

# Efeitos do silenciamento de RXR $\alpha$ e RXR $\beta$ para a diferenciação neuronal mediada pelo ácido retinoico em SH-SY5Y

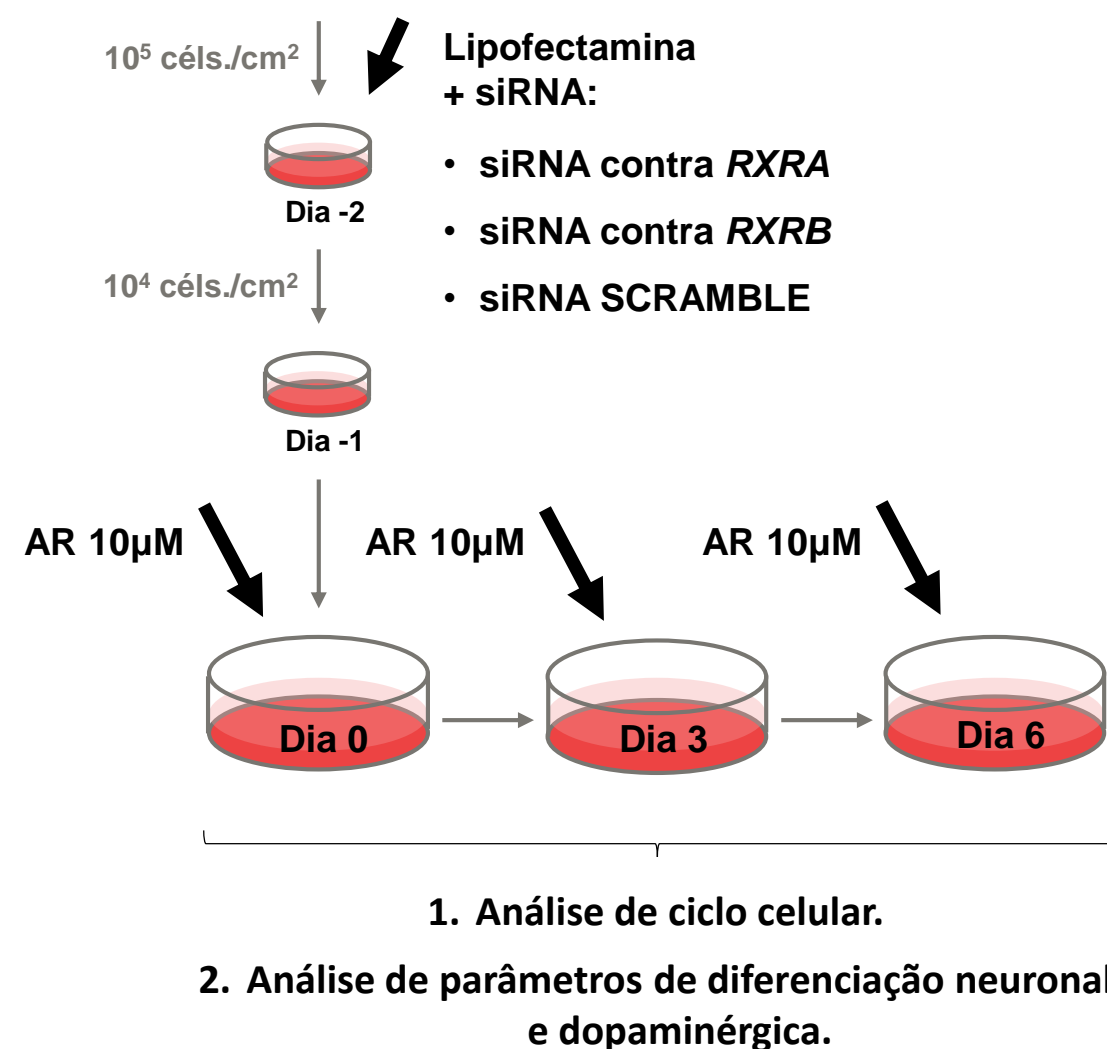
Fernanda Mota Lini; Daniel Pens Gelain

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A compreensão limitada dos mecanismos moleculares responsáveis pela diferenciação neuronal representa, atualmente, um fator limitante para o desenvolvimento de terapias celulares para o tratamento da neurodegeneração e de lesões nervosas. O ácido retinoico (AR), um dos principais metabólitos da vitamina A, é utilizado *in vitro* como fator de diferenciação e como um regulador do ciclo celular em múltiplos tipos celulares, incluindo células-tronco. Os RXRs (*Retinoid X Receptors*) são alguns dos principais mediadores do AR, atuando como parceiros de heterodimerização obrigatória dos seus receptores diretos, os RARs (*Retinoic Acid Receptors*), e regulando a expressão dos genes-alvo da molécula. Os RXRs estão presentes em diferentes isoformas, mas o papel de cada uma delas na diferenciação neuronal induzida pelo AR permanece pouco claro. **Tendo isso em mente, foi investigada a importância das isoformas RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  na diferenciação mediada pelo AR da linhagem derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a qual adota características de neurônio dopaminérgico.**

