

Inhibition of Hedgehog signaling pathway affects the expression of miR-20a and miR-31

Luciana Roberge¹, Ana Carolina Origas-Alves², Carmen K. Rebelatto¹, Bruno Dallagiovanna², Patrícia Shigunov^{2,*}

ABSTRACT

MicroRNAs are small RNA molecules (~ 22 nucleotides) that act as post-transcriptional regulators of gene expression by inhibiting translation of messenger RNAs. MicroRNAs are involved in regulating many biological and pathological processes, as well as the Hedgehog (Hh) signaling pathway. We evaluate the expression of four miRNAs (miR-20a, miR-31, miR-17 and miR-199b5p) in human adipose-derived stem cells under activation and blockade of Hh signaling pathway. Cells were treated with purmorphamine (Hh activator) or cyclopamine (Hh blocker) for 24 hours. RNA extraction and cDNA were performed to analyze of miRNAs expression by quantitative RT-PCR. The expression level of miR-20a and miR-31 increased after blocking Hh signaling pathway, thus these miRNAs may be involved in control of proliferation in stem and cancer cells. MiR-20a and miR-31 are strong candidates for biomarkers of Hh pathway.

Keywords: *MicroRNA, adipose stem cells, purmorphamine, Cyclopamine, Hedgehog.*

Inibição da via de sinalização Hedgehog com ciclopamina afeta a expressão de miR-20a e miR-31

RESUMO

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA (~ 22 nucleotídeos), que atuam como reguladores pós-transcricional da expressão de genes, inibindo a tradução do RNA mensageiro. MicroRNAs estão envolvidos na regulação de muitos processos biológicos e patológicos, assim como a via de sinalização Hedgehog (Hh). Nós avaliamos a expressão de quatro microRNAs (miR-20a, miR-31, miR-17 e miR-199b5p) em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano sob ativação e bloqueio da via de sinalização Hh. As células foram tratadas com purmorfamina (ativador da via Hh) ou ciclopamina (bloqueador da via Hh) durante 24 horas. Extração de RNA e cDNA foram realizadas para fazer a análise da expressão dos miRNAs por RT-PCR quantitativa. O nível de expressão do miR-20a e miR-31 aumentou após o bloqueio da via de sinalização Hh, sendo assim, esses miRNAs podem estar envolvidos no controle da proliferação de células-tronco e câncer. O miR-20a e o miR-31 são fortes candidatos para biomarcadores da via Hh.

Palavras-chave: MicroRNA, Células-tronco de Tecido Adiposo, Purmorfamina, Ciclopamina, Hedgehog.

*Autor para correspondência.

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brasil

²Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, Curitiba, Brasil, shigunov@tecpar.br

INTRODUÇÃO

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (Kim, 2005). Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se geralmente à região 3' não traduzida (3'-UTR) de RNAs mensageiros (RNAm)-alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis proteicos de seus genes-alvos, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Kim, 2005). Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a atenção da comunidade científica pelas evidências que indicavam que estas moléculas poderiam ter papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos. Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoiese, entre outras funções (Chen and Lodish 2005; Esau et al. 2004). Os miRNAs constituem marcadores ideais para caracterização molecular, uma vez que são menos susceptíveis a degradação e alterações quando comparados às amostras de mRNA (He and Hannon 2004).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' não traduzida depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo. O pareamento de modo imperfeito com o RNAm acarreta na inibição translacional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos (Brennecke et al. 2005). Alguns estudos indicam que um único miRNA possa regular cerca de duzentos RNAs apresentando funções totalmente diversas. Além disso, através da regulação global da expressão gênica celular e associação a diferentes funções, torna-se evidente que os miRNAs possam alterar o progresso de diversas patologias (Jones et al. 2012).

A família de genes Hedgehog codifica moléculas sinalizadoras que são essenciais para a padronização de membros e crescimento tanto de invertebrados quanto de vertebrados (Ingham and McMahon 2001). Sonic Hedgehog (Shh) é o membro mais estudado da família Hh. A proteína Shh age através da sua ligação a um receptor de membrana chamado Patched (Ptch1). Essa ligação inibe Ptch1 e libera a proteína de membrana Smoothened (Smo) e inibe a clivagem proteolítica do fator de transcrição Gli, levando a família de proteínas Gli a entrar no núcleo da célula e agir como um ativador de

transcrição dos genes dessa via (Hooper and Scott 2005; Jia and Jiang 2006).

A via de sinalização Hedgehog (Hh) está relacionada com processos de proliferação celular, diferenciação, angiogênese, remodelamento da matriz celular e homeostase de células-tronco. Na via de sinalização Hh várias mutações têm sido identificadas, incluindo mutações por perda de função no gene Ptch1 e mutações por ganho de função do gene Smo (Yauch et al. 2009).

A via de sinalização Hh é inibida por uma droga chamada ciclopamina (Chen et al. 2002). Este efeito inibitório é mediado através da ligação direta de ciclopamina à proteína Smoothened (Smo). A Ciclopamina é um alcaloide esteroidal, com efeito teratogênico e com atividade antitumoral, decorrente da sua capacidade de bloquear as respostas celulares na via de sinalização Hedgehog em vertebrados (Berman et al. 2002; Chen et al. 2002). Plaisant e colaboradores demonstraram em 2011 que a inibição da via de sinalização Hh com ciclopamina afeta a proliferação e clonogenicidade de células-tronco mesenquimais humanas. Além disso, outros autores também avaliaram o papel inibitório da proliferação pela ciclopamina (Cai et al. 2012; Warzecha et al. 2006; Wu et al. 2013).

