A) and miR-125a (B) in LN319, U87, U251, D54, U373 and T98G. *PDPN*, miR-29b and miR-125a levels were measured by qRT-PCR using U6 levels as internal control. LN319 overexpresses podoplanin compared to miR-125a and does not express miR-29b. The comparative Ct method was used to calculate the fold changes of miRNA compared with *RNAU6B* small nuclear RNA expression.

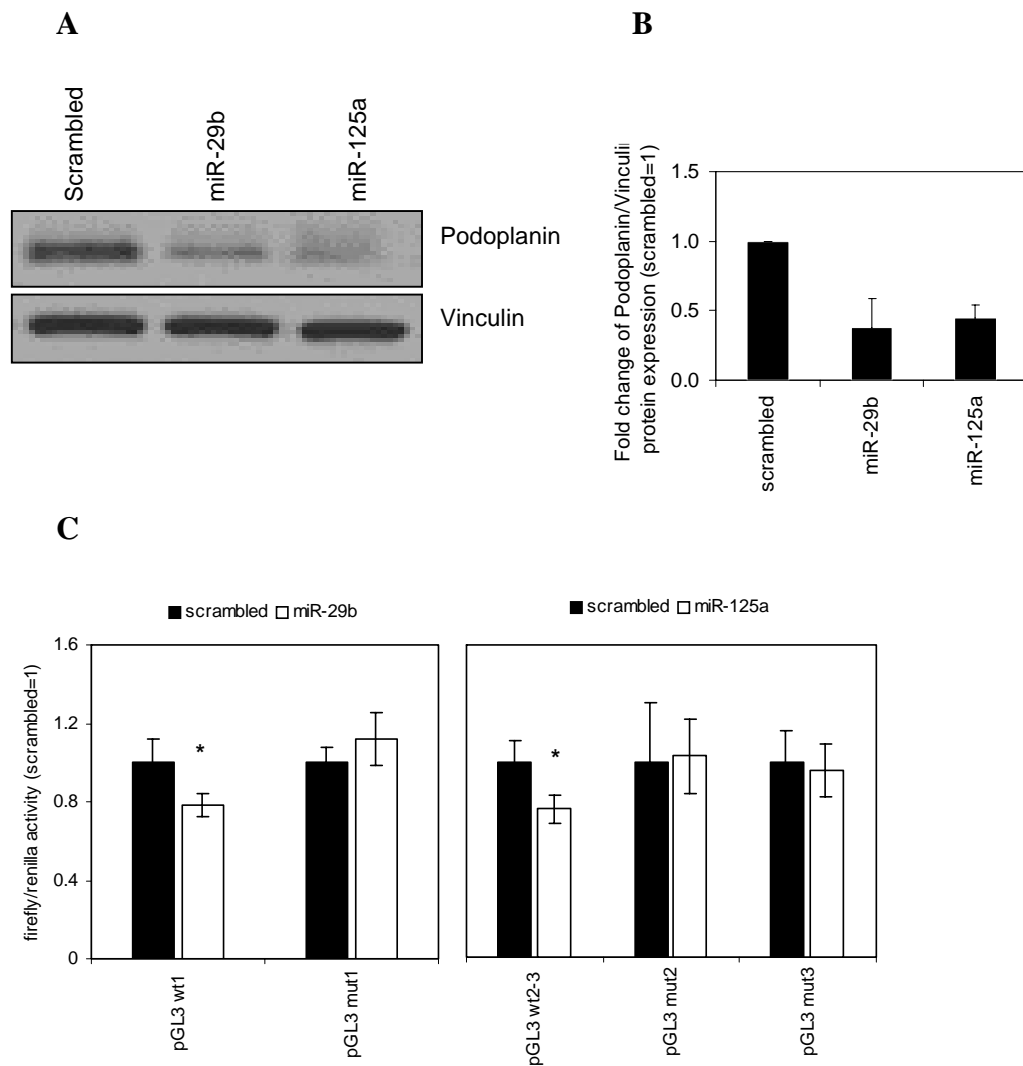


Figure 4. MiR-29b and miR-125a down-regulate podoplanin levels and target the *PDPN* 3'UTR. LN319 cell line was transfected with miR-29b, miR-125a and scrambled using lipofectamine. After 48 hours, cell lysates were collected and run on an SDS-Page for western blotting (A) and the fold changes of podoplanin ratios were calculated compared to scrambled by using vinculin was used as a loading control (B). LN229 cell line was transfected either with the wild-type *PDPN* 3'UTR or with mutants bearing deletions at predicted miR-29b and miR-125a interaction sites along with the scrambled, miR-29b, or miR-125a using Lipofectamine. After 36hrs, luciferase activity was determined using dual-luciferase assays (C). Values represent averages and bars represent S.D. of three independent experiments. Results were expressed as mean \pm SEM. The asterisk represents a significant difference ($P < 0.05$) by Student's *t*-test.