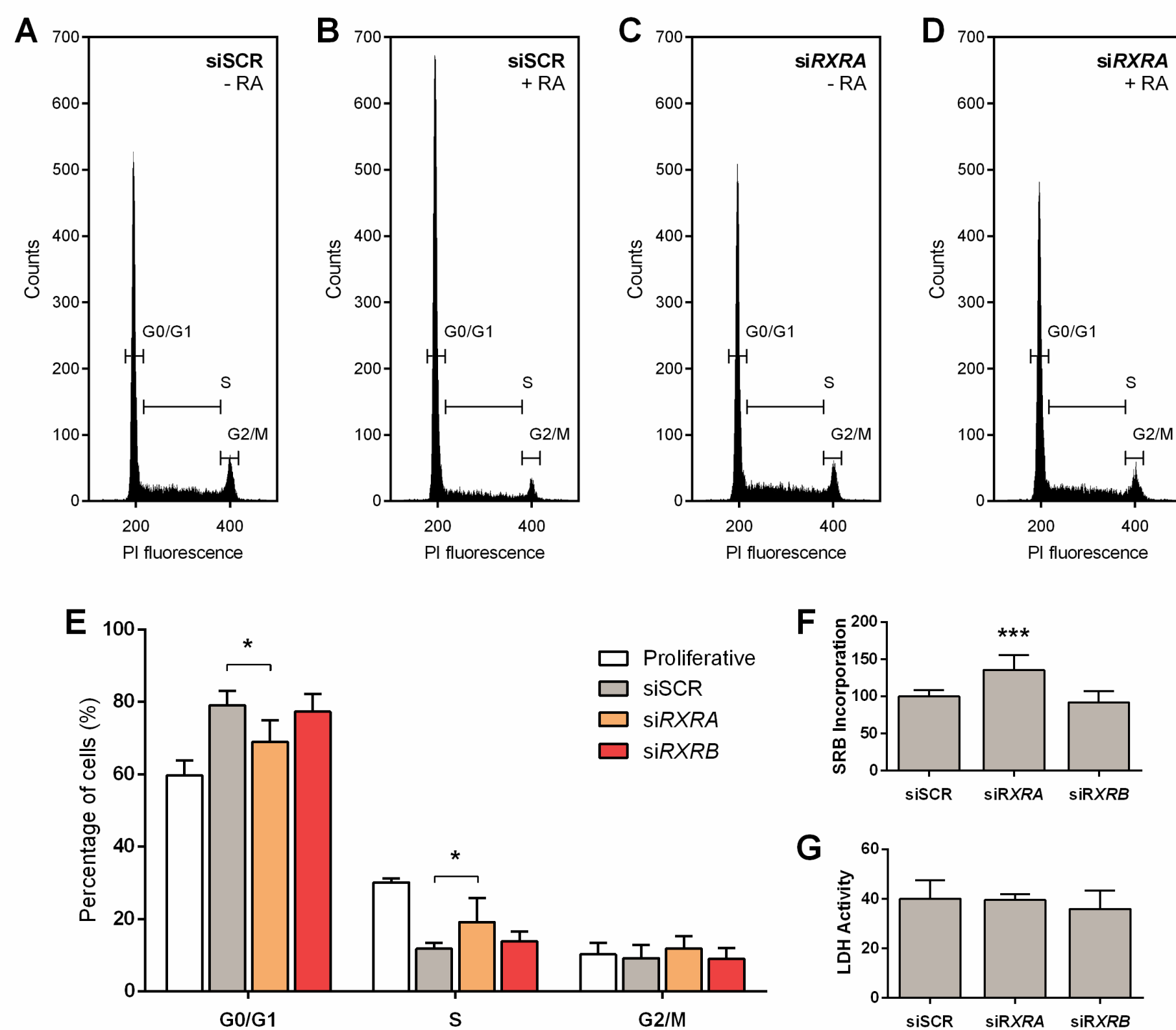
## METODOLOGIA



**Figura 1. Silenciamento isolado de RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  nos primeiros estágios da diferenciação neuronal induzida pelo AR nas células SH-SY5Y.**

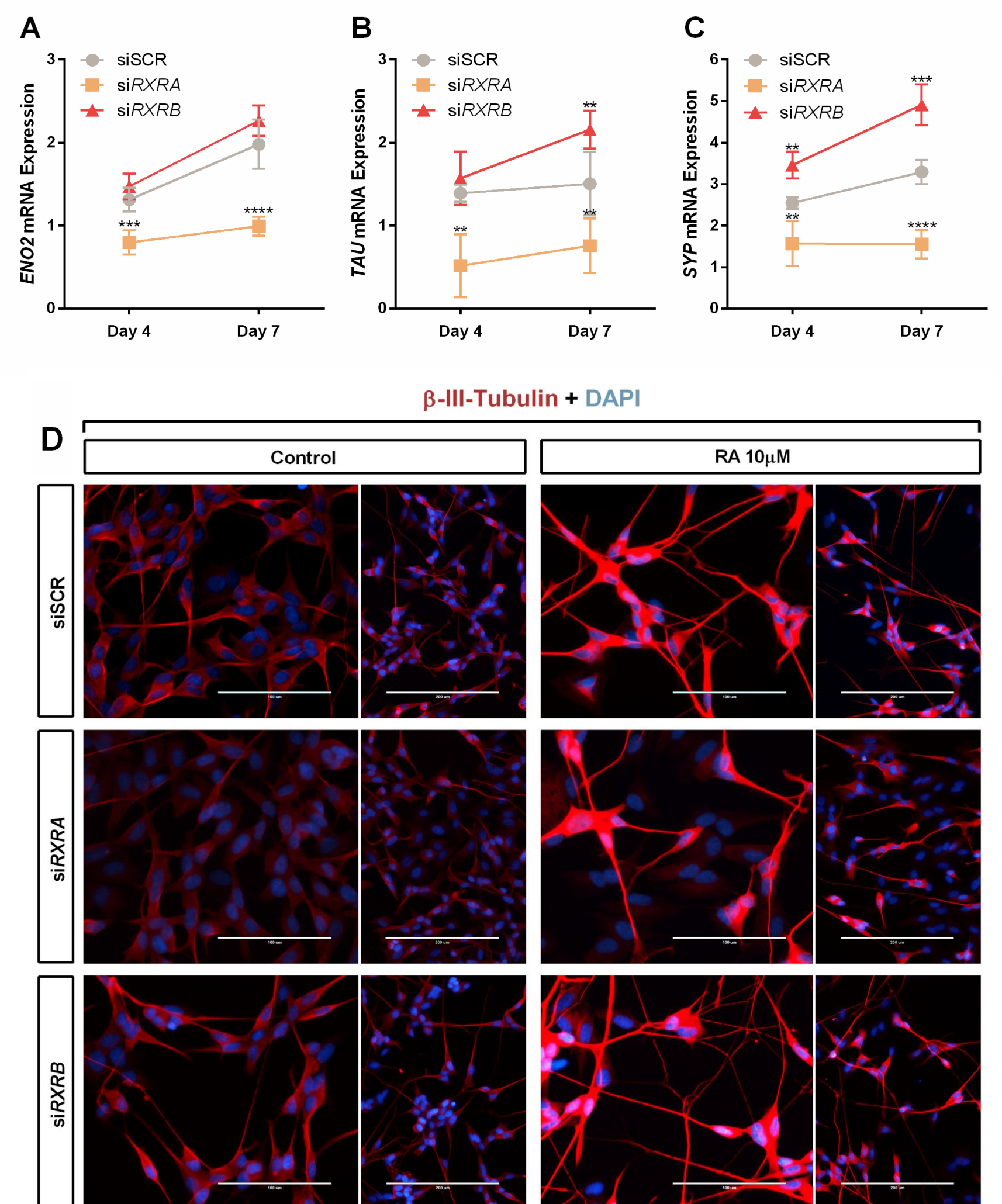
As células SH-SY5Y foram cultivadas durante 24 hrs em meio SFB 10% na presença de lipofectamina e de siRNAs específicos contra *RXRA*, *RXRB* ou com sequência *scramble* (controle negativo). Após replaqueamento em menor confluência e cultivo em meio SFB 10%, as células foram submetidas à diferenciação neuronal pela incubação com meio SFB 1% com AR 10 $\mu$ M, trocado a cada três dias. Ao longo da diferenciação, foram analisados parâmetros de ciclo celular e de indução neuronal e dopaminérgica.