A via de sinalização Hh pode ser ativada por uma droga chamada purmorfamina (Wu et al. 2004). A investigação sobre o mecanismo de ação da purmorfamina indica que essa droga liga-se diretamente ao receptor transmembrana Smo, responsável pela ativação do sinal da via de sinalização Hedgehog. Essa droga potencializa o processo de proliferação celular de células-tronco mesenquimais humanas (Hong et al. 2013).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de quatro miRNAs (miR-17, miR-20a, miR-31 e miR-199b-5p) em célula-tronco derivadas de tecido adiposo tratadas com purmorfamina e ciclopamina (ativador e inibidor da via de sinalização Hh, respectivamente) em busca de biomarcadores da via de sinalização Hh. Os miRNAs selecionados para o estudo foram baseados no trabalho de Zhang e colaboradores (2012) que identificaram miRNAs diferencialmente expressos em células-tronco derivadas de tecido adiposo induzidos à diferenciação osteogênica. Como a via de sinalização Hedgehog também está associada ao processo de diferenciação (Cai et al. 2012; James et al. 2010; Warzecha et al. 2006; Wu et al. 2013; Wu et al. 2004), decidimos avaliar o

comportamento desses miRNAs com essa via bloqueada ou ativada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e Cultivo Celular

Células-tronco de tecido adiposo (CTA) foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica e procedimentos de dermolipectomia. As amostras foram coletadas após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecidas, de acordo com as diretrizes para a pesquisa envolvendo seres humanos, e com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil (número de aprovação 419/07). O isolamento, o cultivo e a caracterização das células foi realizado como descrito previamente por Rebelatto e colaboradores (Rebelatto et al. 2008). Resumidamente, as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 (Gibco) suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As culturas foram mantidas em estufa de atmosfera úmida, 5% CO₂, 37°C (estufa HEPA Class 100, ThermoScientific) e as trocas de meio foram realizadas duas vezes por semana. Os testes foram realizados com culturas celulares entre passagens 3 e 6. Quando as culturas celulares atingiram 50-60% de confluência, 300 nM de ciclopamina (Chen et al. 2002) ou 3µM de pumorfamina (Faghihi et al. 2013) foram adicionadas as garrafas de cultivo e após 24 horas, o RNA total das amostras foi extraído. Os experimentos foram realizados com CTA de três doadores diferentes (triplicata biológica).

Extração de RNA

As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e 500 µl de TRIzol foi adicionado aos frascos de cultura para a lise das células. O TRIzol da cultura foi recolhido em tubos de 1,5 mL e 100 µl de clorofórmio foi adicionado em cada tubo (amostra) para permitir a dissociação completa de complexos nucleoproteicos. Os tubos foram agitados vigorosamente por aproximadamente 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação a amostra se dividiu em duas fases (uma superior incolor e uma inferior vermelha), a fase incolor foi retirada e transferida para um novo tubo onde foi adicionado 250 µl de

álcool isopropílico e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C.

Com o término da centrifugação, a fase líquida foi descartada, 500 µl de etanol 75% foi adicionado ao material sedimentado e centrifugado novamente a 7.600 xg por 5 minutos a uma temperatura de 4°C. Em seguida descartou-se a fase líquida. Os tubos foram colocados no termociclador para evaporação do líquido restante, posteriormente, foi adicionado 15 µl de água livre de RNase para eluir o RNA, colocadas no termociclador a 55°C por 5 minutos e medida sua absorvância.

Síntese de cDNA

A reação de poliadenilação consiste em adicionar cauda de adeninas à extremidade 3' das moléculas de RNAs com o auxílio da enzima poli-A polimerase (PAP). Após a poliadenilação, o RNA foi usado como molde para sintetizar o cDNA (DNA complementar). Para a adição da cauda Poli-A e síntese de cDNA foi utilizado o kit da Agilent Affinity Acript RT (Figura 1).

Adição da Cauda Poli-A

Para a reação de poliadenilação foram adicionados os seguintes componentes: 2,5µl de RNA, 4,0µl de Buffer EPAP, 1,0µl de ATP, 1,0µl de Enzima PAP e 11,5µl de água livre de RNase para completar o volume final de 20µl. Os tubos foram colocados no termociclador a 37°C por 30 minutos e em seguida as amostras foram submetidas à temperatura de 95°C por 5 minutos para terminar a adenilação.

Síntese de cDNA

Para cada amostra de RNA foi preparado uma reação de síntese de cDNA utilizando os seguintes componentes: 2,0 µl de Buffer RT, 4 µl da reação de poliadenilação, 0,8 µl de dNTP, 1,0 µl de Primer adaptador, 1,0 µl de ART Block (enzima) e 11,2 µl de água. As amostras foram colocadas no termociclador a 55°C por 5 minutos, em seguida submetidas a 25°C por 15 minutos, depois a 42°C por 30 minutos e por fim submetida a 95°C por 5 minutos para terminar a transcrição reversa. Posteriormente foi adicionado 280 µl de água livre de RNase e medida sua absorvância.

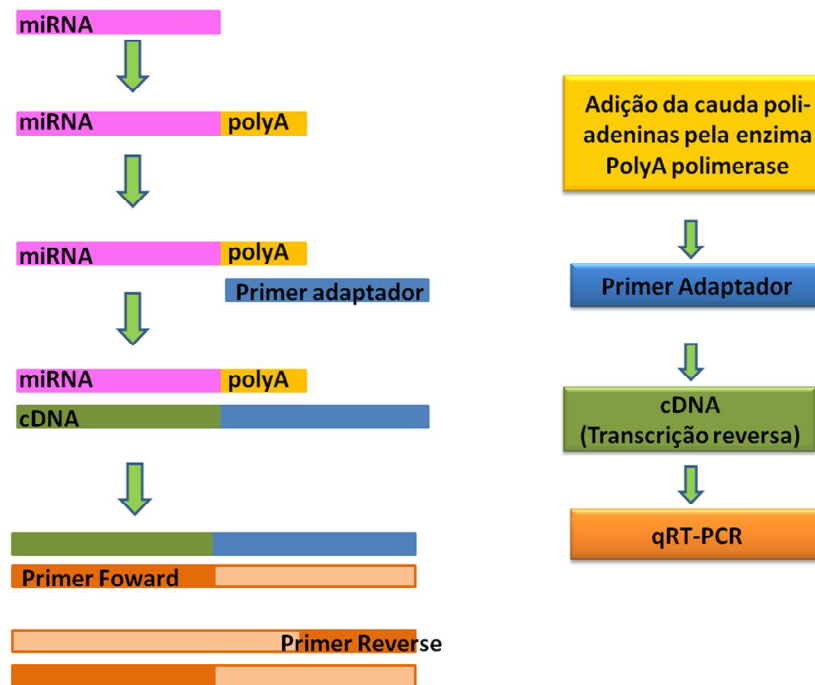


Figura 1: Esquema da síntese de cDNA a partir de miRNA.

PCR em Tempo Real

Para a PCR em tempo real foi utilizado um mix com os seguintes componentes: 5µl de SYBR, 0,5 µl de Primer F (Tabela 1), 0,4 µl de Primer R (componente do Kit Agilent Affinity Acript RT) e 1,6 µl de água. Em cada poço foi adicionado 7,5 µl do mix e 2,5 µl de cDNA, as amostras foram feitas em triplicata biológica e técnica.

O equipamento utilizado foi o 7500 Real Time PCR System com o software 7500 System SDS. O programa da PCR foi: primeira fase (1 ciclo) com 95°C por 5 minutos para garantir a desnaturação, a segunda fase (55 ciclos) com 95°C por 15 segundos para desnaturação, 55°C por 15

segundos para anelamento e 72°C por 32 segundos para extensão e a terceira fase (etapa de dissociação) com 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

A quantidade relativa foi calculada com base na quantidade determinada por uma amostra diluída em série (5 diluições), curva de diluição. A quantidade relativa dos miRNAs foram normalizados pela expressão de um pequeno RNA nuclear não codificante denominado U6snRNA (Zhang et al. 2012). Para o experimento de qRT-PCR, cada amostra biológica foi avaliada em triplicata técnica.

Tabela 1. Primers utilizados para avaliar a expressão de miRNAs específicos.

miRNAs	Sequência dos primers
hsa-mir-17	5´ACACTCCAGCTGGGCAAAGTGCTTACAGTGCA3´
hsa-miR-20a	5´ACACTCCAGCTGGGTAAAGTGCTTATAGTGCA3´
hsa-mir-31	5´ACACTCCAGCTGGGAGGCAAGATGCTGGCATA3´
hsa-miR-199b-5p	5´ACACTCCAGCTGGGCCAGTGTTTACTACT3´
U6snRNA*	5´CTCGCTTCGGCAGCACATATACT3´

* Gene U6snRNA utilizado como normalizador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MiR-17, miR-20a, miR-31 e miR-199b-5p são expressos em células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA)

Nós avaliamos a expressão dos miRNAs mir-17, miR-20a, miR-31 e miR-199b-5p em CTA por RT-PCR. Os primers utilizados para as ampliações dos miRNAs foram avaliados em cDNA de CTA. As reações de PCR foram

realizadas como descrito em materiais e métodos. Após a reação, as amostras foram resolvidas em gel de eletroforese de agarose 3%, o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de UV (Figura 2). Os primers amplificaram uma única banda do tamanho esperado (~70 pares de base). Sendo assim, CTA expressam os miRNAs mir-17, miR-20a, miR-31 e miR-199b-5p.

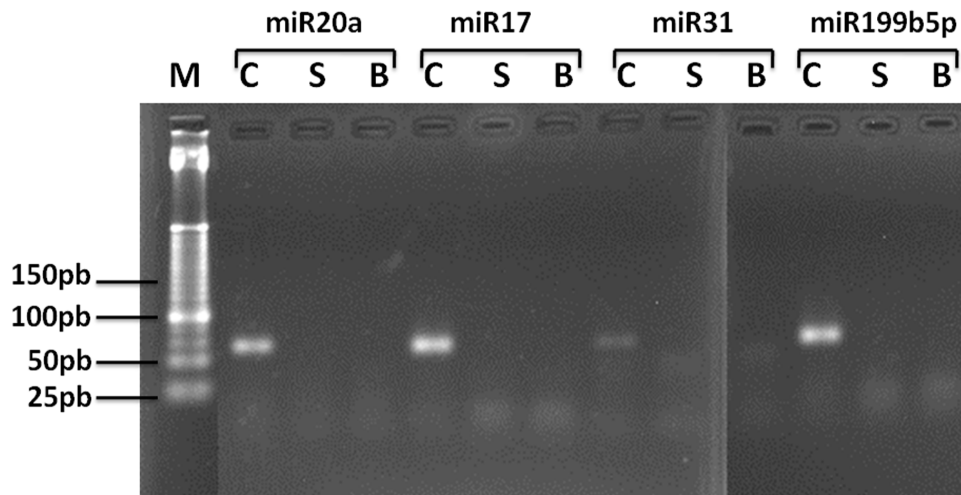


Figura 2: MiR-17, miR-20a, miR-31 e miR-199b-5p são expressos em CTA. Os miRNAs foram amplificados e resolvidos em gel de agarose 3%. O cDNA de células-tronco foram sintetizados a partir de RNA submetidos à reação de adição da cauda poli-A com enzima Poly-A polimerase (C) ou sem enzima (S). Como controle negativo a reação de PCR foi realizada na ausência de cDNA (B- branco). M – Marcador 50pb ladder (Invitrogen).

Expressão do miR-20a e miR-31 aumenta com o bloqueio da via Hh

Nós avaliamos por RT-PCR quantitativo a expressão de miR-20a, miR-31, miR-17 e miR-199b-5p em células-tronco derivadas de tecido adiposo quando a via Hh está ativa (tratamento com purmorfamina) ou inibida (tratamento com ciclopamina).

A expressão do miR-20a aumentou significativamente após tratamento com ciclopamina comparado com o controle sem tratamento (Figura 3A). No entanto, o tratamento com purmorfamina não afetou de maneira significativa a expressão do miR-20a.

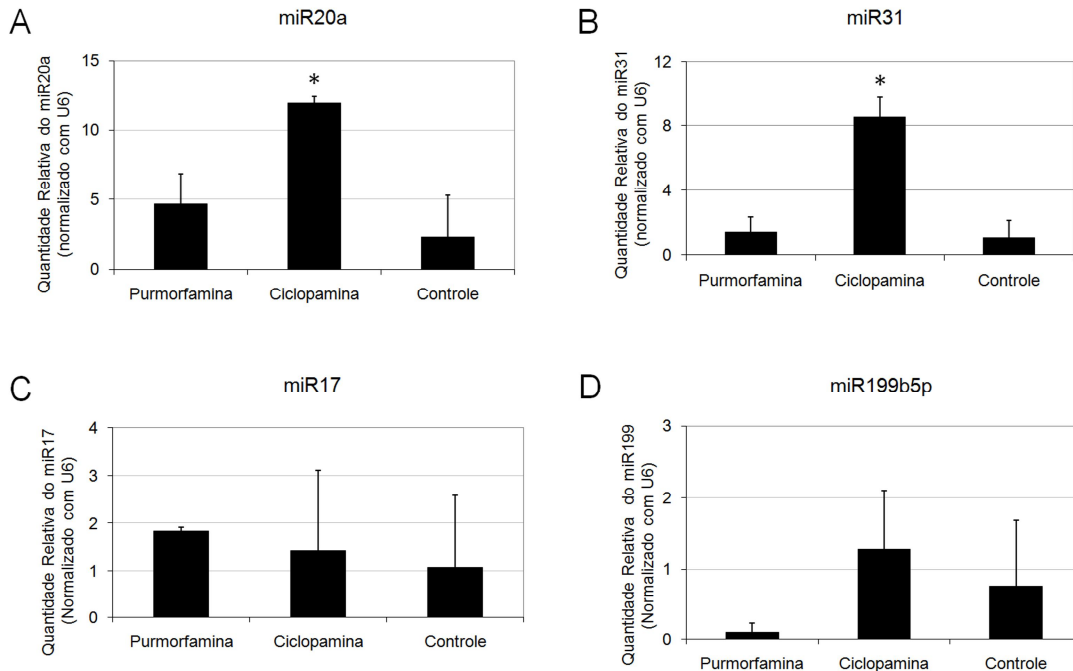


Figura 3: Expressão do miR-20a e miR-31 aumenta com o bloqueio da via Hh. Expressão relativa dos miR-20a, miR-31, miR-17 e miR-199b-5p em células-tronco tratadas com purmorfamina e ciclopamina obtidos por RT-PCR em tempo real. (A) miR-20a, (B) miR-31, (C) miR-17 e (D) miR-199b-5p. Média das triplicatas biológicas e técnicas. *Teste T student significativo >0,05.

Assim como a expressão do miR-20a, a expressão do miR-31 também aumentou significativamente após tratamento com ciclopamina comparado com o controle sem tratamento (Figura 3B). No entanto, o tratamento com purmorfamina também não afetou de maneira significativa a expressão do miR-31.

A expressão dos miR-17 e miR-199b-5p não sofreu alterações após tratamento com ciclopamina ou purmorfamina (Figura 3C-D).

MiRNAs estão envolvidos na regulação de diversos processos patológicos e fisiológicos, incluindo desenvolvimento embrionário (Lü et al. 2005), proliferação celular e apoptose (Brennecke et al. 2003) e diferenciação celular (Chen et al. 2004; Dostie et al. 2003). Devido à importância desses pequenos RNAs reguladores na manutenção da homeostasia do organismo, falhas nesse mecanismo são responsáveis pelo aparecimento de doenças como o câncer. Neste trabalho avaliamos, por RT-PCR quantitativo, a expressão de quatro miRNAs (miR-20a, miR-31, miR-199b-5p e miR-17), visando marcadores de ativação e bloqueio da via de sinalização Hedgehog (Hh). A via Hh está envolvida, entre outras

funções, na proliferação celular, dessa forma, sendo alvo direto na busca de terapias contra vários tipos de câncer.

O miR-20a já foi descrito como um importante marcador em diversos tipos de câncer como: câncer de pulmão, mama, cervical, hepático, pancreático, gástrico, linfomas, leucemia mieloide crônica, carcinoma epidermóide oral, osteosarcoma e gliomas (Chang et al. 2013; Fan et al. 2013; Hayashita et al. 2005; Huang et al. 2012; Kang et al. 2012; Li et al. 2012; Malzkorn et al. 2010; Matsubara et al. 2007; Venturini et al. 2007; Wang et al. 2013; Wang et al. 2012a; Wang et al. 2012b; Zhao et al. 2013b), porém seu comportamento como regulador positivo ou negativo do processo ainda é controverso. Fan e colaboradores, 2013, relacionaram a diminuição na expressão de miR-20a com a promoção da proliferação em câncer de fígado. Esse resultado corrobora com nossos dados, pois encontramos o miR-20a regulado de forma positiva quando a via hedgehog está inativa, ou seja, quando há menor proliferação. MiR-20a foi encontrado sendo regulado de forma negativa em câncer de mama e carcinoma pancreático (Volinia et al. 2006; Yan et al. 2010). A regulação positiva

desse miRNA foi associada a outros tipos de câncer, adenocarcinoma de cólon, gliomas, câncer de pulmão e cervical (Malzkorn et al. 2010; Matsubara et al. 2007; Schetter et al. 2008; Zhao et al. 2013a). Um único miRNA pode regular diversos alvos e um alvo pode ser regulado por vários miRNAs (Lewis et al. 2005), sendo assim, os diferentes alvos do miR-20a nas diferentes células cancerígenas sugere que sua expressão alterada pode ter efeitos diferentes nos diversos tipos de tumores, como oncogene ou como supressor de tumor.

Da mesma forma que o miR-20a, o miR-31 também já foi descrito como associado a vários tipos de câncer, bexiga, colo retal, cólon, mama, próstata, leucemia mieloide crônica (Cekaite et al. 2012; Fuse et al. 2012; Lin et al. 2013; Lu et al. 2012; Rokah et al. 2012; Sun et al. 2013; Valastyan et al. 2009; Wang et al. 2013). O papel desse miRNA foi associado a supressor de tumor (Körner et al. 2013) ou como oncogene (Sun et al. 2013). MiR-31 tem alta expressão em células-tronco derivadas de tecido adiposo (Zhang et al. 2012) e quando esse miRNA está reprimido a diferenciação osteogênica é potencializada (Deng et al. 2013a; Deng et al. 2013b). Por outro lado, a via de sinalização Hedgehog promove a osteogênese (James et al. 2010). Nossos resultados demonstram que a inibição da via eleva a expressão do miR-31 corroborando com os fatos acima descritos.

Nossos resultados não apresentaram alterações significativas na expressão do miR-199b5p e miR-17 após tratamento com ciclopamina ou purmorfamina. Recentemente, miR-1995p foi identificado como regulador de HER2 em células cancerígenas de mama (Fang et al. 2013) e o cluster miR-17-92 foi associado à proliferação e indução da apoptose (Ranji et al. 2013).

Acredita-se que a síntese anormal de miRNAs é um dos fatores mais importantes que contribuem para o desenvolvimento do câncer, pois desregulam a síntese de proteínas (Liang et al. 2013; Lin et al. 2012; Ma et al. 2012). Sabendo também que os miRNAs são diferentes nos diversos tipos de tumores, pesquisas envolvendo perfis de expressão de miRNAs contribuirão para classificação de tumores. A descoberta de biomarcadores como miRNAs poderá ser utilizado no diagnóstico clínico de doenças e câncer. Além disso, miRNAs podem servir como base

terapêutica onde miRNAs anti-tumorais poderão ser expressos ou miRNAs oncogene poderão ser inibidos afim de controlar a proliferação de um determinado câncer. Pensando em terapia celular, o estudo da expressão de miRNAs de células-tronco nos ajudam a compreender como essas células mantêm a autorrenovação e como se comprometem com determinada linhagem celular.

CONCLUSÃO

Em conclusão, as célula-tronco derivadas de tecido adiposo expressam o miR-17, miR-20a, mir-31 e miR-199b-5p. Após o bloqueio da via Hh com ciclopamina, a expressão do miR-20a e miR-31 aumentou significativamente. Esses dois miRNAs são fortes candidatos para se tornarem biomarcadores do bloqueio da via Hh

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o financiamento suportado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-PR), Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

BERMAN DM, KARHADKAR SS, HALLAHAN AR, PRITCHARD JI, EBERHART CG, WATKINS DN, CHEN JK, COOPER MK, TAIPALE J, OLSON JM, Beachy PA. **Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade.** *Science* 297: 1559-1561, 2002.

BRABIN C, APPLEFORD PJ, WOOLLARD A. **The *Caenorhabditis elegans* GATA factor ELT-1 works through the cell proliferation regulator BRO-1 and the Fusogen EFF-1 to maintain the seam stem-like fate.** *Plos Genet* 7: e1002200, 2011.

BRENNECKE J, HIPFNER DR, STARK A, RUSSELL RB, COHEN SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* v. 113, n. 1, p. 25-36, 2003.

BRENNECKE J, STARK A, RUSSELL RB, COHEN SM Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* v. 3, n. 3, p. e85, 2005.

- CAI JQ, HUANG YZ, CHEN XH, XIE HL, ZHU HM, TANG L, YANG ZM, HUANG YC, DENG L. **Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *Cell Biol Int* 36:349-355 doi: 10.1042/CBI20110284, 2012.
- CEKAITE L, RANTALA JK, BRUUN J, GURIBY M, AGESEN TH, DANIELSEN SA, LIND GE, NESBAKKEN A, KALLIONIEMI O, LOTHE RA, SKOTHEIM RI. MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. *Neoplasia* v. 14, n. 9, p. 868-879, 2012.
- CHANG CC, YANG YJ, LI YJ, CHEN ST, LIN BR, WU TS, LIN SK, KUO MY, TAN CT. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2013
- CHEN CZ, LI L, LODISH HF, BARTEL DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* v. 303, n. 5654, p. 83-86, 2004.
- CHEN CZ, LODISH HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol* v. 17, n. 2, p. 155-165, 2005.
- CHEN JK, TAIPALE J, COOPER MK, BEACHY PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* v. 16, p. 2743-2748, 2002.
- DENG Y, WU S, ZHOU H, BI X, WANG Y, HU Y, GU P, FAN X. Effects of a miR-31, Runx2, and Satb2 Regulatory Loop on the Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*, 2013a.
- DENG Y, ZHOU H, ZOU D, XIE Q, BI X, GU P, FAN X. The role of miR-31-modified adipose tissue-derived stem cells in repairing rat critical-sized calvarial defects. *Biomaterials*, 2013b.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- DOSTIE J, MOURELATOS Z, YANG M, SHARMA A, DREYFUSS G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* v. 9, n. 2, p. 180-186, 2003.
- ESAU C, KANG X, PERALTA E, HANSON E, MARCUSSON EG, RAVICHANDRAN LV, SUN Y, KOO S, PERERA RJ, JAIN R, DEAN NM, FREIER SM, BENNETT CF, LOLLO B, GRIFFEY R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* v. 279, n. 50, p. 52361-52365, 2004.
- FAGHIHI F, BAGHABAN ESLAMINEJAD M, NEKOOKAR A, NAJAR M, SALEKDEH GH. The effect of purmorphamine and sirolimus on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Pharmacother* v. 67, p. 31-38, 2013
- FAN M, LI X, JIANG W, HUANG Y, LI J, WANG Z. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells. *Exp Ther Med* v. 5, n. 4, p. 1143-1146, 2013.
- FANG C, ZHAO Y, GUO B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J Cell Biochem* v. 114, p. 1457-1463, 2013.
- FUSE M, KOJIMA S, ENOKIDA H, CHIYOMARU T, YOSHINO H, NOHATA N, KINOSHITA T, SAKAMOTO S, NAYA Y, NAKAGAWA M, ICHIKAWA T, SEKI N. Tumor suppressive microRNAs (miR-222 and miR-31) regulate molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer. *J Hum Genet* v. 57, p. 691-699, 2012.
- HAYASHITA Y, OSADA H, TATEMATSU Y, YAMADA H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, YATABE Y, KAWAHARA K, SEKIDO Y, TAKAHASHI T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Research* v. 65, n. 5, p. 9628-9632, 2005.
- HE L, HANNON GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

- HESS RA, COOKE PS, HOFMANN MC, MURPHY KM. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. **Cell Cycle** v. 5, n. 11, p. 1164-1170, 2006.
- HOOPEL JE, SCOTT MP. Communicating with Hedgehogs. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 6, p. 306-317, 2005.
- HONG IS, KANG KS The effects of Hedgehog on the RNA-binding protein Msi1 in the proliferation and apoptosis of mesenchymal stem cells. **PLoS One**. V. 8, n. 2, p. e56496, 2013.
- HUANG HY, CHENG YY, LIAO WC, TIEN YW, YANG CH, HSU SM, HUANG PH. SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer. **PLoS One** v. 7, n. 12, p. e48637, 2012.
- INGHAM PW, MCMAHON AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes Dev** v. 15, n. 23, p. 3059-3087, 2001.
- JAMES AW, LEUCHT P, LEVI B, CARRE AL, XU Y, HELMS JA, LONGAKER MT. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. **Tissue Eng Part A** v. 16, n. 8, p. 2605-2616, 2010.
- JIA J, JIANG J Decoding the Hedgehog signal in animal development. **Cell Mol Life Sci** v. 63, n. 11, p. 1249-1265, 2006.
- JONES KB, SALAH Z, DEL MARE S, GALASSO M, GAUDIO E, NUOVO GJ, LOVAT F, LEBLANC K, PALATINI J, RANDALL RL, VOLINIA S, STEIN GS, CROCE CM, LIAN JB, AQEILAN RI miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. **Cancer Res** v. 72, n. 7, p. 1865-1877, 2012.
- KANG J, LEE SY, KIM YJ, PARK JY, KWON SJ, NA MJ, LEE EJ, JEON HS, SON JW microRNA-99b acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by directly targeting fibroblast growth factor receptor 3. **Exp Ther Med** v. 3, n. 1, p. 149-153, 2012.
- KIM VN MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 6, n. 5, p. 376-385, 2005.
- KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Res** v. 39, n 1, p. D152-157, 2011.
- KÖRNER C, KEKLIKOGLOU I, BENDER C, WÖRNER A, MÜNSTERMANN E, WIEMANN S. MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKCepsilon). **J Biol Chem** v. 288, n. 17, p. 8750-8761, 2013.
- LEWIS BP, BURGE CB, BARTEL DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell** v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005.
- LI J, PING Z, NING H. MiR-218 Impairs Tumor Growth and Increases Chemo-Sensitivity to Cisplatin in Cervical Cancer. **Int J Mol Sci** v. 13, n. 12 p. 16053-16064, 2012
- LI Y, ZHANG H, LITINGTUNG Y, CHIANG C. Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 103, p. 6548-6553, 2006.
- LIANG XH, HART CE, CROOKE ST. Transfection of siRNAs can alter miRNA levels and trigger non-specific protein degradation in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta** v. 1829, n. 5, p. 455-468, 2013.
- LIN J, TEO S, LAM DH, JEYASEELAN K, WANG S. MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme. **Cell Death Dis** v. 3, n. 4, p. e398, 2012.
- LIN PC, CHIU YL, BANERJEE S, PARK K, MOSQUERA JM, GIANNOPOULOU E, ALVES P, TEWARI AK, GERSTEIN MB, BELTRAN H, MELNICK AM, ELEMENTO O, DEMICHELIS F, RUBIN MA. Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression. **Cancer Res** v. 73, n. 3, p. 1232-1244, 2013.
- LU Z, YE Y, JIAO D, QIAO J, CUI S, LIU Z. miR-155 and miR-31 are differentially expressed in breast cancer patients and are correlated with the estrogen receptor and

- progesterone receptor status. **Oncol Lett** v. 4, n. 5, p. 1027-1032, 2012.
- LÜ J, QIAN J, CHEN F, TANG X, LI C, CARDOSO WV. Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. **Biochem Biophys Res Commun** v. 334, n 2, p. 319-323, 2005.
- MA D, ZHANG YY, GUO YL, LI ZJ, GENG L. Profiling of microRNA-mRNA reveals roles of microRNAs in cervical cancer. **Chin Med J (Engl)** v. 125, n. 23, p. 4270-4276, 2012.
- MALZKORN B, WOLTER M, LIESENBERG F, GRZENDOWSKI M, STÜHLER K, MEYER HE, REIFENBERGER G. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. **Brain Pathol** v. 20, n. 3, p. 539-550, 2010.
- MATSUBARA H, TAKEUCHI T, NISHIKAWA E, YANAGISAWA K, HAYASHITA Y, EBI H, YAMADA H, SUZUKI M, NAGINO M, NIMURA Y, OSADA H, TAKAHASHI T. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. **Oncogene** v. 26, p. 6099-6105, 2007.
- PILS D, WITTINGER M, PETZ M, GUGERELL A, GREGOR W, ALFANZ A, HORVAT R, BRAICU EI, SEHOULI J, ZEILLINGER R, MIKULITS W, KRÄINER M. BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment. **Gynecol Oncol** v. 117, n. 2, p. 189-197, 2010.
- PLAISANT M, GIORGETTI-PERALDI S, GABRIELSON M, LOUBAT A, DANI C, PERALDI P. **Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells.** *PLoS One* 6:e16798 doi: 10.1371/journal.pone.0016798, 2011.
- RANJI N, SADEGHIZADEH M, SHOKRGOZAR MA, BAKHSHANDEH B, KARIMIPOUR M, AMANZADEH A, AZADMANESH K. miR-17-92 cluster: an apoptosis inducer or proliferation enhancer. **Mol Cell Biochem** v. 380, n. 1-2, p. 229-38, 2013.
- REBELATTO CK, AGUIAR AM, MORETÃO MP, SENEGAGLIA AC, HANSEN P, BARCHIKI F, OLIVEIRA J, MARTINS J, KULIGOVSKI C, MANSUR F, CHRISTOFIS A, AMARAL VF, BROFMAN PS, GOLDENBERG S, NAKAO LS, CORREA A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Exp Biol Med (Maywood)** v. 233, n. 7, p. 901-913, 2008.
- ROKAH OH, GRANOT G, OVCHARENKO A, MODAI S, PASMANIK-CHOR M, TOREN A, SHOMRON N, SHPILBERG O. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. **PLoS One** v. 7, n. 4, p. e35501, 2012.
- SCHETTER AJ, LEUNG SY, SOHN JJ, ZANETTI KA, BOWMAN ED, YANAIHARA N, YUEN ST, CHAN TL, KWONG DL, AU GK, LIU CG, CALIN GA, CROCE CM, HARRIS CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. **JAMA** v. 299, v. 4, p. 425-436, 2008.
- SUN D, YU F, MA Y, ZHAO R, CHEN X, ZHU J, ZHANG CY, CHEN J, ZHANG J. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). **J Biol Chem** v. 288, n. 13, p. 9508-9518, 2013.
- VALASTYAN S, REINHARDT F, BENAICH N, CALOGRIAS D, SZÁSZ AM, WANG ZC, BROCK JE, RICHARDSON AL, WEINBERG RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. **Cell** v. 137, n. 6, p. 1032-1046, 2009.
- VALENCIA-SANCHEZ MA, LIU J, HANNON GJ, PARKER R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Dev** v. 20, n. 5, p. 515-524, 2006.
- VENTURINI L, BATTMER K, CASTOLDI M, SCHULTHEIS B, HOCHHAUS A, MUCKENTHALER MU, GANSER A, EDER M, SCHERR M. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. **Blood** v. 109, n. 10, p 4399-4405, 2007.

- VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, AMBS S, CIMMINO A, PETROCCA F, VISIONE 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 USA** v. 103, n. 7, p. 2257-2261, 2006.
- WANG D, LIU YL, LÜ XD, LING F, LIU AJ, DU J, HAN L. Lung microRNA profile in chronic cyanotic piglets with decreased pulmonary blood flow. **Chin Med J (Engl)** v. 126, n. 12, p. 2260-2264, 2013.
- WANG Y, GUO F, PAN C, LOU Y, ZHANG P, GUO S, YIN J, DENG Z. Effects of low temperatures on proliferation-related signaling pathways in the hippocampus after traumatic brain injury. **Exp Biol Med (Maywood)** v. 237, p. 1424-1432, 2012a.
- WANG Y, SHI J, WU Y, XU W, WANG Q, ZHANG J, JIANG M, GU G. Use of Luminex xMAP bead-based suspension array for detecting microRNA in NSCLC tissues and its clinical application. **Tumori** v. 98, n. 6, p. 792-799, 2012b.
- WARZECHA J, GÖTTIG S, BRÜNING C, LINDHORST E, ARABMOTHLAGH M, KURTH A. **Sonic hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro.** *J Orthop Sci* 11:491-496 doi: 10.1007/s00776-006-1058-1, 2006.
- WU X, WALKER J, ZHANG J, DING S, SCHULTZ PG. Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. **Chem Biol** v. 11, n. 9, p. 1229-1238, 2004.
- WU X, CAI ZD, LOU LM, CHEN ZR. **The effects of inhibiting hedgehog signaling pathways by using specific antagonist cyclopamine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells.** *Int J Mol Sci* 14:5966-5977 doi: 10.3390/ijms14035966, 2013.
- YAN H, WU J, LIU W, ZUO Y, CHEN S, ZHANG S, ZENG M, HUANG W. MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells. **Hum Gene Ther** v. 21, n. 12, p. 1723-1734, 2010.
- YAUCH RL, DIJKGRAAF GJ, ALICKE B, JANUARIO T, AHN CP, HOLCOMB T, PUJARA K, STINSON J, CALLAHAN CA, TANG T, BAZAN JF, KAN Z, SESHAGIRI S, HANN CL, GOULD SE, LOW JA, RUDIN CM, DE SAUVAGE FJ. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. **Science** v. 326, n. 5952, p. 572-574, 2009.
- ZHANG JF, FU WM, HE ML, XIE WD, LV Q, WAN G, LI G, WANG H, LU G, HU X, JIANG S, LI JN, LIN MC, ZHANG YO, KUNG HF. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. **RNA Biol** v. 8, n. 5, p. 829-838, 2011.
- ZHANG ZJ, ZHANG H, KANG Y, SHENG PY, MA YC, YANG ZB, ZHANG ZQ, FU M, HE AS, LIAO WM. miRNA expression profile during osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **J Cell Biochem** v. 113, n. 3, p. 888-898, 2012.
- ZHAO S, YAO DS, CHEN JY, DING N. Aberrant Expression of miR-20a and miR-203 in Cervical Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev** v. 14, n. 4, p. 2289-2293, 2013b.
- ZHAO X, LI X, YUAN H. microRNAs in gastric cancer invasion and metastasis. **Front Biosci** v. 18, n. 1, p. 803-810, 2013b.
- ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng** v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

Recebido: 09/03/2013

Received: 03/09/2013

Aprovado: 05/09/2013

Approved: 09/05/2013.