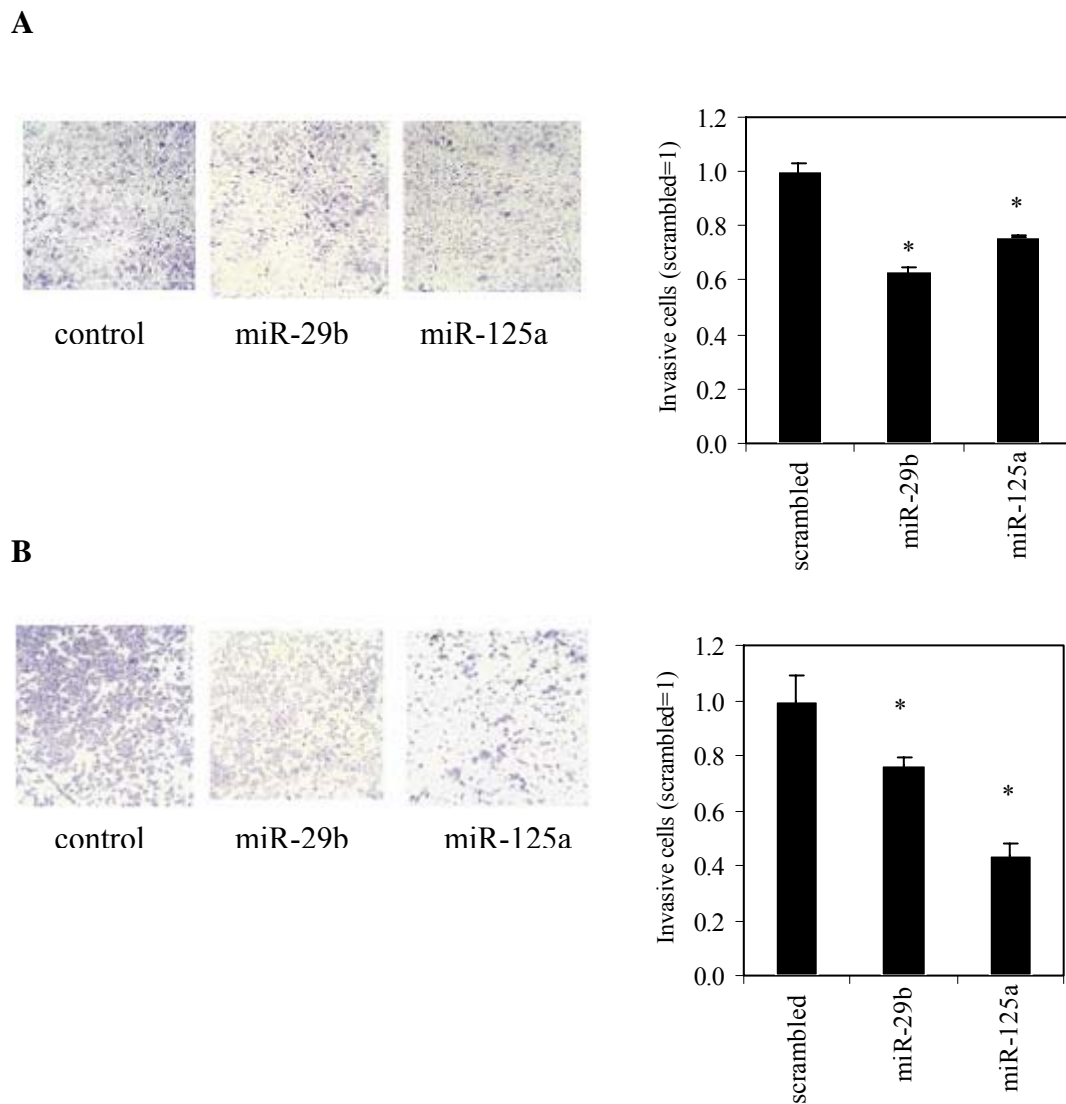


Figure 5. Invasion assay using transwell chambers coated with matrigel was performed 48 hours after LN319 (A) and U251 (B) transfection with miR-29b and miR-125a and scrambled. In A and B values represent averages and bars represent S.D. of three independent experiments. Results were expressed as were expressed as mean \pm SEM. The asterisk represents a significant difference ($P < 0.05$) by Student's *t*-test.