## RESULTADOS



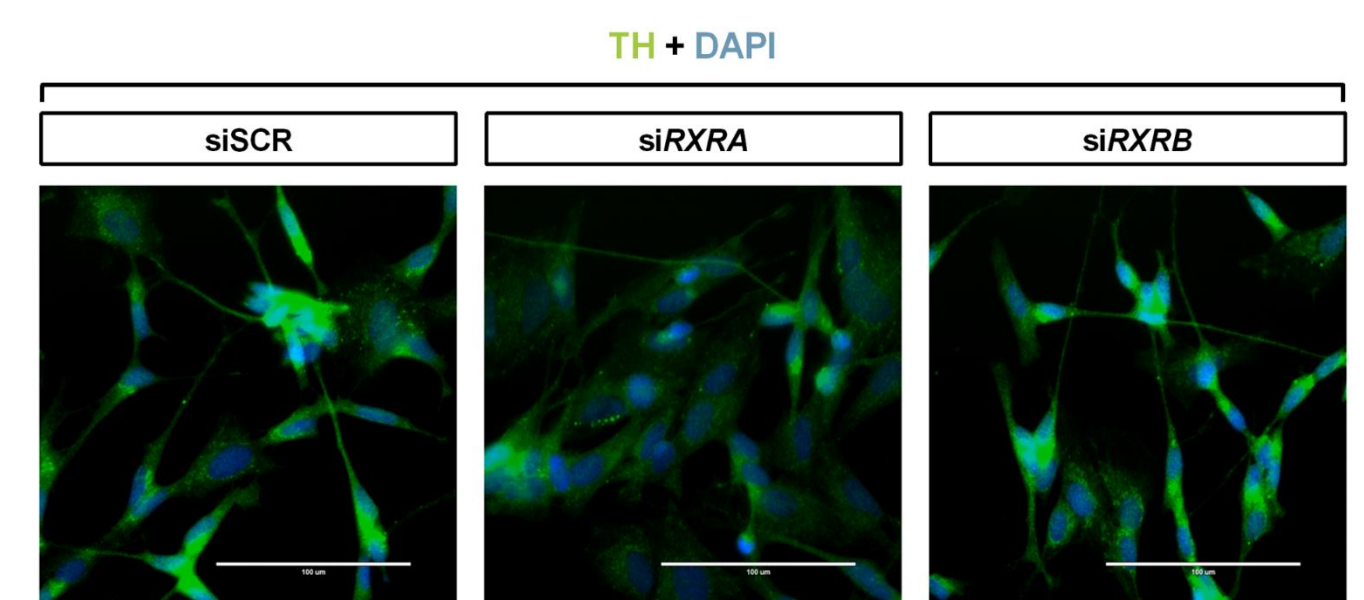
**Figura 2. O silenciamento de RXR $\alpha$  compromete a parada no ciclo celular induzida pelo AR.**