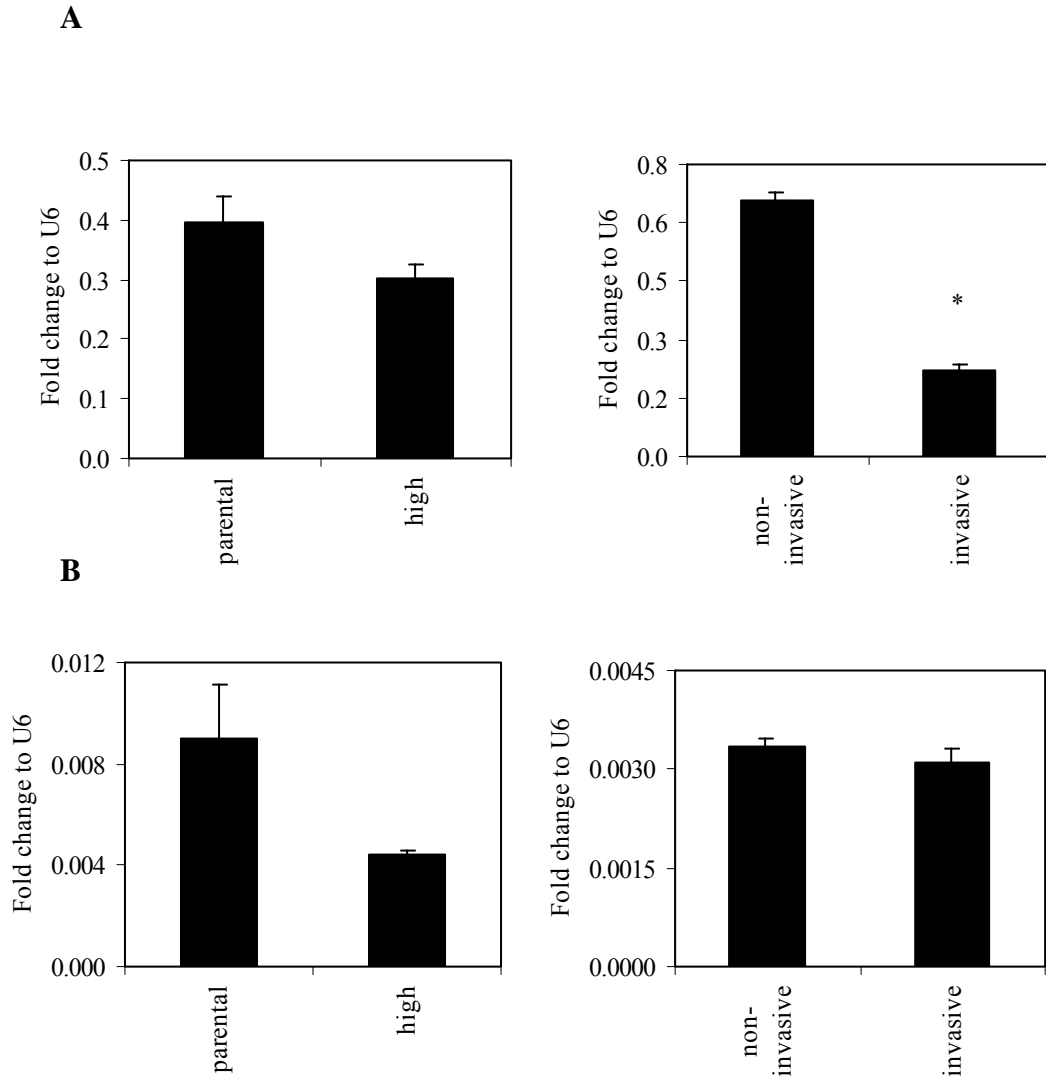


Figure 6. MiR-29b and miR-125a expression was analyzed by qRT-PCR in parental cells compared to cells with high invasive profile selected by invasion assays *in vitro* using transwell chambers coated with matrigel (high) and in non-invasive cells (core) compared to invasive cells cells collected from xenograft tumor raised from U251 cells injected intracranially in SCID mouse model.

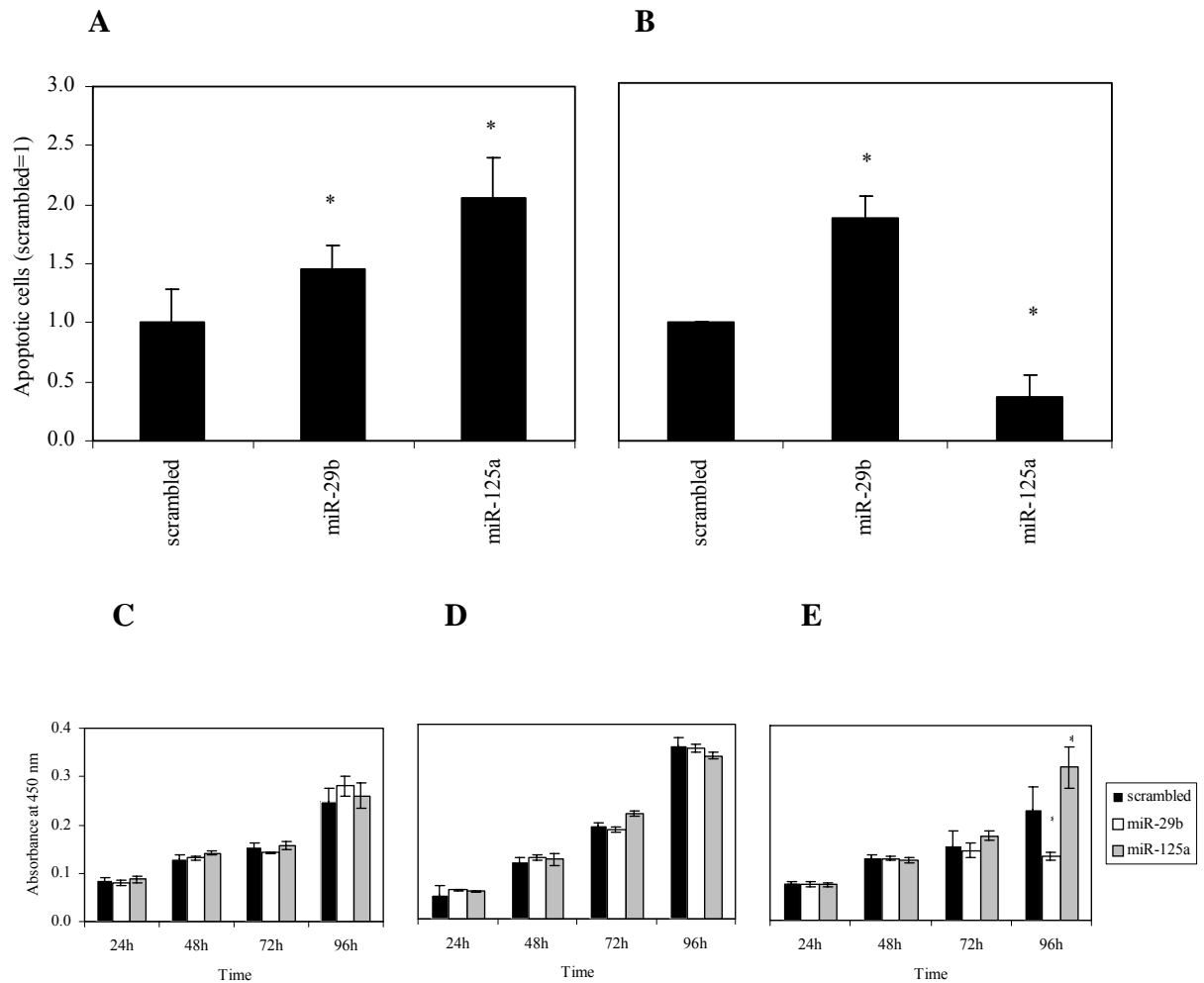


Figure 7. MiR-29b induces apoptosis and proliferation in a TP53-dependent manner in GBM cells and miR-125a induces apoptosis in mutant TP53 cells and inhibit apoptosis and increases proliferation in wild-type TP53 cells. Apoptosis assay was performed 48 hours after U251 (A) and U87 (B) transfection with miR-29b and miR-125a and scrambled. Cellular proliferation was assessed 24, 48, 72 and 96 hours after transfection of LN319 (C), U251 (D) and U87 (E) with miR-29b, miR-125a and scrambled. Values represent averages and bars represent S.D. of three independent experiments. Results were expressed as were expressed as mean \pm SEM. The asterisk represents a significant difference ($P < 0.05$) by Student's *t*-test.

Supplementary Table 1. Primers used in *PDPN* 3'UTR cloning

Primers	sequences	position region 3'UTR
PDPN-1	F:AACCGAAGGAAAGACCGTTCACCA R:TCTGCACCAGCTAAAGGCAGTTGT	250-500
PDPN-2	F:GCTGGTCCAGATTAATCATTTCAAAGAC R:CCAGAATTGCACAACCGCCATCAT	750-1250
PDPN-3	F:ACTATCATTCGGAAGCACAGCCCA R:CATGTCTACACTGCATTGAGCACC	1500-2000
GAPDH	GTCATCAATGGAAATCCCATCACC TAATACGACTCACTATAGGGA	-

Supplementary Table 2. Primers used in site-directed mutagenesis in *PDPN* 3'UR predicted sites

miRNA	vector pGL3	primers	Deletion
miR-29b	mut 1-S	GAGGAAGCTGCTGGATGCTTAAAGAGGCTCAAGTGTGTTGAAA	7bp
	mut 1-AS	TTTCAAACACACTTGAGCCTCTTTAAGCATCCAGCAGCTTCCTC	
miR-125a	mut 3-S	ACTTCCCTCAGATGATGAGGAGCTAAGGGGGCAGCCTTCTCTCT	6bp
	mut 3-AS	AGAGAGAAGGCTGCCCCCTTAGCTCCTCATCATCTGAGGGAAGT	
miR-125a	mut 4-S	AAGAACAAAATAAAGGAGCCCATCATTCTGTCTCAGCACCATCC	5bp
	mut 4-AS	GGATGGTGCTGAGACAGAATGATGGGCTCCTTTATTTTGTCTT	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)