Histogramas representativos da contagem de células de acordo com o conteúdo de DNA, acessado pela intensidade de fluorescência de iodeto de propídeo na citometria de fluxo, das células transfectadas com (A e B) siSCR ou (C e D) siRXRA após quatro dias de tratamento com veículo (-RA) ou AR (+RA). (E) Porcentagem de células em G1/G0, S ou G2/M após quatro dias de diferenciação com AR. 1x10<sup>4</sup> células foram analisadas por amostra a cada experimento. (F) Incorporação de SRB nas células transfectadas e submetidas a sete dias de diferenciação com AR. (G) Atividade de LDH no sobrenadante das células transfectadas, relativa à atividade no lisado celular, após três dias de incubação com AR. Barras indicam a média  $\pm$ DP, analisadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$  relativo a siSCR.



**Figura 3. Células transfectadas com siRXRA falham na indução de parâmetros neuronais enquanto a transfecção com siRXRB intensifica alguns parâmetros.**

(A, B e C) Expressão relativa de mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) dos marcadores neuronais enolase-2, TAU e sinaptofisina, respectivamente, ao longo da diferenciação com AR nas células SH-SY5Y transfectadas. O gene *GNB2L* foi utilizado como *housekeeping* e os resultados estão relativos à expressão na células proliferativas. Símbolos indicam a média  $\pm$ DP, analisadas por ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  relativo a siSCR. (D) Microscopias de imunofluorescência representativas do imunocônteuo de  $\beta$ -III-tubulina nas células SH-SY5Y transfectadas e submetidas a sete dias de tratamento com veículo (Control) ou AR (RA 10 $\mu$ M). A  $\beta$ -III-tubulina está indicada em vermelho e os núcleos em azul, corados com DAPI. Barras representam 200 ( $\mu$ m) e 100 ( $\mu$ m).



**Figura 4. O silenciamento de RXR $\alpha$  prejudica o aumento do imunocônteuo de tirosina hidroxilase nas células SH-SY5Y.**

Microscopias de imunofluorescência representativas do imunocônteuo de tirosina hidroxilase (TH) nas células SH-SY5Y transfectadas e submetidas a sete dias de tratamento com AR. A TH está indicada em verde e os núcleos em azul, corados com DAPI. Barras representam 200  $\mu$ m.

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que RXR $\alpha$  é necessário para a transdução de sinal do AR, já que o silenciamento da isoforma nos primeiros estágios da diferenciação resultou em prejuízos para a parada no ciclo celular e para a expressão dos marcadores neuronais analisados, assim como para a expressão da enzima TH, marcadora de fenótipo dopaminérgico. Além disso, houve prejuízo na adoção de morfologia neuronal. A isoforma RXR $\beta$ , no entanto, não se mostrou necessária para os efeitos induzidos pelo AR e, curiosamente, o silenciamento específico do receptor intensificou alguns parâmetros de diferenciação: houve aumento de expressão dos genes para as proteínas neuronais TAU e sinaptofisina e indução de projeções neuríticas mesmo na ausência de AR. Os resultados obtidos evidenciam papéis não sinônimos para as isoformas de RXRs na diferenciação neuronal pelo AR e trazem novas perspectivas para o estudo desses receptores como alvos clínicos.

APOIO:



FAPERGS  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul



CNPq  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico