

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**PAPÉIS DAS ISOFORMAS DE RXR NA DIFERENCIAÇÃO
NEURONAL MEDIADA PELO ÁCIDO RETINOICO EM SH-SY5Y**

CAROLINA SAIBRO GIRARDI

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**PAPÉIS DAS ISOFORMAS DE RXR NA DIFERENCIAÇÃO
NEURONAL MEDIADA PELO ÁCIDO RETINOICO EM SH-SY5Y**

CAROLINA SAIBRO GIRARDI Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador:
Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

PORTO ALEGRE

2018

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, o Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação é resultado da linha de pesquisa que investiga os mecanismos moleculares da diferenciação neuronal pelo ácido retinoico, desenvolvida no Laboratório 32 sob comando do Professor Dr. Daniel Pens Gelain, da qual eu participo desde a Graduação em Biotecnologia na UFRGS como aluna de Iniciação Científica.

Assim, agradeço à UFRGS pela oportunidade de formação excelente ao longo desse período. Ao PPGBCM e ao Centro de Biotecnologia da Universidade, pela oportunidade que me foi dada de dar continuidade à formação em Biologia Celular e Molecular. Ao Departamento de Bioquímica da Universidade, no qual o trabalho foi desenvolvido e cuja estrutura foi fundamental para a conclusão do mesmo.

Às agências de fomento CNPq e FAPERGS, pelo financiamento de projetos de pesquisa que possibilitaram o desenvolvimento do trabalho. Ao CNPq, especialmente, pela bolsa de estudos que me foi concedida no curso de Mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pens Gelain, pela oportunidade, pela disponibilidade, pela confiança e por compartilhar comigo o interesse no tema da linha de pesquisa.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento do Mestrado, os professores Dr. José Claudio Fonseca Moreira e Dr. Diego Bonatto, pelas contribuições ao longo do curso e pela constante prestatividade. Ao revisor da dissertação, o Prof. Dr. Guido Lenz, pela disponibilidade e atenção.

Ao grupo de pesquisa no qual o trabalho foi realizado, o Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica da Universidade, que há anos me dá abrigo e autonomia para trabalhar. Aos colegas do grupo que, diretamente, participaram da elaboração dessa dissertação: à Dra. Diana, que compartilhou comigo a realização de experimentos e a redação científica, aos alunos de Iniciação Científica Camila, Pedro, Fernanda e Jeferson, pela dedicação na bancada e pela oportunidade dada

a mim de orientar outros alunos; e às Dras. Luana e Alice, pela disponibilidade em me dar orientação e auxílio na bancada.

A todos os professores e bolsistas que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação específica, seja na Graduação em Biotecnologia, na Iniciação Científica, no Estágio Curricular no Instituto de Pesquisas com Células-Tronco (IPCT) e no curso de Mestrado no PPGBCM.

E a todos os que, mesmo indiretamente, compartilharam a realização desse trabalho e o tornaram possível: à minha família, pelo exemplo, pelo suporte e pela confiança; aos colegas e amigos do Laboratório 32 e do PPGBCM, por compartilhar comigo as alegrias e as angústias da pós-graduação; aos amigos que, mesmo estranhos ao tema do Mestrado, dão suporte e incentivo para a minha dedicação a ele; e ao meu amigo e namorado Henrique, pela confiança, pelo apoio e pela esperança depositadas em mim e na carreira que eu escolhi, que servem diariamente como estímulo.

RESUMO

O desenvolvimento e a otimização de terapias visando a reposição da função neuronal dependem largamente da melhor compreensão dos mecanismos moleculares por trás da diferenciação de células neurogênicas em neurônios maduros. O ácido retinoico (AR) promove diferenciação neuronal de diversos tipos celulares por meio de reprogramação gênica e de vias de sinalização citoplasmáticas. Os receptores nucleares RXRs são mediadores moleculares fundamentais para os efeitos celulares do AR; no entanto, o papel isolado de cada uma de suas três isoformas na diferenciação neuronal permanece pouco claro. Tendo isso em mente, foi investigada a diferenciação induzida pelo AR na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A caracterização dos parâmetros induzidos pelo AR nessas células demonstrou parada no ciclo celular e adoção de características típicas de neurônios maduros. Os perfis de expressão das isoformas presentes nas células SH-SY5Y, RXR α e RXR β , mostraram-se variavelmente regulados ao longo da diferenciação neuronal, tanto a nível de transcritos quanto de proteína. Por fim, o silenciamento transitório e isolado de RXR α e RXR β durante as primeiras etapas da diferenciação com AR afetou de forma distinta os fenômenos celulares induzidos pelo composto: enquanto RXR α mostra-se fundamental para efeitos genômicos e não genômicos na diferenciação, RXR β modula negativamente a extensão de neuritos nas células SH-SY5Y. Assim, o trabalho indica a presença de funções distintas para as isoformas de RXR durante as primeiras etapas da diferenciação neuronal induzida pelo AR em neuroblastoma, e traz novas perspectivas para o estudo de RXRs como alvos moleculares nas abordagens clínicas de reposição neuronal.

ABSTRACT

Developing and optimizing therapies aiming at restoring neuronal function depend on better understanding the molecular mechanisms behind differentiation of neurogenic cells into mature neurons. Retinoic acid (RA) promotes neuronal differentiation in multiple cell types through gene reprogramming and cytosolic signaling pathways. The nuclear RXR receptors are main molecular mediators of RA cellular effects. However, little is known about specific roles of distinct RXR isoforms in neuronal differentiation. In view of this, the RA-mediated differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cell line was investigated. Analysis of RA-induced parameters in SH-SY5Y cells showed cell cycle arrest and adoption of neuronal hallmarks. The expression profiles of RXR isoforms detected in SH-SY5Y cells, RXR α e RXR β , were found varyingly modulated along neuronal differentiation both at transcript and protein levels. Finally, transitory silencing of RXR α and RXR β single isoforms during the first stages of RA-mediated differentiation distinctly affected cellular phenomena induced by RA: whereas RXR α is required for genomic and non-genomic effects during differentiation, RXR β negatively regulate neurite extension in SH-SY5Y cells. Results thus indicate distinct functions for RXR isoforms during the first stages of RA-dependent neuronal differentiation of neuroblastoma, and reveal new perspectives for studying RXRs as molecular targets in neuronal replacement therapies.

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Ácido <i>todo</i> trans Retinoico
ASB	Albumina de Soro Bovino
B2M	<i>Beta-2-Microglobulin</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
CRABPII	<i>Cellular RA-Binding Protein II</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	4',6-Diamino-2-Fenilindol
DBD	<i>DNA-Binding Domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
ENO2	Enolase 2
ER	Espécie Reativa
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
F12	<i>Nutrient Mixture F12</i>
FABP5	<i>Fatty Acid-Binding Protein 5</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>

FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GDNF	<i>Glial-Derived Neurotrophic Factor</i>
GNB2L	<i>Receptor Of Activated Protein Kinase C</i>
hCT	Célula-Tronco humana
IP	Iodeto de Propídeo
LBD	<i>Ligand-Binding Domain</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
mCT	Célula-Tronco murina
NeuN	Neuronal specific nuclear protein
NF-L	Neurofilament-L
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NTD	<i>N-Terminal Domain</i>
Nurr1	Nuclear Receptor Related 1
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
RARE	<i>Retinoic Acid Responsive Element</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SDVA	Síndrome da Deficiência de Vitamina A
SFB	Soro Fetal Bovino
siRXRA	siRNA contra <i>RXRA</i>
siRXRB	siRNA contra <i>RXRB</i>
siSCR	siRNA <i>scramble</i>
SYP	Sinaptofisina
TBS	Tampão Tris-Salino
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TH	Tirosina Hidroxilase
TR	<i>Thyroid Hormone Receptor</i>
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Diferenciação Neuronal.....	13
1.2	Vitamina A e Ácido Retinoico.....	14
1.3	Mecanismos Moleculares do Ácido Retinoico.....	17
1.4	Receptores de Retinoides.....	21
1.5	RXRs.....	22
1.6	Objetivos.....	24
2	RESULTADOS.....	25
2.1	CAPÍTULO 1: Caracterização dos Efeitos Celulares Induzidos pela Diferenciação Neuronal Mediada pelo Ácido Retinoico nas Células SH-SY5Y.....	25
2.2	CAPÍTULO 2: <i>Nuclear RXRα and RXRβ receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation.....</i>	33
3	CONCLUSÃO E DISCUSSÃO.....	66

3.1	Diferenciação da Linhagem de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y como Modelo de Estudo das Vias de Sinalização do Ácido Retinoico.....	67
3.2	Modulação dos Níveis dos Receptores de Retinoides pelo Ácido Retinoico na Diferenciação Neuronal.....	70
3.3	Efeito do Silenciamento Isolado das Isoformas de RXRs para a Diferenciação Neuronal Mediada pelo Ácido Retinoico.....	75
3.4	Implicação de Funções Diferenciais dos RXRs para Abordagens Clínicas Visando a Recuperação da Função Neuronal.....	83
3.5	Perspectivas.....	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO: <i>Curriculum Vitae</i>	100

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno do envelhecimento populacional já encontra-se fortemente associado a países altamente industrializados e tem se tornado uma característica marcante também em países em desenvolvimento como o Brasil (Shetty, 2012). Segundo levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a primeira década do século XXI no país foi marcada pelo aumento da população com mais de 60 anos; se em 2001 ela representava 9%, em 2011 ela passou a representar mais de 12% da população brasileira. Em números totais, a população com mais de 60 anos no Brasil passou de 15,5 milhões para 23,5 milhões de pessoas no mesmo período de 10 anos, o que representa um impacto significativo nas políticas públicas voltadas para essa faixa etária da população.

Um dos impactos mais significativos do envelhecimento populacional é em relação aos sistemas de saúde, já que o envelhecimento traz consigo o aumento de uma série de doenças crônicas associadas ao processo, como problemas cardiovasculares, diabetes mellitus, câncer e desordens neurológicas (Jaul e Barron, 2017). O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas na população idosa tem impacto especialmente grave na qualidade de vida dos pacientes; por estarem relacionadas à perda neuronal, elas podem acarretar em prejuízo das funções tanto motora quanto cognitiva. Entre as doenças neurodegenerativas mais prevalentes estão a doença de Alzheimer (DA), caracterizada por placas amiloides extracelulares e por agregados intracelulares da proteína tau hiperfosforilada que levam ao declínio cognitivo principalmente relacionado à memória (Reitz e Mayeux, 2014), e a doença de Parkinson (DP), caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos que acarreta em desordens motoras e cognitivas (Lee e Gilbert, 2016).

O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas torna relevantes os estudos que visam a reposição da função neuronal, como o transplante celular e como a indução da diferenciação de célula-tronco (CTs) neurais endógenas. No entanto, tanto estudos em modelos animais quanto estudos clínicos têm indicado eficácia variável dessas abordagens (Barker *et al.*, 2015; Kimbrel e Lanza, 2015), sendo necessária a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos

na diferenciação neuronal. Assim, a diferenciação *in vitro* de linhagens neurogênicas tem sido amplamente utilizada com esse fim (Agholme *et al.*, 2010; Studer, 2012).

1.1 Diferenciação Neuronal

A transformação de células com capacidade de autorrenovação em neurônios maduros e funcionais envolve a alteração no balanço entre proliferação e diferenciação celular. Assim, a diferenciação neuronal de linhagens neurogênicas vem acompanhada da diminuição da capacidade proliferativa dessas células (revisado por Janesick *et al.*, 2015). São observadas alterações no ciclo celular com a diminuição da população na fase S (Kunzler *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017), redução no crescimento celular (Cosgaya *et al.*, 1996; Teppola *et al.*, 2015) e a diminuição da expressão de genes envolvidos com autorrenovação celular (Sperling *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Além disso, a expressão de uma série de genes específicos de neurônios é modulada ao longo do processo de diferenciação (revisado por Brady *et al.*, 2011), o que possibilita a utilização dos mesmos como marcadores moleculares do fenótipo neuronal. Células neurogênicas expressam, em etapas iniciais de diferenciação, marcadores de progenitores neurais como a proteína nestina – um filamento intermediário característico de neurônios imaturos que, com o avanço da diferenciação, deixa de ser expresso. Ao longo do processo, as células passam então a expressar genes característicos de neurônios maduros. Proteínas como a enolase 2, isoforma da enzima da glicólise específica de neurônios, e a NeuN, proteína nuclear característica de neurônios pós-mitóticos, são marcadores clássicos da adoção de um programa de expressão gênica característico de neurônios. Proteínas estruturais como a β 3-tubulina, componente de microtúbulos expressa exclusivamente em neurônios, e o neurofilamento-L (NF-L), filamento intermediário também exclusivo de neurônios, também costumam ter sua expressão aumentada na diferenciação e são frequentemente utilizadas como marcadores. Além disso, proteínas que encontram-se associadas aos microtúbulos especificamente de neurônios também podem ser utilizadas como marcadores: a MAP2 associa-se preferencialmente no citoesqueleto dos dendritos a proteína tau

dos axônios. Essas proteínas regulam a função neurítica por atuarem na estabilização e na plasticidade da arquitetura do citoesqueleto nessas regiões, assim como na mediação da interação dos microtúbulos com outros fatores celulares. Além disso, a presença de atividade sináptica também pode ser avaliada pela detecção de marcadores como a sinaptofisina, uma glicoproteína associada a vesículas sinápticas.

Dessa forma, a diferenciação neuronal pode ser avaliada por meio de uma série de parâmetros relacionados com a capacidade proliferativa celular e com a adoção de programas de expressão gênica característicos de neurônios. Somado a isso, fatores como a adoção de fenótipos neuronais específicos (Wallén-Mackenzie *et al.*, 2003; Filograna *et al.*, 2015), síntese e metabolização de neurotransmissores (Korecka *et al.*, 2013), alterações metabólicas (Pasquali *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016), presença de potenciais de ação (Prè *et al.*, 2014) ou mesmo alterações morfológicas com o aumento do comprimento e das ramificações neuríticas (Teppola *et al.*, 2015) também contribuem para a análise da diferenciação neuronal.

Visando a indução *in vitro* de diferenciação neuronal a partir de diferentes tipos celulares com capacidade neurogênica, são utilizados fatores capazes de induzir tais parâmetros característicos de neurônios adultos. Entre esses fatores estão retinoides como o ácido *trans* retinoico (AR) e neurotrofinas como o NGF, o GDNF e o BDNF (Maden, 2007; Agholme *et al.*, 2010).

1.2 Vitamina A e Ácido Retinoico

A vitamina A (retinol) e seus metabólitos denominados coletivamente como retinoides são compostos essenciais tanto para o desenvolvimento quanto para a homeostase tecidual na vida adulta. Esse papel fundamental do retinol para a sobrevivência é constatado principalmente a partir de observações, feitas ainda na primeira metade do século XX, das consequências da privação da ingestão do composto durante o desenvolvimento de mamíferos. A síndrome da deficiência de vitamina A (SDVA) é caracterizada por anormalidades no desenvolvimento de diversos tecidos; em relação ao sistema nervoso, ela acarreta degeneração na espinha dorsal e nos nervos óptico, femoral e ciático (Hughes *et al.*, 1929).

Os efeitos do retinol na neurogênese se devem essencialmente ao AR (revisado por Maden, 2007). Ele é a forma ácido carboxílico da molécula de retinol, obtida a partir da metabolização da molécula primeiramente em retinaldeído e, em seguida, em AR (Blomhoff e Blomhoff, 2006). O papel da molécula na diferenciação *in vivo* mostra-se fundamental principalmente em dois aspectos: na neurogênese e na determinação das linhagens no eixo anteroposterior do sistema nervoso. Durante a neurogênese primária, o AR promove a diferenciação de progenitoras neurais em neurônios primários (revisado por Janesick *et al.*, 2015). A depleção de AR em ratos adultos diminui a diferenciação neuronal no hipocampo ao mesmo tempo em que a sobrevivência das progenitoras neurais presentes na região neurogênica do giro denteado é diminuída, mas sem efeitos para a proliferação das mesmas (Jacobs *et al.*, 2006). Na zona subventricular, a região neurogênica fundamental na corticogênese, o AR secretado a partir das meninges mostra-se necessário para a manutenção tanto da produção de progenitoras neurais quanto da diferenciação de neurônios maduros (Siegenthaler *et al.*, 2009). Além disso, o gradiente de concentração de AR determina o destino celular dos neurônios durante o desenvolvimento do eixo anteroposterior do sistema nervoso; sua presença é fundamental para a diferenciação das linhagens do encéfalo posterior e da espinha dorsal (Wilson *et al.*, 2004; Irioka *et al.*, 2005), o que explica as características fenotípicas observadas na SDVA em relação ao sistema nervoso.

Além do seu papel como morfógeno, o AR tem sido também amplamente utilizado *in vitro* em função da sua capacidade em regular a diferenciação, a proliferação e a morte celular de acordo com o contexto celular (revisado por Maden, 2007; Noy, 2010). Essas propriedades tornam o AR um agente farmacológico interessante sob diferentes aspectos; no entanto, ainda é necessária maior compreensão a respeito da maneira com que ele modula esses diferentes eventos celulares.

Em concentrações entre 1 e 10 μM , o AR promove a diferenciação neuronal de linhagens de carcinoma embrionário, como F9 (Strickland e Mahdavi, 1970), P19 (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982) e NT2 (Coyle *et al.*, 2011). Células tronco humanas (hCTs) e murinas (mCTs) também são direcionadas à diferenciação neuronal quando tratadas com AR, adotando diferentes fenótipos de acordo com o

cotratamento com outros morfógenos como BDNF, FGF e TGF α (revisado por Maden, 2007). Assim, a diferenciação neuronal de CTs embrionárias por meio do AR (também em cerca de 1 a 10 μ M) tem sido utilizada em estratégias que visam a reposição da função neuronal (Sperling *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Além disso, diversas células neuronais derivadas de linhagens tumorais também mostram-se sensíveis ao AR. Nas células PC12, derivadas de feocromocitoma, o AR promove diminuição na proliferação mas não é suficiente em induzir parâmetros neuronais (Cosgaya *et al.*, 1996). Em linhagens derivadas de neuroblastoma, como as células humanas SH-SY5Y, o AR 10 μ M induz diferenciação neuronal com parada no ciclo celular e adoção de parâmetros neuronais característicos de neurônios adultos (Korecka *et al.*, 2013; Teppola *et al.*, 2015; Kunzler *et al.*, 2016) além de promover adaptação metabólica (Xuna *et al.*, 2012; Pasquali *et al.*, 2014); em concentrações crescentes, no entanto, o AR torna-se citotóxico e promove morte celular de forma significativa (Ramos *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento com AR é capaz de induzir apoptose em linhagens não neuronais como gliomas (Liang *et al.*, 2015) e como células de carcinoma mamário (Donato e Noy, 2005).

Essa capacidade do AR em regular proliferação e morte celular em células tumorais mostra-se efetiva também na clínica (revisado por Clarke *et al.*, 2004). O AR, em conjunto com quimioterapia, mostra-se eficiente no tratamento de leucemia promielocítica aguda, e tanto o AR quanto outros retinoides têm sido estudados como agentes preventivos ou terapêuticos para diversos outros tipos de tumores. No entanto, o desenvolvimento de linhagens tumorais resistentes ao AR mostra-se frequente; em neuroblastoma, o sucesso do tratamento com AR mostra-se limitado (Reynolds *et al.*, 2003; Peinemann *et al.*, 2017).

Assim, o AR é capaz de regular uma variedade de fenômenos celulares em modelos neurais, mas a forma com que ele modula a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência celular varia bastante de acordo com o contexto celular. Visando a melhor compreensão desses fenômenos, estudos desenvolvidos a partir da diferenciação desses diversos tipos celulares neurogênicos permitiram a descrição de mecanismos moleculares por trás dos efeitos celulares do AR. No entanto,

grande parte desses mecanismos é ainda largamente desconhecida, o que representa um desafio para a otimização de protocolos baseados em AR que visam a sua aplicação clínica.

1.3 Mecanismos Moleculares do Ácido Retinoico

O AR é um composto lipossolúvel que pode ser proveniente tanto de metabolização intracelular a partir do retinol quanto do ambiente extracelular (revisado por Blomhoff e Blomhoff, 2006). Por suas características químicas, ele atravessa membranas celulares com facilidade mas tem dificuldade em difundir-se no ambiente aquoso do citoplasma. Assim, proteínas acessórias da família das proteínas intracelulares de interação a lipídeos auxiliam no transporte de AR; associado à proteína CRABP II, o composto é direcionado até os seus mediadores clássicos, os receptores de retinoides RAR e RXR (como esquematizado na **Figura 1**).

O AR atua como ligante direto dos RARs, da família dos receptores nucleares. Os RARs encontram-se preferencialmente no núcleo e na forma de heterodímeros com os RXRs, também da família dos receptores nucleares (revisado por Chambon, 1996; Samarut e Rochette-Egly, 2012). Os heterodímeros RAR/RXR são considerados as unidades essenciais de transdução do AR (Roy *et al.*, 1995; Chiba, H *et al.*, 1997; Chatagnon *et al.*, 2015), atuando diretamente como fatores transcricionais pela interação com elementos responsivos ao AR (RAREs) no DNA. Classicamente, RAR/RXR promove a inibição da transcrição de genes-alvo na ausência de AR pela interação com correpressores. Na presença de AR, por sua vez, modificações conformacionais no heterodímero fazem com que a interação com correpressores seja alternada para ligação a coativadores, e o complexo contendo RAR/RXR promove a ativação da transcrição de genes-alvo. Além disso, na ausência de AR, os RAREs encontram-se também comumente associados a complexos que contêm RXRs, mas não RARs (Chatagnon *et al.*, 2015). Diante da presença de AR, a composição desses complexos é alterada e passa a conter RAR/RXR por meio de mecanismos ainda pouco compreendidos, e a transcrição gênica é ativada. Essas dinâmicas envolvem também modificações em histonas e podem regular tanto genes proximais, quando as regiões

responsivas encontram-se no promotor mínimo, quanto genes distais e, nesse caso, os RAREs atuam como *enhancers*.

Entre os genes-alvo regulados pelo AR, com a expressão sob o controle de RAREs, estão genes relacionados com a modulação de diferenciação, de proliferação e de morte celular (Balmer e Blomhoff, 2002). De acordo com a dose e o contexto celular, a modulação transcricional desses alvos promove os efeitos observados com a indução com AR. Grande parte desses genes são fatores de transcrição, como os genes de Hox e de Myc (Balmer e Blomhoff, 2002), que atuam sobre a expressão de genes diversos. Assim, boa parte dos efeitos do AR são indiretos.

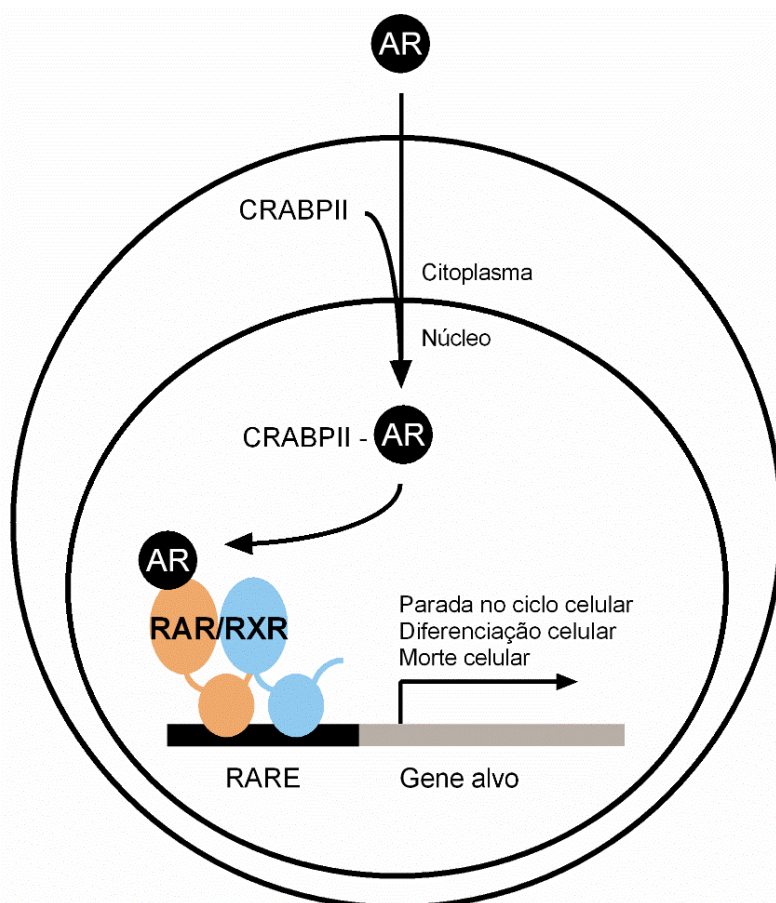


Figura 1 - Representação esquemática da via clássica de ação do AR. Capaz de atravessar membranas celulares, o composto interage com CRABP II que direciona-o para seus receptores RARs no núcleo. Na forma de heterodímeros com RXRs, eles modulam a expressão de genes sob o controle de RAREs, envolvidos com a regulação do ciclo, da diferenciação e da morte celulares.

Fonte: da autora.

Em função da possibilidade dos RAREs em atuar como *enhancers*, a totalidade de genes que pode ser regulada pelos heterodímeros RAR/RXR não pôde ainda ser completamente esclarecida. Somado a isso, a descoberta de que não apenas os heterodímeros de RAR/RXR podem ser ativados pela interação com AR adicionou complexidade na busca pela compreensão da reprogramação gênica induzida pelo composto. A isoforma PPAR β/δ , também da família dos receptores nucleares, mostra-se capaz de ser ativada pelo AR e promover respostas transcricionais diante dessa ativação (revisado em Noy, 2010). Em certos tipos celulares e sob determinadas condições, o AR associa-se a outra proteína intracelular de interação a lipídeos, a FABP5. Classicamente, essa proteína interage com uma variedade de ácidos graxos e os direciona para os PPARs, de maneira similar com a cooperação entre CRABP II e os RARs. Quando essa proteína interage com o AR, no entanto, ela direciona o composto especificamente para a isoforma PPAR β/δ que, na forma de heterodímeros também com RXRs, regula a expressão de genes-alvo diferentes daqueles regulados por intermédio da via clássica, relacionados à adaptação metabólica, à sobrevivência celular e à proliferação. Essas respostas, por sua vez, mostram-se importantes para a diferenciação neuronal; a ativação de PPAR β/δ pelo AR é fundamental para a diferenciação de progenitoras neurais em neurônios maduros (Yu *et al.*, 2012). No entanto, essas respostas também podem ajudar a explicar o surgimento de mecanismos de resistência de linhagens tumorais ao AR. Acredita-se que o que define o direcionamento de AR para CRABP II ou para FABP5 seja a expressão relativa das duas proteínas e a concentração de AR, já que na faixa subnanomolar o composto é capaz de interagir apenas com CRABP II.

Somado aos efeitos relacionados à reprogramação gênica, o AR e outros retinoides mostram-se capazes de induzir efeitos rápidos, independentes de transcrição e extranucleares. Esses efeitos compõem as denominadas vias não genômicas do AR, mas ainda são pouco compreendidos os mecanismos pelos quais a molécula dá origem a tais fenômenos.

Entre as vias não genômicas está a ativação de cascatas de cinases. Em células neuronais, o tratamento com concentrações variáveis de AR promove a rápida fosforilação de ERK1/2 (Cañón *et al.*, 2004; Masiá *et al.*, 2007; Qiao *et al.*,

2012 ; Ramos *et al.*, 2015) e a sua ativação mostra-se dependente da ativação de Akt (Pan *et al.*, 2005), de PKC (Miloso *et al.*, 2004) e de Src (Dey *et al.*, 2007), as quais são também induzidas por AR. A ativação dessas vias de sinalização mostra-se importante para a extensão de processos neuríticos e para a sobrevivência celular durante a diferenciação neuronal.

Entre os mecanismos não genômicos envolvidos com a sinalização dos retinoides está também a produção de espécies reativas (ERs). O tratamento com retinol (Gelain *et al.*, 2006; Gelain *et al.*, 2008; Gelain *et al.*, 2012) e com AR (Pasquali *et al.*, 2008; Zanotto-Filho *et al.*, 2008; Kunzler *et al.*, 2016) promove a geração de um ambiente celular pró-oxidante, o qual mostra-se fundamental para os efeitos induzidos pela diferenciação com os compostos. Em neuroblastoma, a ativação de ERK e de Akt é dependente da produção de ERs (Kunzler *et al.*, 2016), o que indica que as vias de sinalização não genômicas encontram-se interligadas durante a diferenciação neuronal.

O conhecimento acerca da existência de fenômenos não genômicos induzidos pelo AR resultou, também, na observação de que as vias citoplasmáticas podem influenciar as respostas transcricionais ao AR, mediadas pelos receptores de retinoides (revisado por Bastien e Rochette-Egly, 2004; Bour *et al.*, 2007; Piskunov *et al.*, 2014). A fosforilação de cinases em cascata no citoplasma mostra-se capaz de induzir fosforilação em RARs, em RXRs e em seus cofatores (Gianni *et al.*, 2002; Bruck *et al.*, 2005; Srinivas *et al.*, 2005; Gianni *et al.*, 2006; Macoritto *et al.*, 2008), e essas fosforilações são capazes de regular a atividade dos heterodímeros RAR/RXR (Solomon *et al.*, 1999; Narayanan *et al.*, 2004; Bour *et al.*, 2005; Bruck *et al.*, 2005; Macoritto *et al.*, 2008; Chebaro *et al.*, 2013; Tanoury *et al.*, 2014). Essas modificações pós traducionais costumam afetar não só a atividade, mas a presença dos receptores de retinoides. Fosforilações em RARs e em cofatores relacionam-se à indução de ubiquitinação e degradação proteossomal dos heterodímeros RAR/RXR (Gianni *et al.*, 2002; Gianni *et al.*, 2003; Gianni *et al.*, 2006), que por sua vez parece importante para os fenômenos induzidos pelo AR mas cuja função ainda é pouco compreendida.

Ao mesmo tempo, os RARs mostram-se capazes de intermediar a ativação de cascatas de cinases, fenômeno relacionado com a presença de frações citoplasmáticas desses receptores (Bastien e Rochette-Egly, 2004; Piskunov *et al.*, 2014). Em neuroblastoma, RAR ativado é capaz de promover a ativação da via PI3K/Akt por associação direta a subunidades de PI3K (Masiá *et al.*, 2007) e RAR interage com Src no citoplasma e promove a sua fosforilação de forma dependente de AR (Dey *et al.*, 2007).

Apesar dessas observações, o conhecimento a respeito de como as vias dependentes de fenômenos citoplasmáticos afetam os eventos transcricionais clássicos no núcleo e vice-versa é bastante restrito. No entanto, essas descobertas dão indícios de que os receptores de retinoides encontram-se no centro da conexão entre as vias genômicas e não genômicas do AR.

1.4 Receptores de Retinoides

Os receptores de retinoides fazem parte da família dos receptores nucleares, que tem como componentes proteínas que atuam como moduladores transcricionais quando ativadas por pequenas moléculas lipofílicas (revisado por Escrive *et al.*, 2004; Evans e Mangelsdorf, 2014). Entre essas moléculas estão os hormônios esteroides, os hormônios da tireoide, a vitamina D, os ácidos graxos além dos próprios retinoides. Alguns desses receptores, no entanto, não têm ligantes identificados; a eles é feita a denominação de receptores órfãos. Imagine-se que, ao longo da sua evolução, os receptores órfãos tenham perdido funções como receptores em si; no entanto, não se exclui a possibilidade de que ligantes endógenos para os mesmos existam mas sejam ainda desconhecidos.

As proteínas da família dos receptores nucleares estão presentes nos animais e têm estruturas bastante conservadas entre si (como representado na **Figura 2**): um domínio aminoterminal (NTD), um domínio de interação com o DNA (DBD) e um domínio de interação com ligantes (LBD) carboxiterminal (Escrive *et al.*, 2004). O LBD contém, além da região de interação o ligante lipofílico, as regiões de dimerização e de interação com corretores. O DBD é conectado ao LBD por uma alça flexível e determina a interação com regiões responsivas no DNA. O

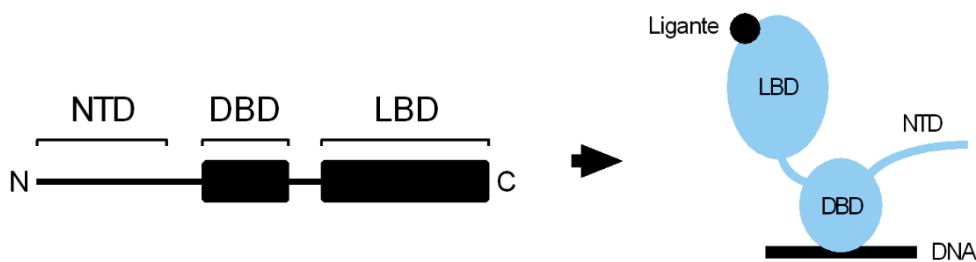


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura dos receptores nucleares. Na região N-terminal, o NTD tem estrutura intrinsecamente desorganizada. O DBD é o domínio de interação com o DNA e o LBD, na região C-terminal, é o domínio de interação com o ligante.

Fonte: da autora.

NTD é o domínio mais variável, com estrutura intrinsecamente desorganizada, que está envolvido com a atividade transcricional basal independente de ligantes.

Durante a evolução dos vertebrados, os genes dos receptores nucleares sofreram duplicações que deram origem a genes homólogos (Escriva *et al.*, 2004). Em mamíferos, tanto os RXRs quanto os RARs são expressos a partir de três genes distintos, que dão origem às isoformas RXR α , RXR β , RXR γ e RAR α , RAR β e RAR γ . Entretanto, além da geração de diferentes subtipos de RAR e de RXR a partir da transcrição de genes distintos, existem ainda isoformas distintas para cada gene, resultantes de uso alternativo de sítios de início de transcrição. Esse uso alternativo promove isoformas que diferem no NTD.

1.5 RXRs

Os RXRs foram inicialmente descritos como receptores nucleares órfãos capazes de formar dímeros com uma série de outros receptores nucleares, incluindo os RARs (revisado por Evans e Mangelsdorf, 2014). Ainda na década de 90, no entanto, descobriu-se que o estereoisômero natural de AR, o 9-*cis*-AR, era capaz de interagir com RXRs (Levin *et al.*, 1992) e, mais tarde, observou-se que o composto atua como um ligante tanto de RAR quanto de RXR. Assim, os RXRs deixaram de ser classificados como receptores órfãos, apesar de ainda restarem dúvidas a respeito da ocorrência de 9-*cis*-AR como ligante endógeno de RXR (Wolf, 2006). Nos últimos anos, no entanto, foram descobertos diversos outros ligantes naturais de RXRs, em geral ácidos graxos como o ácido docosahexaenóico (Goldstein *et al.*, 2003), mas o papel dos RXRs como receptores de ligantes

endógenos permanece, ainda, um tema controverso. De qualquer forma, diversos retinoides sintéticos têm sido desenvolvidos como ligantes de RXR (Pérez *et al.*, 2012).

Os RXRs podem atuar na forma de homodímeros e de heterodímeros com outros receptores e modular a expressão gênica a partir de diferentes regiões responsivas (revisado por Germain *et al.*, 2006b; Evans e Mangelsdorf, 2014). Os homodímeros são ativados pela presença de ligantes de RXR, mas os heterodímeros podem responder de duas formas distintas à presença de ligantes. Os heterodímeros permissivos são ativados pela presença tanto de ligantes de RXR quanto de ligantes do seu parceiro de heterodimerização; são exemplos destes os dímeros com PPAR, LXR e FXR. No entanto, heterodímeros não permissivos têm a sua ativação dependente da presença de ligantes do parceiro de RXR; são exemplos desse caso os dímeros com TR, VDR e os próprios RARs, todos responsivos a hormônios. Assim, a ativação dos heterodímeros RAR/RXR encontra-se necessariamente condicionada à presença de AR e, por esse motivo, os RXRs são considerados receptores silenciosos nas vias clássicas de sinalização do AR. Entretanto, ligantes de RXRs podem ativar os heterodímeros de PPAR β/δ /RXRs.

Por serem parceiros de heterodimerização de diversos receptores nucleares, os RXRs têm papel central nas respostas não só ao AR, mas a uma série de outros compostos (revisado por Desvergne, 2007; Evans e Mangelsdorf, 2014). Os RXRs são fundamentais para a regulação da taxa metabólica basal em resposta aos hormônios da tireoide, para a homeostase de Ca⁺² e PO₄⁻³ em resposta à vitamina D, para a homeostase de lipídeos e de colesterol e para a resposta a xenobióticos, por exemplo.

Assim, sabe-se que os RXRs se envolvem em uma diversidade de processos no organismo por meio de mecanismos moleculares distintos, mas ainda existem questionamentos a respeito das funções celulares que os RXRs desempenham. Esses questionamentos consistem basicamente em: de que forma os RXRs atuam como receptores efetivos de retinoides endógenos ou apenas como parceiros de heterodimerização de outros receptores nucleares? Em relação à sinalização do AR, acredita-se atualmente que eles atuem essencialmente como parceiros de

heterodimerização obrigatória para os RARs, já que os heterodímeros não permissivos RAR/RXR são considerados as unidades essenciais de transdução de sinal do AR. No entanto, pouco se sabe a respeito da forma como os RXRs regulam as respostas transcricionais ao AR nesse contexto, como a presença de seus ligantes e a ativação de outros de seus heterodímeros pode afetar essas respostas e, ainda, de que forma eles se relacionam com vias não genômicas do AR.

Somado a isso, a presença das diversas isoformas de RXR torna a busca pela compreensão das suas funções mais complexa. Com três genes conservados entre os mamíferos e com padrões de expressão distintos nos diferentes tecidos (Germain *et al.*, 2006b), é de se esperar que as isoformas de RXR α , RXR β e RXR γ tenham funções específicas. Atualmente, entretanto, ainda é debatido o quanto de suas funções são redundantes, isoladas ou até mesmo opostas, e o esclarecimento dessas questões tem potencial para contribuir significativamente na modulação farmacológica das vias de sinalização do AR no contexto da diferenciação neuronal.

1.6 Objetivos

Tendo em vista os desafios na busca por compreensão dos mecanismos moleculares por trás dos efeitos celulares do AR, o objetivo geral do presente trabalho é elucidar a maneira com a qual isoformas variáveis de RXR participam da diferenciação neuronal induzida pelo AR nas células derivadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Mais especificamente, o estudo consiste em:

- A. Estabelecer os parâmetros induzidos pela diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.
- B. Avaliar a modulação dos níveis de expressão a nível de transcritos e de proteína das diferentes isoformas de RXR e RAR durante a diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.
- C. Determinar os efeitos do silenciamento isolado das isoformas RXR α e RXR β para os parâmetros induzidos pela diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.

O objetivo A encontra-se abordado no Capítulo 1 e os objetivos B e C no Capítulo 2 dos Resultados.

2. RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

Caracterização dos Efeitos Celulares Induzidos pela Diferenciação Neuronal Mediada pelo Ácido Retinoico nas Células SH-SY5Y

2.1.1. Introdução

As células SH-SY5Y são uma sublinhagem de SK-N-SH, estabelecida ainda na década de 70 a partir de células de biópsia de medula óssea de paciente com neuroblastoma de origem adrenérgica (revisado por Hong-Rong *et al.*, 2010). A linhagem original SK-N-SH apresenta três diferentes fenótipos: o tipo N (neuronal), o tipo S (glial) e o tipo I (intermediário). Nas células SH-SY5Y ocorre o enriquecimento das células do tipo neuronal; os demais subtipos, entretanto, ainda encontram-se presentes e são insensíveis à diferenciação neuronal pelo AR. Em função de sua origem, as células SH-SY5Y apresentam fenótipo similar ao dopaminérgico, expressando a enzima tirosina hidroxilase (TH), determinante na síntese das catecolaminas. Assim, a linhagem é especialmente útil como modelo de DP.

Diante do tratamento com AR, as células adotam uma série de características típicas de neurônios maduros. Além da indução de parada no ciclo celular e consequente diminuição na proliferação (Kunzler *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017), o AR provoca nas células SH-SY5Y evidentes modificações morfológicas, com o aumento do número e do comprimento de extensões neuríticas. Além disso, é frequentemente relatada a superexpressão de marcadores neuronais diante do tratamento com AR (Lopes *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2011; Filograna *et al.*, 2015; Teppola *et al.*, 2015), incluindo TH (Lopes *et al.*, 2010; Frota-Junior *et al.*, 2011 ; Kunzler *et al.*, 2016).

De acordo com o protocolo empregado, no entanto, essas células podem adotar diferentes fenótipos. Faz-se necessária, portanto, a caracterização dos fenômenos induzidos pela diferenciação das mesmas, tanto como uma forma de validação do protocolo em si quanto de parâmetros de diferenciação neuronal da linhagem. Assim, o objetivo aqui proposto é a caracterização dos efeitos provocados pelo protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y com AR 10 μ M por até dez dias de incubação para a progressão no ciclo celular e para a indução de características neuronais na linhagem.

2.1.2. Materiais e métodos

Cultura celular

As células derivadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y provenientes do Banco Europeu de Linhagens foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e solução de antibióticos-antimicóticos (Gibco) a 37°C em estufa com atmosfera umidificada e 5% CO₂. Quando atingida a confluência, as células SH-SY5Y foram incubadas com solução de tripsina (Sigma-Aldrich) e ressemeadas na proporção 1:3.

Diferenciação neuronal das células SH-SY5Y

Como esquematizado na **Figura 3**, as células SH-SY5Y proliferativas, com aproximadamente 30 passagens, foram semeadas com a confluência de 1×10^4 células/cm² e cultivadas por 24 h em meio DMEM/F12 com SFB 10%. Após esse período, o meio foi trocado para DMEM/F12 com concentração reduzida de soro (1% SFB) e as células foram tratadas com AR (10µM) ou com volume equivalente do veículo, DMSO, como controle. A cada três dias o meio de tratamento foi substituído. As células foram analisadas em até 10 dias de diferenciação e comparadas com as células proliferativas (Dia 0) e com o controle do mesmo dia.

Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

A progressão do ciclo celular foi realizada nas células SH-SY5Y no Dia 4 de diferenciação, comparada com as células proliferativas no Dia 0. Após incubação com solução de tripsina, a suspensão celular foi preparada em tampão iodeto de propídeo (IP)-PBS (IP 4 µg/mL, RNase 20 µg/mL, IGEPAL® 0,1% e espermina

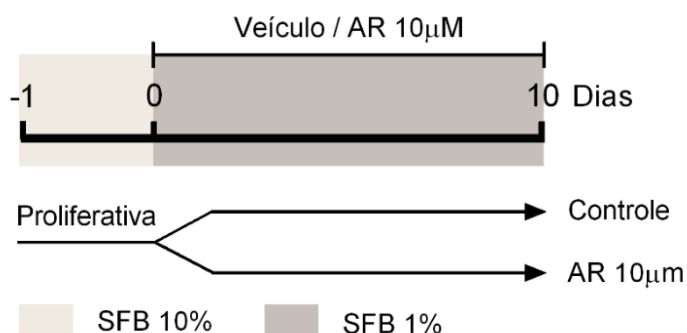


Figura 3 - Representação esquemática do protocolo da diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.

Fonte: da autora.

0,1%). 1×10^4 células foram analisadas por amostra em cada experimento em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences) e os dados foram analisados no *software* FlowJo.

RT-PCR quantitativo

O RNA total foi extraído das células em diferenciação com o reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, foi quantificado por biofotômetro. O cDNA total foi sintetizado com o *kit* comercial SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) a partir de 1µg do RNA total e a amplificação das sequências de interesse foi realizada com o *kit* comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O genes *GAPDH*, *B2M* e *GNB2L* foram utilizados como controles internos; a expressão dos mesmos foi analisada por meio do algoritmo geNorm e aquele com expressão mais estável foi aplicado como normalizador. Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Sequências dos *primers* diretos e reversos utilizados no PCR quantitativo, para cada gene de interesse.

Gene alvo	<i>Primer</i> direto	<i>Primer</i> reverso
<i>B2M</i>	5' TGCTGTCTCCATGTTTGAT	5' TCTCCGCTCCCCACCTCTA
<i>GAPDH</i>	5' AATCCCATCACCATCTTCCAG	5' TTCACACCCATGACGAACAT
<i>GNB2L</i>	5' GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG	5' GCTTGCAGTTAGCCAGGTTT
<i>SYP</i>	5' AGACAGGGAACACATGCAAG	5' TCTCCTTAAACACGAACCACAG
<i>ENO2</i>	5' CTGACAAAGTCCTGGTAGAGTG	5' GATCGTTATTGGCATGGATGTTG

Western Blot

As células SH-SY5Y foram dissociadas da placa de cultura por meio de incubação com solução de tripsina e os precipitados celulares foram lisados com tampão RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL® 1%, sais biliares 0,5%, SDS 0,1%) com 1mM do inibidor de proteases PMSF. Foi realizada quantificação do

conteúdo total de proteínas de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) e adicionado tampão Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 10%). As proteínas totais (50 μ g) foram fracionadas por eletroforese em gel de agarose e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após incubação com tampão Tween®-TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 0,9%, Tween®-20 0,1%) contendo 5% de leite em pó desnatado, a membrana foi incubada com os anticorpos contra TH (2792S, Cell Signaling) e β -actina (4967S, Cell Signaling) por 15 h a 4°C de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida a membrana foi incubada com os anticorpos secundários acoplados a peroxidase por 1 h em temperatura ambiente. A emissão de quimioluminescência foi enfim detectada por meio do fotodocumentador ImageQuant LAS 400 (GE Healthcare Life Sciences) e a análise densitométrica das bandas foi realizada com o *software* ImageJ.

Imunofluorescência

As células SH-SY5Y controle e tratadas com AR foram fixadas, no Dia 7 de diferenciação, com solução de paraformaldeído 4% durante 20 min, lavadas com PBS e incubadas com 0,2% Triton-PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (ASB), durante 1 h a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada incubação do anticorpo primário contra β 3-tubulina (480011, Invitrogen), preparado em 0,2% Triton-PBS contendo ASB 1% durante 15 h a 4°C de acordo com as instruções do fabricante. Após três lavagens com tampão, as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a with Alexa Fluor® durante 1 h a temperatura ambiente. Após três lavagens foi realizada incubação com solução de DAPI durante 5 min, para marcação nuclear. Após três lavagens, as imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência EVOS FL Auto Cell Imaging System (Invitrogen).

Estatística

Os dados provenientes de no mínimo três experimentos biológicos independentes foram analisados com o *software* GraphPad Prism. Teste *t* ou análise de variância foram aplicados quando adequado, e as diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

2.1.3. Resultados

As células SH-SY5Y proliferativas foram submetidas ao protocolo de diferenciação neuronal com AR 10 μ M. De maneira paralela, foi mantido um grupo controle no qual as células foram semeadas na mesma confluência inicial e incubadas durante o mesmo período de tempo com meio contendo apenas 1% de SFB, diferindo apenas das células diferenciadas por não serem submetidas ao AR – no seu lugar, foi adicionado o volume equivalente do veículo DMSO. A redução na concentração de soro contribui para a promoção de parada no ciclo celular em neuroblastoma (Kunzler *et al.*, 2016) e, assim, auxilia o avanço da diferenciação neuronal pelo AR. Por esse motivo, além do grupo das células proliferativas no Dia 0 de diferenciação, esse grupo controle foi utilizado para verificar os efeitos isolados do AR sobre as células SH-SY5Y. O meio com os respectivos tratamentos foi trocado uma vez a cada três dias, e as células foram coletadas ao longo do processo sempre nos dias seguintes às trocas de meio.

Primeiramente, foi analisada a contribuição isolada do cultivo em concentrações reduzidas de SFB e o efeito desse cultivo somado ao tratamento com AR para a progressão no ciclo celular (**Figura 4.A, B, C**). Para isso, as células controle e tratadas com AR no Dia 4 do protocolo de diferenciação foram comparadas com as células proliferativas no Dia 0 quanto ao conteúdo de DNA (avaliado por marcação com IP) e análise por citometria de fluxo. Foi observado que a redução na concentração de SFB no grupo controle é capaz de aumentar a população de células em G0/G1 e diminuir as células em S, quando comparadas às proliferativas, mas que a adição de AR permite um efeito ainda maior sobre esses parâmetros.

Em seguida, foi avaliada a morfologia das células SH-SY5Y no Dia 7 do protocolo de diferenciação por meio de microscopia de imunofluorescência após marcação do conteúdo de β 3-tubulina (**Figura 4.D**). Comparadas às células controle no mesmo dia, as células diferenciadas com AR apresentaram, além de maior marcação para β 3-tubulina, modificações morfológicas características da diferenciação neuronal, com o aumento expressivo de projeções neuríticas.

Por fim, foi avaliada a capacidade de cada um desses tratamentos em induzir a superexpressão de dois marcadores neuronais durante a diferenciação: enolase 2 e sinaptofisina. Para isso, foram analisados os níveis dos transcritos dos genes

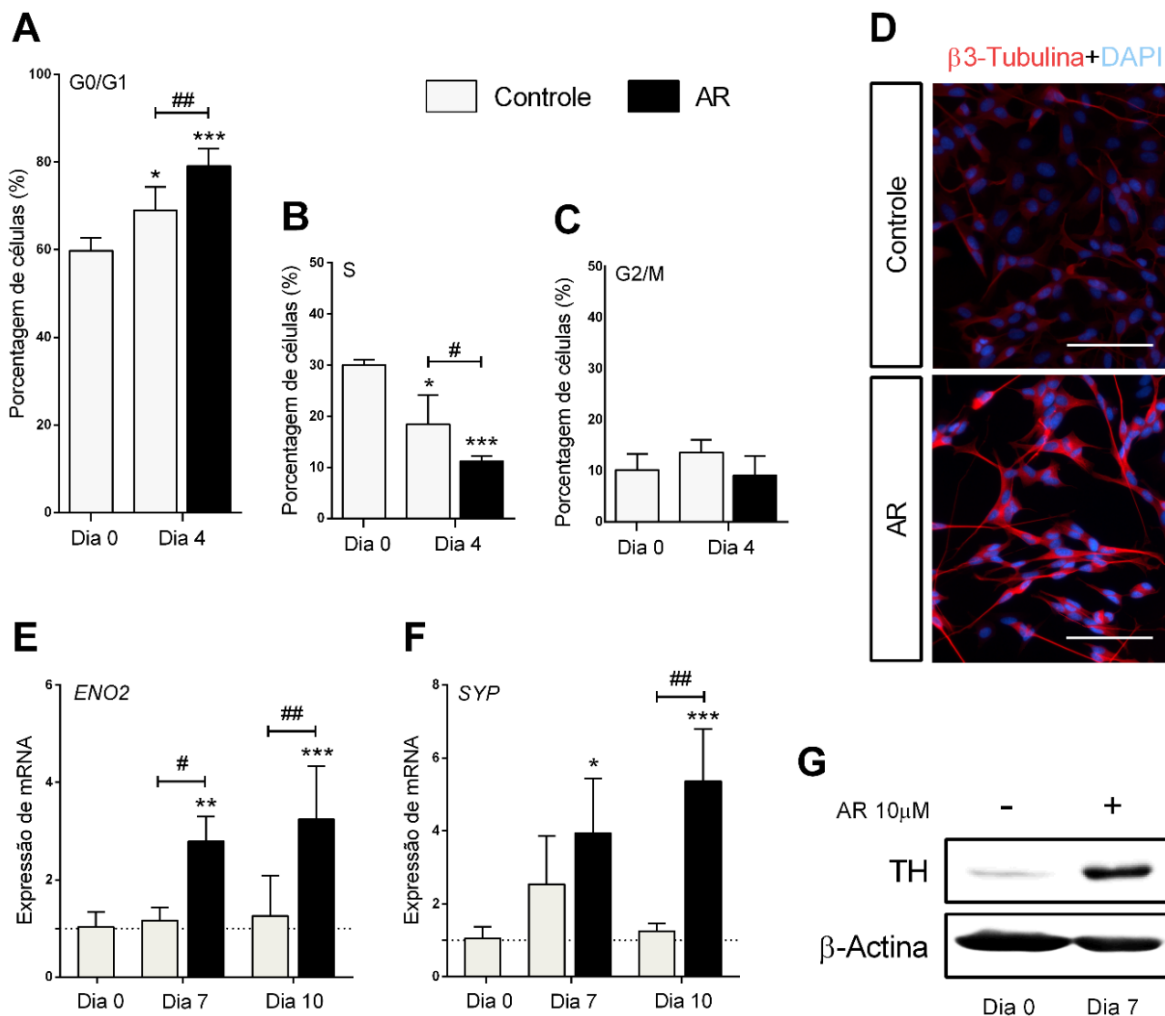


Figura 4 - Diferenciação neuronal mediada pelo ácido retinoico das células SH-SY5Y. **(A-C)** Porcentagem de células nos estágios G0/G1, S ou G2/M do ciclo celular, respectivamente, na análise por citometria de fluxo realizada nas células nos dias 0 e 4 do protocolo de diferenciação, tratadas ou não com AR. **(D)** Microscopia de imunofluorescência das células no dia 7 de diferenciação com AR, comparadas com as células do grupo controle do mesmo dia, marcadas contra $\beta 3$ -tubulina (em vermelho) e com o núcleo corado com DAPI (em azul). **(E-F)** Expressão de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *ENO2* e *SYP*, respectivamente, nas células nos dias 0, 7 e 10 do protocolo de diferenciação, tratadas ou não com AR. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle interno e os resultados são relativos à média da expressão nas células proliferativas (Dia 0). **(G)** Imunoconteúdo de TH obtido por *western blot* nas células no dia 7 de diferenciação com AR, comparadas às células proliferativas no dia 0. A proteína β -actina foi utilizada como controle interno. Barras indicam a média \pm DP de quatro experimentos independentes analisados por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$ e *** indica $p < 0,001$ em relação ao Dia 0; # indica $p < 0,05$ e ## indica $p < 0,01$ em relação ao controle do mesmo dia.

Fonte: da autora.

ENO2 e *SYP* em estágios avançados do protocolo de diferenciação: nos Dias 7 e 10, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com AR (**Figura 4.E, F**). Foi observado que o tratamento com o AR, e não o grupo controle, foi capaz de aumentar significativamente a expressão desses genes quando comparado às células proliferativas, já a partir do Dia 7. Somado a isso foi avaliado o imunoconteúdo de TH no Dia 7 de diferenciação com AR, comparado ao Dia 0 (**Figura 3.G**), e foi visto que o protocolo aumentou a presença do marcador de neurônios dopaminérgicos.

2.1.4. Conclusões

A presente caracterização do protocolo de diferenciação neuronal permitiu a observação da indução de efeitos clássicos do AR em linhagens celulares: parada no ciclo celular e diferenciação celular. No Dia 4, foi visto que o tratamento resultou em uma significativa modificação no perfil populacional de células em G1/G0, S e G2/M: houve aumento de células em G1/G0 e diminuição de células em S, evidenciando parada no ciclo celular. No dia 7, em estágios mais avançados da diferenciação, foi possível observar a indução de marcadores neuronais: o tratamento com AR provocou aumento da transcrição dos genes para enolase 2 e sinaptofisina, além de aumento no conteúdo proteico de TH e de β 3-tubulina e em evidentes modificações morfológicas características de neurônios maduros. Importaneamente, foi possível confirmar a sensibilidade das células SH-SY5Y ao tratamento com AR e estabelecer parâmetros de diferenciação neuronal que poderão ser utilizados mais à frente.

Além disso, a caracterização foi útil para compreender a participação da redução da concentração de SFB para o processo. O cultivo em 1% SFB é suficiente para modular o ciclo celular e, assim, parece contribuir para o efeito de parada na progressão do mesmo induzido pelo AR – como foi observado na análise por citometria de fluxo. No entanto, ele não foi suficiente na indução de parâmetros neuronais: somente o tratamento contínuo com AR permitiu o aumento da expressão de marcadores neuronais quando comparado às células proliferativas.

2. RESULTADOS

CAPÍTULO 2:

Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation.

Manuscrito submetido à publicação no periódico

Molecular Neurobiology (ISSN: 0893-7648)

Molecular Neurobiology - Submission Notification to co-author

Re: "Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on retinoic acid-mediated neuroblastoma differentiation"

Full author list: Carolina Saibro Girardi; Diana Carolina Rostirolla; Fernanda Janini Mota Lini; Pedro Ozorio Brum; Jeferson Delgado da Silva Jr; Camila Tiefensee-Ribeiro; Luana Heimfarth; Alice Kunzler; Jose Claudio Fonseca Moreira; Daniel Pens Gelain, PhD

Dear MSc Carolina Girardi,

We have received the submission entitled: "Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on retinoic acid-mediated neuroblastoma differentiation" for possible publication in Molecular Neurobiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Professor Daniel Pens Gelain who will be able to track the status of the paper through his/her login.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Professor Daniel Pens Gelain who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Molecular Neurobiology

1 **Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated**
2 **neuroblastoma differentiation.**

3
4 Carolina Saibro Girardi¹, Diana Carolina Rostirolla¹, Fernanda Janini Mota Lini¹, Pedro
5 Ozorio Brum¹, Jeferson Delgado¹, Camila Tiefensee Ribeiro¹, Luana Heimfarth¹, Alice
6 Kunzler¹, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain¹

7
8 ¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de
9 Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos,
10 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil.

11
12 **Correspondence:** Daniel Pens Gelain. E-mail: dgelain@yahoo.com.br. Tel: + 55 51 3308
13 5577.

14
15 **Keywords:** retinoic acid, neuronal differentiation, RXR receptors, SH-SY5Y

16
17 **Abstract**

18 Retinoic acid (RA) promotes differentiation in multiple neurogenic cell types by promoting
19 gene reprogramming through retinoid receptors and also by inducing cytosolic signaling
20 events. The Retinoid X Receptors (RXR) are one of the main mediators of RA cellular
21 effects, classically by joining the direct receptors of RA, the Retinoic Acid Receptors (RAR),
22 in RAR/RXR dimers which act as transcription factors. Distinct RXR genes lead to RXR α ,
23 RXR β and RXR γ isoforms, but their specific roles in neuronal differentiation remain
24 unclear. We firstly investigated both RXRs and RARs expression profiles during RA-
25 mediated neuronal differentiation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, and found
26 varying levels of retinoid receptors transcript and protein contents along the process. In order
27 to understand the roles of distinct RXR isoforms expression to RA signal transduction, we
28 performed siRNA-mediated silencing of RXR α and RXR β during the first stages of SH-
29 SY5Y differentiation. Our results showed that RXR α is required for RA-induced neuronal

30 differentiation of SH-SY5Y cells, since its silencing compromised cell cycle arrest,
31 prevented the upregulation of neuronal markers and the adoption of neuronal morphology.
32 Besides, silencing of RXR α affected the phosphorylation of ERK1/2. By contrast, silencing
33 of RXR β improved neurite extension and lead to increased expression of tau and
34 synaptophysin genes, suggesting that RXR β may negatively regulate neuronal parameters
35 related to neurite outgrowth and function. Our results indicate distinct functions for RXR
36 isoforms during RA-dependent neuronal differentiation and reveal new perspectives for
37 studying such receptors as clinical targets in therapies aiming at restoring neuronal function.

38

39 **Introduction**

40 Retinoic Acid (RA) is a metabolite of vitamin A which regulates multiple cellular functions,
41 such as differentiation, proliferation and apoptosis [1,2]. It plays fundamental roles in the
42 development of central nervous system and is largely employed *in vitro* as a differentiating
43 factor for neurogenic cell lines [3]. RA effects are classically associated with gene
44 reprogramming, mediated by nuclear receptors collectively known as retinoid receptors.
45 Retinoic Acid Receptors (RAR α , β and γ genes) and Retinoid X Receptors (RXR α , β , and γ
46 genes) form RAR/RXR heterodimers which are activated by RA and directly regulate gene
47 transcription by interacting with RA responsive elements (RARE) on DNA [4]. Additionally,
48 more recent findings have shown that retinoids can also induce rapid, extra-nuclear and
49 transcriptional-independent signaling effects referred to as nongenomic pathways [5-8].

50 While RARs are the direct receptors of RA, RXRs play central roles in RA signaling as
51 obligatory heterodimerization partners for RARs [4]. However, how RXRs regulate RA
52 transcriptional responses and whether they interconnect classical and nongenomic effects
53 remain unclear. Finally, little is known about the specific roles of distinct RXR isoforms for
54 RA-mediated neurogenesis.

55 We investigated how RXR single isoforms take part in RA cellular effects during the
56 neuronal differentiation of SH-SY5Y, a human derived neuroblastoma cell line. Upon
57 exposure to RA, SH-SY5Y proliferative cells undergo cell cycle arrest [9,10] and
58 differentiate into a neuron-like state with dopaminergic (DAergic) phenotype [11,12,9]. In
59 addition, differentiation of SH-SY5Y cells reproduce other well-known RA effects as

60 metabolic reprogramming [13,14], reactive species (RS) production and activation of
61 MEK/ERK signaling pathway [15,9].

62 In the present study, we found that RXR isoforms expressed in SH-SY5Y cells exhibit
63 varying levels of mRNA and protein contents according to different stages of the process.
64 We performed siRNA-induced transitory silencing of RXR α and RXR β during first stages
65 of neuronal differentiation of SH-SY5Y cells, and evaluated its effects for the main cellular
66 responses to RA. Our results demonstrate that their expression is not equally required for
67 RA effects and that they differently take part in multiple cellular events induced during the
68 process. We show that RXR α and RXR β isoforms can play distinct and even opposite roles
69 during RA-mediated neuronal differentiation.

70

71 **Materials and Methods**

72 **SH-SY5Y cell culture and differentiation**

73 SH-SY5Y human neuroblastoma cell line from European Collection of Cell Cultures was
74 cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and
75 antibiotic-antimycotic solution (Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. For
76 subculture, SH-SY5Y cells were incubated with trypsin solution (Sigma-Aldrich).

77 For differentiation (summarized in Fig. 1A), proliferative SH-SY5Y cells at passage around
78 30 were seeded at 1×10^4 cells/cm² and cultivated for 24 hrs in DMEM/F12 with 10% FBS.
79 After that cells were incubated with DMEM/F12 with reduced concentration of FBS to 1%
80 and treated with RA (10 μ M) or its vehicle DMSO as a control. Medium and treatments were
81 replaced every three days and samples were collected all over the process until seven days
82 of differentiation. When performing ERK1/2 phosphorylation assay, cells were preincubated
83 for 2 hrs with DMEM/F12 with 1% FBS before RA induction.

84 **PC12 and NT2 cell culture**

85 PC12 rat pheochromocytoma and NT2 pluripotent human embryonal carcinoma cell lines
86 from Rio de Janeiro Cell Bank were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.
87 PC12 cells proliferated in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 5% fetal equine
88 serum (FES) and antibiotic-antimycotic solution and, for subculture, non-adherent cells were
89 collected from medium and adherent cells were incubated with trypsin solution. Cells were

90 seeded at 5×10^4 cells/cm² and cultivated for 24 hrs, then incubated with RA (10 μ M) in
91 DMEM with 1% FBS and 0.5% FES. Both adherent and non-adherent cells were collected
92 for analysis.

93 NT2 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotic-antimycotic
94 solution and subculture was prepared by soft scraping. Cells were seeded at 3×10^4 cells/cm²
95 and cultivated for 24 hrs, then incubated with RA (10 μ M) in DMEM with 1% FBS.

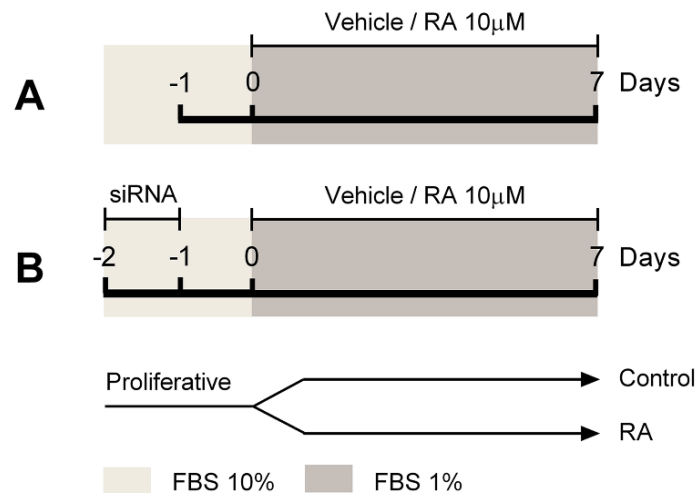
96 **Silencing of RXRs single isoforms**

97 For transient transfection with siRNA, Lipofectamine® RNAiMAX transfection reagent
98 (Invitrogen) was used according to manufacturer's instructions. Briefly, reverse transfection
99 was performed by seeding 1×10^5 cells/cm² in DMEM/F12 with 10% FBS without antibiotic-
100 antimycotic solution, in presence of Opti-MEM® medium (Gibco), transfection reagent and
101 siRNAs: *RXRA* siRNAs (AM16708 Ambion, IDs 4392420 and 142519), *RXRB* siRNA
102 (AM16708 Ambion, ID 4390826) and a negative control siRNA scramble (AM16708
103 Ambion, ID 4390844), at final concentrations of 30 nM. Incubation of SH-SY5Y cells with
104 siRNAs occurred for 24 hrs.

105 For sequent neuronal differentiation, cells were resuspended with trypsin and seeded at
106 1×10^4 cells/cm², cultivated for more 24 hrs in DMEM/F12 with 10% FBS and likewise
107 submitted to RA treatment, so that Day 0 of neuronal differentiation occurred two days after
108 transfection (as summarized in Fig. 1B).

109 **Quantitative RT-PCR**

110 Total RNA was extracted from cells in culture plates with TRIzol® reagent (Invitrogen)
111 according to manufacturer's instructions and quantified by biophotometer. cDNA was
112 synthesized with SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) using 1 μ g of total
113 RNA. Quantitative RT-PCR reactions were performed in 7300 Real-Time PCR System
114 (Applied Biosystems) with GoTaq® Green Master Mix (Promega) following manufacturer's
115 instructions. *GAPDH*, *B2M* and *GNB2L* were used as housekeeping genes. Expression levels
116 were analyzed by geNorm algorithm and, for each case, the most stable housekeeping gene
117 was applied. The primers used for amplification are summarized in Table 1 (available in
118 Online Resource 1).



119 **Fig. 1** Overview of SH-Y5Y treatments. **A** RA-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells and **B**
 120 siRNA-mediated transient silencing of RXR single isoforms during at Day 0 of neuronal differentiation. After
 121 seeding and cultivation of proliferative SH-SY5Y in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, medium was
 122 changed to DMEM/F12 with 1% FBS and treatments with vehicle (Control group) or RA 10 μM (RA group)
 123 has started at Day 0. Medium and treatments were replaced every 3 days until 7 days of differentiation

124

125 **Western Blot**

126 Cells were harvested with RIPA buffer (Tris 50mM, NaCl 150mM, IGEPAL® 1%, bile salts
 127 0.5%, SDS 0.1%) with 1 mM PMSF protease inhibitor. Complete cell lysis was obtained by
 128 sonication. Total protein quantification was performed according to Bradford method [16]
 129 and Laemmli buffer (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 1%, glycerol 10%, β-mercaptoethanol
 130 10%) was added to cell lysates. For ERK1/2 activation analysis, cells were directly harvested
 131 in complete Laemmli buffer.

132 Total protein content was then fractionated by SDS-PAGE (nearly 50 μg per sample) and
 133 transferred to nitrocellulose membranes. After incubation with Tween®-TBS buffer (100
 134 mM Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 0.9%, Tween®-20 0.1%) containing 5% of non-fat milk powder
 135 for 1 hr, the membranes were incubated with primary antibodies summarized in Table 2
 136 (available in Online Resource 1) for 15 hrs at 4°C according to manufacturer's instructions.
 137 Thereafter, membranes were incubated with peroxidase-linked secondary antibodies for 1 hr
 138 at room temperature. Chemiluminescence emission was detected using ImageQuant LAS
 139 400 (GE Healthcare Life Sciences) and band densitometry analysis was performed with
 140 ImageJ software.

141 **Flow cytometry analysis of cell cycle progress**

142 Cell cycle progression assessment was performed in transfected SH-SY5Y cells at Day 4 of
143 differentiation with RA. After incubation with trypsin, a cell suspension was prepared in
144 propidium iodide (PI)-PBS (PI 4 µg/mL, RNase 20 µg/mL, IGEPAL® 0.1% and spermine
145 0.1%). 1×10^4 cells were analyzed per sample in each experiment by flow cytometry (BD
146 FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences) and data were analyzed by FlowJo software.

147 **Viability analysis**

148 Sulforhodamine B (SRB) incorporation assay was used for determination of cell density after
149 seven days of differentiation of SH-SY5Y cells transfected with siSCR, siRXRA or siRXRB,
150 as previously described [17]. As SRB has high affinity to cellular protein components, its
151 incorporation is directly related to cellular protein biomass. Lactate dehydrogenase (LDH)
152 activity in the culture supernatant was assessed to estimate cell membrane leakage, an
153 indicative of both necrosis and late apoptosis. The medium of transfected cells after three
154 and six days of differentiation was evaluated with a commercial kit from Labtest SA (MG,
155 Brazil) according to manufacturer's instructions.

156 **Immunocytochemistry**

157 Transfected and differentiated SH-SY5Y cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20
158 min, washed with PBS and incubated with 0.2% Triton-PBS containing 1% BSA for 1 hr at
159 room temperature. Cells were then incubated with primary antibodies for β 3-tubulin or TH
160 (described in Online Resource 1), prepared in 0.2% Triton-PBS containing 1% BSA
161 according to manufacturer's instructions, during 15 hrs at 4°C. After washing cells three
162 times with Triton-PBS, cells were incubated with secondary antibodies conjugated with
163 Alexa Fluor® 488 (A-11008, Invitrogen) or Alexa Fluor® 555 (A-21422, Invitrogen),
164 prepared in 0.2% Triton-PBS containing 1% BSA according to manufacturer's instructions,
165 for 1 hr at room temperature. After washing cells three times with Triton-PBS, incubation
166 with DAPI for nucleic acid staining was proceeded for 5 min. Images were acquired with
167 fluorescence microscope (EVOS FL Auto Cell Imaging System, Invitrogen).

168 **Neurite quantification**

169 Morphometric analysis of differentiated SH-SY5Y cells was performed with β 3-tubulin
170 immunofluorescence images through ImageJ software. NeuronJ plugin was applied for

171 semi-automated neurite tracing. Neurite counts and total length values were expressed as a
172 ratio of the number of cells per image, which was assessed by Cell Counter plugin.

173 **Statistics**

174 Data provenient from at least three independent biological experiments were analyzed with
175 GraphPad Prism software. Analysis of variance or t test was applied when appropriated and
176 differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

177

178 **RESULTS**

179 **mRNA and protein expression profiles of retinoid receptors during neuronal** 180 **differentiation**

181 Proliferative SH-SY5Y cells grown at 10% FBS were differentiated by treatment with RA
182 (10 μ M) at 1% FBS for seven days. Medium and treatment were replaced every three days
183 and, as a control, we compared differentiated cells with SH-SY5Y cultivated for the same
184 period at 1% FBS in presence of vehicle. In order to analyze the expression profiles of both
185 RXRs and RARs during RA-induced neuronal differentiation, we performed RT-qPCR to
186 assess their mRNA levels in proliferative SH-SY5Y cells (Day 0) and at early (Day 1) and
187 late stages (Day 7) of differentiation.

188 Transcriptional analysis of RXR α , RXR β , RAR α , RAR β and RAR γ genes (summarized in
189 Fig. 2A) showed that RXRs and RARs exhibited distinct profiles of expression after RA
190 induction. Previous observations found that RXR γ was absent in SH-SY5Y cells [18], so its
191 mRNA expression was not investigated. Treatment with RA induced a slight but significant
192 upregulation of RXR α and RXR β at late stages of differentiation (Fig. 2B, C). At Day 7,
193 RXR α transcripts increased with RA treatment (Fig. 2B), and RXR β mRNA levels were 2-
194 fold increased relative to Day 0 (Fig. 2C). Alternatively, all RAR isoforms were rapidly
195 upregulated in response to RA treatment (Fig. 2D, E, F). Particularly, RAR β mRNA levels
196 presented the highest increases, reaching about 50 and 150 fold changes at Days 1 and 7,
197 respectively (Fig. 2E).

198 Because retinoid receptors have been shown to be largely regulated by proteasomal
199 degradation [19], we also investigated changes in RXRs and RARs patterns of expression in
200 terms of protein levels. Western blot analysis performed during neuronal differentiation of

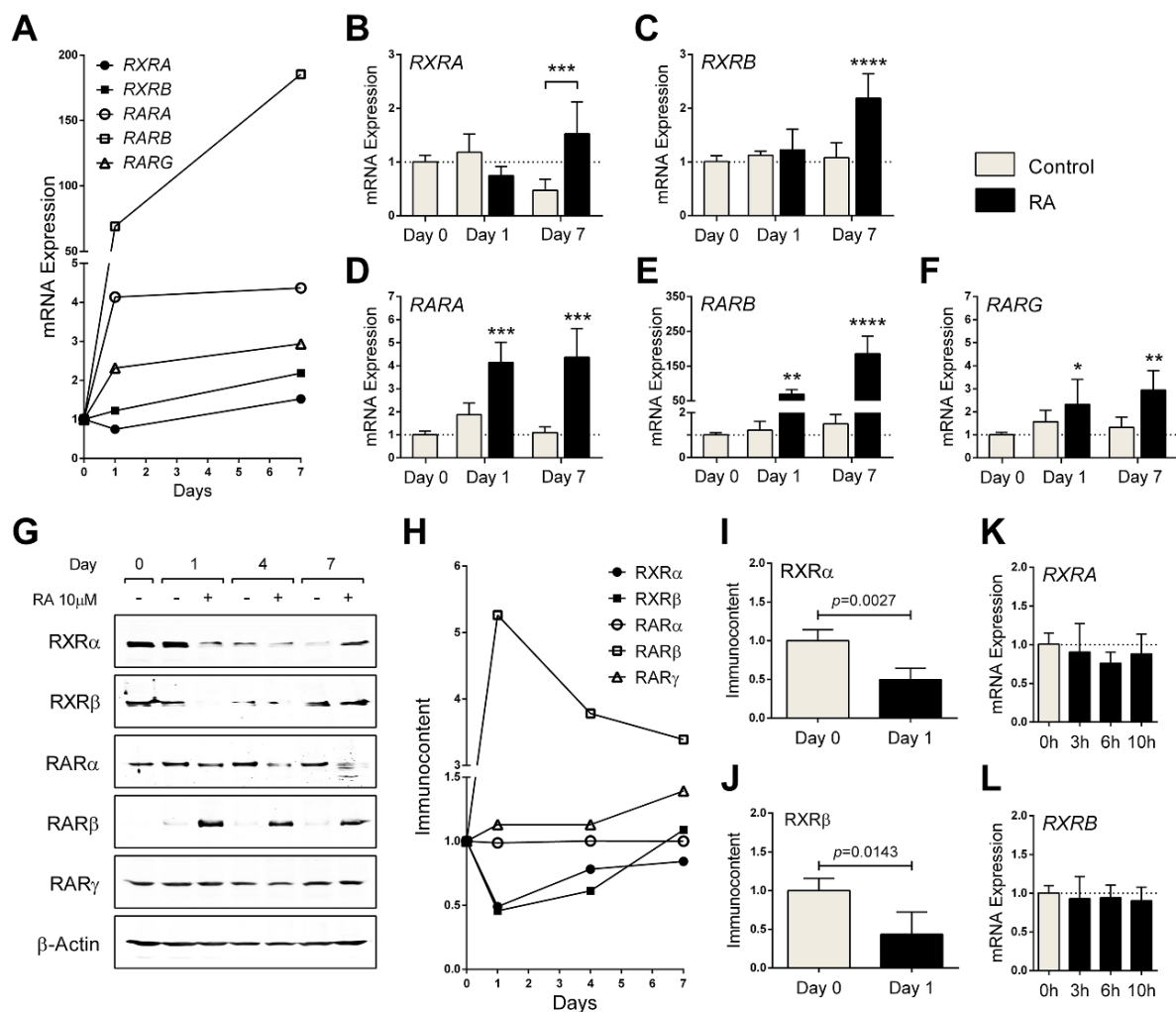
201 SH-SY5Y cells (summarized in Fig. 2G, H) showed that the observed positive regulation of
202 RAR transcripts resulted in increased protein content only of RAR β isoform, while RAR α
203 and RAR γ protein levels did not present significant alterations.

204 In turn, protein levels of both RXR α and RXR β were downregulated during early stages of
205 RA-mediated differentiation, at Day 1 (Fig. 2I, J), and at later stages the increased mRNA
206 levels seem to recover protein contents. Importantly, we also analyzed RXR γ
207 immunocontent along differentiation, but it was not detected in SH-SY5Y cells (not shown).
208 In order to verify if decreased protein levels of RXR isoforms were due to earlier
209 transcriptional alterations induced by RA, we monitored mRNA levels within 10 hrs of
210 exposure to RA and found unaltered expression of RXR α and RXR β genes (Fig. 2K, L),
211 suggesting transcriptional independent mechanisms involved in RXRs modulation. We also
212 investigated if RA induces rapid alterations to protein levels of RXRs in PC12
213 pheochromocytoma and NT2 embryonal carcinoma cells, which undergo neuronal
214 differentiation and are both sensitive to RA treatment [20,21], and found that RXR α was
215 also downregulated in response to RA treatment (Online Resource 2).

216 **Silencing of RXR α and RXR β single isoforms**

217 In order to clarify how distinct RXR isoforms mediate RA effects in neuronal differentiation,
218 we evaluated the roles of RXR α and β expression at Day 0 of neuronal differentiation of
219 SH-SY5Y. We performed lipofectamine-mediated transfection of specific siRNA against
220 RXR α (*siRXRA*) and RXR β (*siRXRB*) mRNAs in proliferative cells and, two days after
221 transfection, RA-induced neuronal differentiation was initiated. As a negative control, we
222 also transfected SH-SY5Y cells with scrambled sequence of siRNA (*siSCR*).

223 Transfection in proliferative cells did not cause evident alterations in cell viability or
224 morphology (Fig. 3A). Western blot of RXRs showed that RXR α was downregulated by
225 80% in *siRXRA* cells (Fig. 3B), as well as RXR β in *siRXRB* cells (Fig. 3C), two days after
226 transfection. In addition, *siRXRA* also significantly induced a 50% decrease in RXR β
227 immunocontent (Fig. 3B), and we found similar results with minimal concentrations of
228 *siRXRA* and even with different siRNA sequences against RXR α mRNA (as shown in Online
229 Resource 3), indicating that silencing of RXR α might also lead to RXR β downregulation.
230 We also evaluated RARs immunocontent two days after transfection with *siRXRA* and
231 *siRXRB* but found no significant alterations (Online Resource 3).



232

233

Fig. 2 Transcript and protein expression profiles of retinoid receptors during RA-mediated neuronal differentiation. **A** Summary of mRNA expression of retinoid receptors ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) at Days 0, 1 and 7 of RA-mediated differentiation. **B-F** Relative expression of *RXRA*, *RXRB*, *RARA*, *RARB* and *RARG* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), respectively, at Days 0, 1 and 7 of treatment with vehicle (Control) or RA 10 μ M. *GAPDH* was used as housekeeping gene and results are relative to mean of Day 0. Bars at mean \pm SD of six independent experiments analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. * means p < 0.05; ** means p < 0.01; *** means p < 0.001 and **** means p < 0.0001 relative to Day 0 or to control group of the respective day, when indicated.

237

238

239

240

241

242

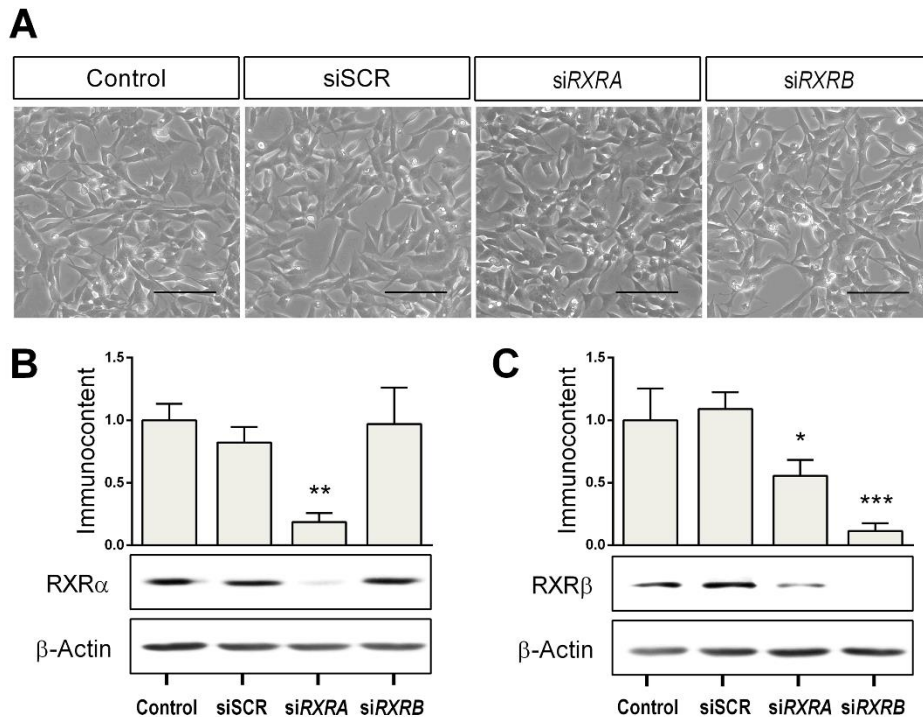
243

244

245

246

G Representative western blot of RXR and RAR isoforms at Days 0, 1, 4 and 7 in control (-) or RA-treated (+) cells. **H** Summary of immunoprotein levels of RXR and RAR isoforms under treatment with RA. **I-J** RXR α and RXR β immunoprotein levels, respectively, in SH-SY5Y cells at Day 1 of RA induction, compared to control (Day 0). β -Actin was used as internal control and results are relative to β -actin immunoprotein. **K-L** mRNA relative expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of *RXRA* and *RXRB*, respectively, in SH-SY5Y cells after 3, 6 or 10 hrs of RA induction. *B2M* was used as housekeeping gene and results are relative to mean of control. Bars at mean \pm SD of four independent experiments analyzed by Student's t test, with p values indicated



247

248 **Fig. 3** siRNA-mediated silencing of RXR α and RXR β single isoforms. Proliferative SH-SY5Y cells were
 249 transfected with negative control siRNA (siSCR), RXRA siRNA (siRXRA) and RXRB siRNA (siRXRB), all
 250 at 30nM final concentrations, and compared to control. A Cell morphology in control, siSCR, siRXRA and
 251 siRXRB groups after one day of transfection. Bars represent 100 μ m. B-C Representative western blot and
 252 respective densitometric analysis of RXR α and RXR β , respectively, two days after transfection with siSCR,
 253 siRXRA and siRXRB. β -Actin was used as internal control and results are relatively to β -actin immunoccontent.
 254 Bars at mean \pm SD of three independent experiments analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.
 255 * means $p < 0.05$; ** means $p < 0.01$; *** means $p < 0.001$ relative to siSCR

256

257 **RA-induced cell cycle arrest is impaired by silencing of RXR α**

258 RA is known to repress proliferation and to induce cell cycle arrest in multiple cell lines,
 259 including SH-SY5Y [9,10]. In order to understand if specific RXR isoforms are required on
 260 such RA effects, we first evaluated cell cycle progression in siRXRA and siRXRB-transfected
 261 cells after four days of neuronal differentiation. Flow cytometry analysis of PI-stained cells
 262 revealed that whereas RA induction increases the proportion of cells in G1/G0 phase and
 263 reduces the proportion of cells in S phase in siSCR-transfected cells (Fig. 4A, B), SH-SY5Y
 264 cells transfected with siRXRA and submitted to RA differentiation provide the same
 265 histogram profile of control cells and fail to reduce proliferation (Fig. 4C, D). This shift in
 266 G1/G0 and S populations in face of RXR α silencing proved to be statistically significant in

267 different experiments, while transfection with *siRXRB* had no effects on G1/G0 nor S
268 populations (Fig. 4F). Even though cell cycle arrest is favored when SH-SY5Y cells are
269 treated with 1% FBS, silencing RXR isoforms had no significant effects on cell cycle
270 progression in control groups (Fig. 4E). Sub-G1 populations, an indicative of apoptotic cell
271 death, remained under 3% of total counts and thus we could not find differences between
272 transfected groups (not shown).

273 We also investigated the effects of RXR α and RXR β silencing on cell viability parameters
274 during neuronal differentiation of SH-SY5Y. To find out if changes in cell cycle progression
275 affect cell population growth, we performed SRB incorporation assay in transfected cells
276 after differentiation (Day 7) and results showed that transfection with *siRXRA* lead to a 35%
277 increase in protein biomass compared to control *siSCR* (Fig. 4G). Moreover, cytosolic
278 leakage was not affected by silencing any of the receptors, as indicated by LDH activity
279 assay performed in the culture medium of transfected cells during differentiation (Online
280 Resource 4).

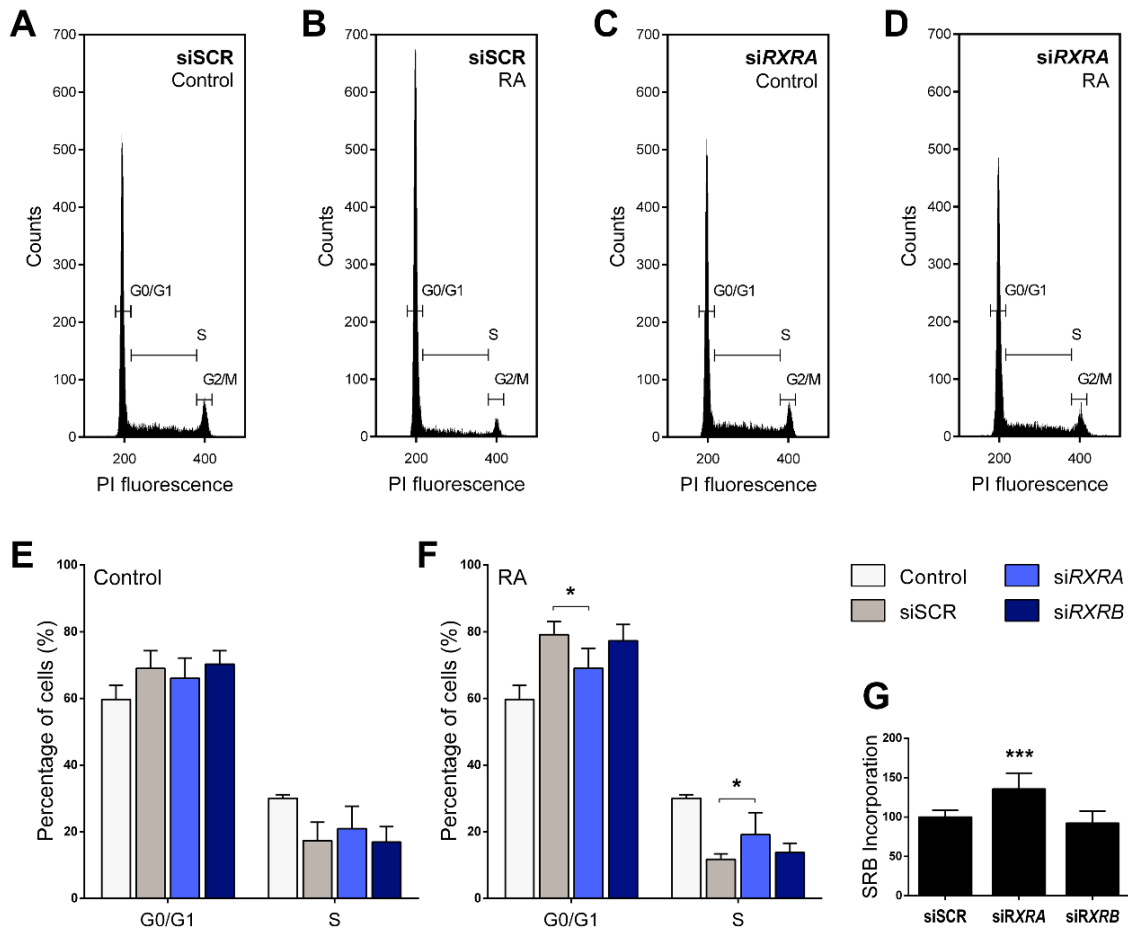
281 Altogether, our results show that whereas RXR β do not seem to be required for RA-mediated
282 decrease in neuroblastoma proliferation, silencing of RXR α isoform during the first stages
283 of neuronal differentiation with RA compromises cell cycle arrest and promotes cell
284 population growth in SH-SY5Y.

285 **Neuronal differentiation is prevented by silencing of RXR α whereas neurite outgrowth**
286 **is intensified by silencing of RXR β**

287 SH-SY5Y cells undergo transcriptional and morphological changes when submitted to RA
288 differentiation [11,12]. We evaluated whether silencing of RXR α or RXR β at Day 0 of RA-
289 mediated differentiation affects the adoption of a neuron-like phenotype in SH-SY5Y cells,
290 initially by assessing the levels of well-known neuronal markers induced by RA. RT-qPCR
291 analysis of neuron specific enolase 2 (*ENO2*), microtubule-associated tau protein (*TAU*) and
292 synaptic vesicle protein synaptophysin (*SYP*) gene expression at Days 4 and 7 of
293 differentiation showed distinct effects of *siRXRA* or *siRXRB* transfection (Fig. 5A, B, C).
294 Silencing of RXR α strongly prevented the upregulation of both *ENO2*, *TAU* and *SYP* genes
295 induced by RA (Fig. 5A, B, C), and also induced the downregulation of neurofilament-L
296 (NF-L) protein levels when compared to *siSCR* cells, as shown by western blot results of
297 RA-treated SH-SY5Y cells (Fig. 5D). Alternatively, silencing of RXR β led to an increased

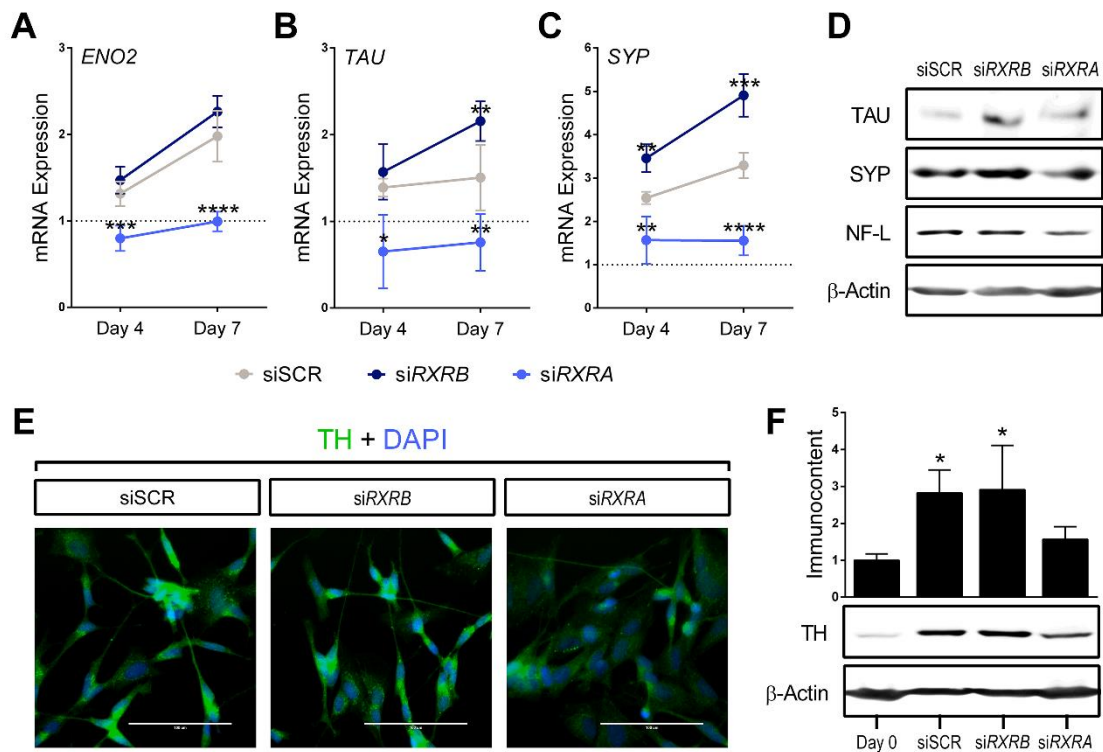
298 upregulation of *TAU* and *SYP* mRNA expression (Fig. 5B, C), which was also true for
 299 protein levels (Fig. 5D), indicating that RXR β expression can exert some inhibitory
 300 regulation over genes related to neurite function and synaptic processes. In control cells,
 301 however, *siRXRB* transfection was not capable to upregulate the gene expression of neuronal
 302 markers (not shown).

303



304 **Fig. 4** Cell cycle and viability analysis after transfection with *siSCR*, *siRXRA* or *siRXRB* at first stages of
 305 neuronal differentiation. Representative flow cytometry histograms of cell counts according to PI fluorescence
 306 indicating DNA content of cells transfected with **A-B** *siSCR* or **C-D** *siRXRA* at Day 4 of treatment with vehicle
 307 (Control) or RA 10 μ m, respectively. Percentage of cells at G0/G1 or S stages of cell cycle assessed by flow
 308 cytometry at Day 4 of treatment with **E** vehicle (Control) or **F** RA 10 μ m, compared to proliferative cells (Day
 309 0). **G** SRB incorporation (in arbitrary units) at Day 7 of RA-induced differentiation in cells silenced with
 310 *siRXRA* and *siRXRB*, relative to *siSCR*. Bars at mean \pm SD of six independent experiments analyzed by one-
 311 way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. * means $p < 0.05$; *** means $p < 0.001$ relative to *siSCR* control
 312 cells

313 SH-SY5Y cells differentiate into a DAergic-like phenotype when subjected to RA treatment.
 314 Thus we evaluated the immunoccontent of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting
 315 enzyme of catecholamine biosynthesis. Immunostaining of TH in transfected cells subjected
 316 to seven days of differentiation revealed that silencing of RXR α inhibited the induction of
 317 TH, but we found unaltered levels in siRXRB cells (Fig. 5E), which was also confirmed by
 318 western blot results (Fig. 5F).
 319



320 **Fig. 5** Neuronal markers expression after transfection with siSCR, siRXRB or siRXRA at first stages of neuronal
 321 differentiation. **A-C** mRNA expression levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of *ENO2*, *TAU* and *SYP*, respectively, in RA-treated cells
 322 at Days 4 and 7 of differentiation. *GNB2L* was used as housekeeping gene and results are relative to mean of
 323 proliferative cells. Bars at mean \pm SD of six independent experiments analyzed by two-way ANOVA with
 324 Dunnett's post hoc test. * means $p < 0.05$; ** means $p < 0.01$; *** means $p < 0.001$ and **** means $p < 0.0001$
 325 relative to siSCR at the same day. **D** Representative western blot of tau (TAU), synaptophysin (SYP) and
 326 neurofilament-L (NF-L) proteins in RA-treated cells at Day 7 of differentiation. **E** Representative
 327 immunofluorescence microscopy of TH in RA-treated cells at Day 7 of differentiation. TH is indicated by
 328 green fluorescence and the nucleus are stained blue by DAPI. Bars represent 200 μ m. **F** Representative western
 329 blot and respective densitometric analysis of TH in transfected cells at Day 7 of differentiation with RA
 330 compared to proliferative cells (Day 0). Bars at mean \pm SD of three independent experiments analyzed by one-
 331 way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. * means $p < 0.05$ relative to Day 0.

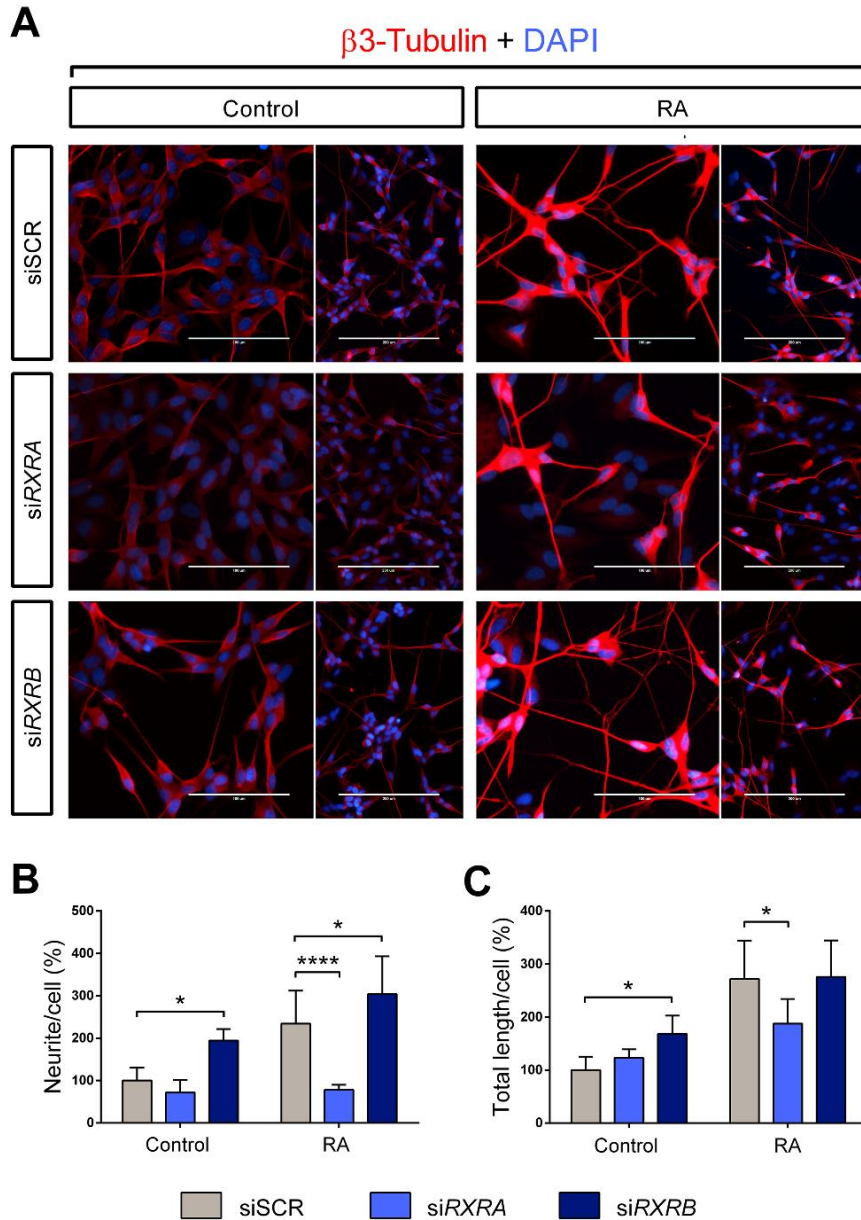
332 Since SH-SY5Y cells also undergo significant morphological changes mediated by RA, we
333 evaluated neurite outgrowth by immunostaining of β 3-tubulin in control and differentiated
334 cells after transfection (Fig. 6A). Whereas control siSCR cells exhibited no particular neurite
335 outgrowth, RA-treated cells presented abundant and long neurites which resembled a
336 neuronal network. Differentiated cells also showed increased β 3-tubulin immunocent, a
337 marker of neurite outgrowth in developing neurons. Transfection with siRXRA before
338 treatment with RA, in turn, led to a persistent cell population lacking β 3-tubulin induction,
339 which failed to extend neuritic processes, similarly to control cells. By contrast, transfection
340 with siRXRB induced cell elongation and neurite extension even in the absence of RA.
341 However, such increase in neuronal parameters in control siRXRB cells did not reach the
342 same extent as in RA-treated cells. Morphometric analysis of the number and length of
343 neurites (Fig. 6B, C) confirmed that siRXRA cells failed to extend neurite processes when
344 treated with RA and siRXRB cells improved neuritogenesis even in the absence of RA.

345 Taken together, our findings demonstrate that RXR α expression is required to signal
346 transduction of RA during first stages of neuronal differentiation. By contrast, results drawn
347 attention to potential inhibitory functions played by RXR β over neuronal induction,
348 especially related to neurite outgrowth and function.

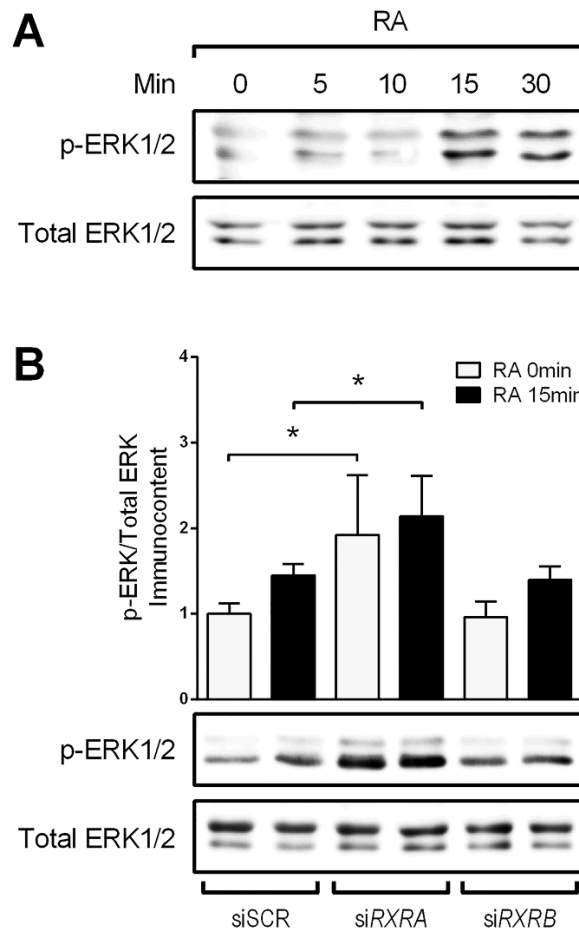
349 **ERK1/2 is overactivated by silencing of RXR α**

350 Besides inducing gene reprogramming during neuronal differentiation, RA also promotes
351 rapid and extra-nuclear effects that occur independently of transcriptional regulation and that
352 also contribute to differentiation [5-8]. In previous reports in SH-SY5Y cells, RA was
353 observed to activate the MEK/ERK pathway by inducing a rapid phosphorylation of ERK1/2
354 [15,9], and it has proven to be important for cell survival during differentiation [22].

355 We found that ERK1/2 phosphorylation (p-ERK1/2) was increased after 15 and 30 min after
356 RA induction (Fig. 7A) and investigated whether silencing of RXR single isoforms can
357 affect its rapid activation. We accessed p-ERK1/2 levels relatively to total ERK1/2
358 immunocent after 0 and 15 min of RA treatment in siSCR, siRXRA and siRXRB cells (Fig.
359 7B), and results showed that silencing of RXR α induced an overactivation of ERK1/2, in
360 either the presence (15 min) or not (0 min) of RA. We thus found that RXR α expression
361 affects cytosolic processes induced by RA and that such RXR isoform can also regulate non-
362 classical signaling pathways which play important roles for neuronal differentiation.



363 **Fig. 6** Neurite extension at Day 7 of differentiation after transfection with siSCR, siRXRA or siRXRB. **A**
 364 Representative immunofluorescence microscopy of β3-tubulin in transfected cells treated with vehicle
 365 (Control) or RA 10μm. β3-Tubulin is indicated by red fluorescence and the nucleus are stained blue by DAPI.
 366 Bars represent 100 and 200 μm, respectively. **B** Number of neurites per cell and **C** total neurite length per cell
 367 (both in arbitrary units), assessed by semi-automated quantification of neurites from at least six images of
 368 independent wells acquired in β3-tubulin immunofluorescence experiment. The total number of cells per image
 369 was used as internal control and results are expressed relatively to cell counts. Bars at mean ±SD analyzed by
 370 two-way ANOVA with Dunnett's post hoc test. * means p<0.05 and **** means p<0.0001 relative to the
 371 respective siSCR



373 **Fig. 7** RA-mediated ERK1/2 phosphorylation in siSCR, siRXRA and siRXRB cells. **A** Representative western
 374 blot of p-ERK1/2 and total ERK1/2 immunoblots after 0, 5, 10, 15 and 30 min of RA treatment. **B**
 375 Representative western blot of p-ERK1/2 and total ERK1/2 with respective densitometric analysis showing p-
 376 ERK/total ERK ratios in siSCR, siRXRA and siRXRB transfected cells after 0 or 15 min of induction with RA.
 377 SH-SY5Y cells were preincubated with DMEM/F12 supplemented with 1% SFB for 2 hrs before RA
 378 treatments, and cells were harvested all with the same time of incubation with the treatment medium. Bars at
 379 mean \pm SD analyzed by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test. * means $p < 0.05$ relative to siSCR
 380

381 Discussion

382 RA regulates the balance between cell proliferation and differentiation in multiple neuronal
 383 cells. During the development of nervous system, RA signaling contributes to differentiation
 384 of neural progenitors to primary neurons [3,1] and RA treatment is commonly employed *in*
 385 *vitro* for neuronal differentiation of embryonic stem cells aiming at restoring neuronal
 386 function [23,24]. RA has been also known to inhibit proliferation and even to promote cell

387 death in multiple neuroblastoma cell lines, but the clinical response to RA treatment was
388 found variable [25]. Comprehensive analysis of molecular mechanisms behind success or
389 failure of RA-mediated effects is thus required, and understanding how distinct RXR
390 isoforms take part in neuronal differentiation brings new perspectives to successfully evolve
391 RA-based clinical approaches.

392 SH-SY5H cells have been frequently employed as an *in vitro* model for neuroscience, both
393 in proliferative conditions and in a neuron-like state after differentiation [26]. Upon RA
394 induction, SH-SY5Y cells efficiently adopt a mature phenotype which resembles DAergic
395 neurons. Our results showed that proliferative SH-SY5Y cells feature RXR α and β isoforms,
396 besides all RAR α , β and γ receptors. As previously reported [18], we found undetectable
397 levels of RXR γ protein expression in SH-SY5Y cells.

398 Considering that RA can influence gene expression and protein content in multiple ways, we
399 investigated how its own mediators are regulated along neuronal differentiation of SH-
400 SY5Y. Similarly to previous reports, gene expression profiling showed that RARs are
401 upregulated in face of RA induction in SH-SY5Y cells, especially RAR β isoform [27,28].
402 The expression of all of the RAR genes can be under control of activated RAR/RXR
403 heterodimers, but RA-induced overexpression of RAR β is specially conserved in multiple
404 cell types [29]. The direct RA-dependent transcriptional modulation of RXRs, in turn,
405 remains less established. However, our results showed that RXR α and RXR β genes are also
406 upregulated by RA treatment, but only at later stages of differentiation. Although functional
407 RAREs are uncertain within RXR α , β and γ minimal promoters, distal motifs can also
408 control gene expression as enhancers [29]. Besides, RA can modulate RXRs gene expression
409 through indirect mechanisms, as multiple transcription factors are also regulated by RA [29]
410 as well as microRNAs [30].

411 In addition to gene regulation, non-classical and extra-nuclear pathways induced by RA can
412 also affect retinoid receptors availability. More recent findings showed that RA-dependent
413 cell signaling cascades induce phosphorylation and ubiquitination of retinoid receptors
414 which promote their proteasome-mediated degradation [19]. Western blot results along
415 neuronal differentiation of SH-SY5Y cells demonstrated conflicting protein and mRNA
416 levels for both RARs and RXRs which can be explained by protein degradation. Therefore,
417 non-genomic pathways are possibly engaged in RAR and RXR modulation during RA-

418 mediated differentiation of SH-SY5Y cells. Protein degradation of retinoid receptors
419 induced by proteasome can exert multiple functions for RA signaling pathways, but its exact
420 role is yet not clear. It might provide the constant turnover of retinoid receptors content along
421 differentiation, or even restrain RAR/RXR responses after multiple rounds of transcription
422 initiation which may be important to cell survival, as RA-responsive genes are also involved
423 in stress and cell death [2].

424 Specifically with respect to RXRs protein levels, we found both isoforms downregulated
425 during the early stages of neuronal differentiation of SH-SY5Y cells, which was also true
426 regarding RXR α levels in PC12 and NT2 cancer-derived cell lines after RA treatment. At
427 later stages of SH-SY5Y differentiation, however, increased mRNA levels of both RXR α
428 and RXR β genes may recover their protein contents. Therefore, RXRs are variably regulated
429 along RA-mediated neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. Whatever consequences
430 such regulation has to neuronal differentiation, it may also affect the multiple pathways in
431 which RXR isoforms take part in the cell. RXRs are required partners for a wide range of
432 other nuclear receptors, participating in cell responses to hormones, lipids and xenobiotics
433 [31]. Additionally, RXR can respond to ligands itself, although the presence of *bona fide*
434 endogenous ligands remains controversial [32-34].

435 Considering that SH-SY5Y cells express RXR α and RXR β , we performed silencing of each
436 isoform at Day 0 of differentiation of SH-SY5Y aiming at investigating their single functions
437 for RA signal transduction in neuronal context. Silencing of RXR α also led to decreased
438 levels of RXR β content, which seemed to be a consequence of RXR α downregulation *per*
439 *se* and not due to an eventual siRNA inespecificity. Such cross regulation between retinoid
440 receptors was expected and it has been previously reported [35], especially regarding
441 silencing of RXR isoforms since they broadly regulate gene transcription independently of
442 RA [31]. In turn, siRXRA and siRXRB transfection led to unaltered levels of RAR isoforms
443 at Day 0.

444 Altogether, our results showed that RXR α expression is required for RA signal transduction
445 in neuronal differentiation. siRXRA-transfected SH-SY5Y cells failed to undergo neuronal
446 differentiation in all aspects evaluated, from cell cycle arrest to neuronal markers expression
447 and induction of neurite outgrowth. It remains unclear, however, whether the general

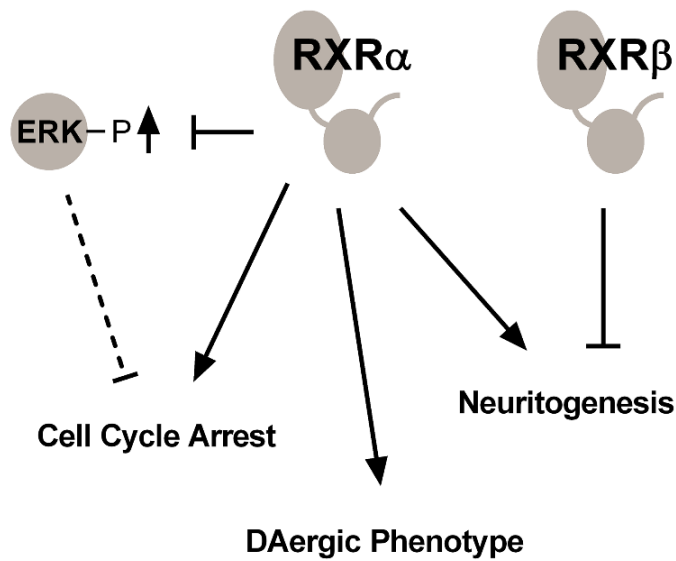
448 downregulation of RXRs induced by silencing of RXR α also participates in the observed
449 loss in differentiation capacity.

450 In fact, altered expression and function of RXR α are implicated in the development of
451 neoplasias [36]. Diminished RXR α expression and its proteolytic cleavage are associated
452 with a number of cancers [37-39], but loss in RXR α proteasomal degradation can also lead
453 to increased cell growth [40,41]. We found that silencing of RXR α also resulted in
454 overactivation of ERK1/2 independently of RA. Rapid phosphorylation of ERK1/2 by RA
455 at early stages of SH-SY5Y neuronal differentiation has been shown to be dependent on RS
456 production [9] and required for cell survival along the process [22]. However, aberrant
457 activation of ERK1/2 pathway is well known to contribute to cell proliferation and tumor
458 progression [42] and relapsed neuroblastomas frequently present high frequency of
459 activating mutations in MEK/ERK pathway [43]. Therefore, siRXR α -induced overactivation
460 of ERK1/2 provides evidence that RXRs can regulate extra-nuclear signaling events, and
461 may help to explain why altered levels of RXR α promotes cell growth. However, how RXR α
462 expression is connected to phosphorylation of ERK1/2 remains unknown.

463 Alternatively, RXR β emerged as a potential inhibitor of neuritogenesis in RA-mediated
464 neuronal differentiation. Transfecting siRXR β before RA treatment optimized the induction
465 of tau and synaptophysin, which are involved in axonal microtubule stability and synaptic
466 transmission, respectively. Besides that, siRXR β induced the acquisition of a neuron-like
467 morphology even in control cells. One possibility is that RXR β inhibitory activity can be
468 derived from an increased capacity to repress gene transcription by strongly interacting with
469 co-repressors, similarly to observations regarding RAR α isoform [44]. However, the
470 inhibitory effects of RXR β expression over neuritogenesis can also be related to cytoplasmic
471 signaling events, since RA-induced activation of kinase cascades have been also shown to
472 be required for neurite extension in neuroblastoma cells [22,45].

473 Although silencing of RXR β did not lead to impairment on cell cycle arrest or neuronal
474 parameters, the possibility that RXR β expression may be required for other effects induced
475 during differentiation must not be ruled out. In fact, its expression is upregulated at later
476 stages of differentiation, so it might be important for mature neurons. More studies regarding
477 the specific neuronal roles of RXR β are thus necessary.

478



479 **Fig. 8** RXR isoforms are distinctly required to cellular effects promoted by RA-mediated neuronal
 480 differentiation. RXR α expression is required for cell cycle arrest, induction of DAergic phenotype and
 481 neuritogenesis in SH-SY5Y cells, and also diminishes ERK1/2 overactivation which is involved with cell
 482 growth. Alternatively, RXR β expression restrains neuritogenesis
 483
 484

485 Accordingly, we showed that RXR α and RXR β distinctly participate in cellular processes
 486 induced by RA in SH-SY5Y cells and that they can even assume opposing roles for neuronal
 487 differentiation (as summarized in Fig. 8). However, whether single RXR isoforms exert such
 488 functions on a direct or indirect manner remains unknown. Similarly to this, RXR α and
 489 RXR β isoforms were previously reported to display specific and opposite roles in thyroid
 490 hormone receptors (TR) signaling pathways [46,47]. Therefore, detailed evaluation of
 491 distinct roles for RXR isoforms may not only contribute to clarifying RA molecular
 492 mechanisms during neuronal differentiation, but also provide new insights for molecular
 493 biology of nuclear receptors as a whole.

494

495 **Acknowledgments:** This study was supported by the Brazilian funds Conselho Nacional de
 496 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) #443514/2014-3 and #401260/2014-3,
 497 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) #16/2551-
 498 0000499-4 and 17/2551-0000984-3, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
 499 Superior (CAPES) and Propesq-UFRGS.

500

501 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

502

503 **References**

- 504 1. Janesick A, Wu SC, Blumberg B (2015) Retinoic acid signaling and neuronal
505 differentiation. *Cell Mol Life Sci* 72 (8):1559-1576. doi:10.1007/s00018-014-1815-9
- 506 2. Noy N (2010) Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu*
507 *Rev Nutr* 30:201–217. doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155509
- 508 3. Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the
509 nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:755-765. doi:10.1038/nrn2212
- 510 4. Samarut E, Rochette-Egly C (2012) Nuclear retinoic acid receptors: Conductors of the
511 retinoic acid symphony during development. *Mol Cell Endocrinol* 348:348–360.
512 doi:10.1016/j.mce.2011.03.025
- 513 5. Cañón E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A (2004) Rapid Effects of Retinoic Acid on
514 CREB and ERK Phosphorylation in Neuronal Cells. *Mol Biol Cell* 15 (12):5583–5592.
515 doi:10.1091/mbc.E04-05-0439
- 516 6. Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, Oliveira RB, Dal-Pizzol F, Izquierdo I,
517 Bevilaqua LRM, Moreira JCF (2006) Retinol induces the ERK1/2-dependent
518 phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen
519 species in cultured Sertoli cells. *Cell Signal* 18 (10):1685–1694.
520 doi:10.1016/j.cellsig.2006.01.008
- 521 7. Gelain DP, Pasquali MAdB, Careganto FF, Castro MAA, Moreira JCF (2012) Retinol
522 induces morphological alterations and proliferative focus formation through free radical-
523 mediated activation of multiple signaling pathways. *Acta Pharmacologica Sinica* 33:558–
524 567
- 525 8. García-Regalado A, Vargas M, García-Carrancá A, Aréchaga-Ocampo E, González-De
526 la Rosa CH (2013) Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of
527 retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. *Mol Cancer* 12:44-56.
528 doi:10.1186/1476-4598-12-44
- 529 9. Kunzler A, Zeidán-Chuliá F, Gasparotto J, Girardi CS, Klafke K, Petiz LL, Bortolin RC,
530 Rostirolla DC, Zanotto-Filho A, Pasquali MAdB, Dickson P, Dunkley P, Moreira JCF,
531 Gelain DP (2016) Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During
532 SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species
533 Production and Oxidative Stress. *Mol Neurobiol* 54 (9):6903-6916. doi:10.1007/s12035-
534 016-0189-4
- 535 10. Almeida VR, Vieira IA, Buendia M, Brunetto AT, Gregianin LJ, Brunetto AL, Klamt
536 F, Farias CBd, Abujamra AL, Lopez PLC, Roesler R (2017) Combined Treatments with a
537 Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells.
538 *Mol Neurobiol* 54 (10):7610-7619. doi:10.1007/s12035-016-0250-3

- 539 11. Korecka JA, Kesteren REV, Blaas E, Spitzer SO, Kamstra JH, Smit AB, Swaab DF,
540 Verhaagen J, Bossers K (2013) Phenotypic Characterization of Retinoic Acid
541 Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. PLoS ONE 8 (5):1-17.
542 doi:10.1371/journal.pone.0063862
- 543 12. Teppola H, Sarkanen J-R, Jalonen TO, Linne M-L (2015) Morphological
544 Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by
545 Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. Neurochem Res 41 (4):731-747.
546 doi:10.1007/s11064-015-1743-6
- 547 13. Schneider L, Giordano S, Zelickson BR, Johnson MS, Benavides GA, Ouyang X,
548 Fineberg N, Darley-USmar VM, Zhang J (2011) Differentiation of SH-SY5Y cells to a
549 neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress.
550 Free Radic Biol Med 51 (11):2007–2017. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.030
- 551 14. Pasquali MAB, Ramos VM, Albanus RDO, Kunzler A, Souza LHT, Dalmolin RJS,
552 Gelain DP, Ribeiro L, Carro L, Moreira JCF (2014) Gene Expression Profile of NF- κ B,
553 Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation
554 Mediated by Retinoic Acid. Mol Neurobiol 53 (1):423-435. doi:10.1007/s12035-014-8998-
555 9
- 556 15. Ramos VM, Zanotto-Filho A, Pasquali MAB, Klafke K, Gasparotto J, Dunkley P,
557 Gelain DG, Moreira JCF (2015) NRF2 Mediates Neuroblastoma Proliferation and
558 Resistance to Retinoic Acid Cytotoxicity in a Model of In Vitro Neuronal Differentiation.
559 Mol Neurobiol 53 (9):6124-6135. doi:10.1007/s12035-015-9506-6
- 560 16. Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram
561 Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem
562 72:248-254
- 563 17. Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity
564 screening. Nat Protoc 1 (3):1112–1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
- 565 18. Rana B, Veal GJ, Pearson ADJ, Redfern CPF (2002) Retinoid X receptors and retinoid
566 response in neuroblastoma cells. J Cell Biochem 86 (1):67–78. doi:10.1002/jcb.10192
- 567 19. Bour G, Lalevée S, Rochette-Egly C (2007) Protein kinases and the proteasome join in
568 the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. Trends Cell
569 Biol 17 (6):302-309. doi:10.1016/j.tcb.2007.04.003
- 570 20. Cosgaya JM, Garcia-Villalba P, Perona R, Aranda A (1996) Comparison of the Effects
571 of Retinoic Acid and Nerve Growth Factor on PC12 Cell Proliferation, Differentiation, and
572 Gene Expression. J Neurochem 66 (1):89-98
- 573 21. Coyle DE, Li J, Baccei M (2011) Regional Differentiation of Retinoic Acid-Induced
574 Human Pluripotent Embryonic Carcinoma Stem Cell Neurons. PLoS ONE 6 (1):e16174.
575 doi:10.1371/journal.pone.0016174

- 576 22. Miloso M, Villa D, Crimi M, Galbiati S, Donzelli E, Nicolini G, Tredici G (2004)
577 Retinoic Acid-Induced Neuritogenesis of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Is ERK
578 Independent and PKC Dependent. *J Neurosci Res* 75 (2):241–252. doi:10.1002/jnr.10848
- 579 23. Yang J, Wu C, Stefanescu I, Horowitz A (2017) Analysis of retinoic acid-induced
580 neural differentiation of mouse embryonic stem cells in two and three-dimensional
581 embryoid bodies. *J Vis Exp* 22 (122). doi:10.3791/55621
- 582 24. Sperling LE, Reis KP, Pozzobon LG, Girardi CS, Pranke P (2017) Influence of random
583 and oriented electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds on neural
584 differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biomed Mat Res A* 105 (5):1333–1345.
585 doi:10.1002/jbm.a.36012
- 586 25. Peinemann F, Dalen ECV, Enk H, Berthold F (2017) Retinoic acid postconsolidation
587 therapy for high-risk neuroblastoma patients treated with autologous haematopoietic stem
588 cell transplantation. *Cochrane Database Sys Rev* 25 (8).
589 doi:10.1002/14651858.CD010685.pub3
- 590 26. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M (2010) An In Vitro
591 Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological
592 and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *J Alzheimers Dis* 20 (4):1069-1082.
593 doi:10.3233/JAD-2010-091363
- 594 27. Carpentier A, Balitrand N, Rochette-Egly C, Shroot B, Degos L, Chomienne C (1997)
595 Distinct sensitivity of neuroblastoma cells for retinoid receptor agonists: evidence for
596 functional receptor heterodimers. *Oncogene* 15 (15):1805-1813.
597 doi:10.1038/sj.onc.1201335
- 598 28. Giannini G, Dawson MI, Zhang X-k, Thiele CJ (1997) Activation of Three Distinct
599 RXR/RAR Heterodimers Induces Growth Arrest and Differentiation of Neuroblastoma
600 Cells. *J Biol Chem* 272 (42):26693–26701
- 601 29. Balmer JE, Blomhoff R (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid*
602 *Res* 43:1773-1808. doi:10.1194/jlr.R100015-JLR200
- 603 30. Zhang J, Gao Y, Yu M, Wu H, Ai Z, Wu Y, Liu H, Du J, Guo Z, Zhang Y (2015)
604 Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cell Differentiation by Altering Both Encoding
605 RNA and microRNA Expression. *PLoS ONE* 10 (7):1-17.
606 doi:10.1371/journal.pone.0132566
- 607 31. Evans RM, Mangelsdorf DJ (2014) Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*
608 157 (1):255-266. doi:10.1016/j.cell.2014.03.012
- 609 32. Goldstein JT, Dobrzyn A, Clagett-Dame M, Pike JW, DeLuca HF (2003) Isolation and
610 characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor.
611 *Arch Biochem Biophys* 420 (1):185–193. doi:10.1016/j.abb.2003.09.034
- 612 33. Wolf G (2006) Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X
613 receptor? *Nutr Rev* 64 (12):532–538. doi:10.1301/nr.2006.dec.532–538

- 614 34. DeLera ÁR, Krezel W, Rühl R (2016) An Endogenous Mammalian Retinoid X
615 Receptor Ligand, At Last! *Chem Med Chem* 11:1027–1037. doi:10.1002/cmdc.201600105
- 616 35. Aggarwal S, Kim S-W, Cheon K, Tabassam FH, Yoon J-H, Koo JS (2006)
617 Nonclassical Action of Retinoic Acid on the Activation of the cAMP Response Element-
618 binding Protein in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* 17:566–575.
619 doi:10.1091/mbc.E05–06–0519
- 620 36. Zhang X, Zhou H, Su Y (2016) Targeting truncated RXR α for cancer therapy. *Acta*
621 *Biochim Biophys Sin* 48 (1):49–59. doi:10.1093/abbs/gmv104
- 622 37. Matsushima-Nishiwaki R, Shidoji Y, Nishiwaki S, Yamada T, Moriwaki H, Muto Y
623 (1996) Aberrant metabolism of retinoid X receptor proteins in human hepatocellular
624 carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 121 (2):179-190. doi:10.1016/0303-7207(96)03863-4
- 625 38. Zhong C, Yang S, Huang J, Cohen MB, Roy-Burman P (2003) Aberration in the
626 Expression of the Retinoid Receptor, RXR α , in Prostate Cancer. *Cancer Biol Ther* 2
627 (2):179-184
- 628 39. Ando N, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Tanaka T,
629 Moriwaki H (2007) Expression of retinoid X receptor α is decreased in 3'-methyl-4-
630 dimethylaminoazobenzene-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Oncol Rep* 18
631 (4):879-884. doi:10.3892/or.18.4.879
- 632 40. Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Adachi S, Sano T, Akita K, Moriwaki H,
633 Friedman SL, Kojima S (2001) Phosphorylation of Retinoid X Receptor α at Serine 260
634 Impairs Its Metabolism and Function in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 61
635 (20):7675–7682
- 636 41. Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL,
637 Moriwaki H, Okano Y (2002) Phosphorylation of Retinoid X Receptor Suppresses its
638 Ubiquitination in Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 35 (2):332-340.
639 doi:10.1053/jhep.2002.311164
- 640 42. Roberts PJ, Der C (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein
641 kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291–3310.
642 doi:10.1038/sj.onc.1210422
- 643 43. Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, Koster J, Daage LC, Diskin SJ, Schild L,
644 Bentahar NB, Bellini A, Chicard M, Lapouble E, Combaret V, Legoix-Né P, Michon J,
645 Pugh TJ, Hart LS, Rader JA, Attiyeh EF, Wei JS, Zhang S, Naranjo A, Gastier-Foster JM,
646 Hogarty MD, Asgharzadeh S, Smith MA, Auvil JMG, Watkins TBK, Zwijnenburg DA,
647 Ebus ME, Sluis PV, Hakkert A, Wezel EV, Schoot CE, Westerhout EM, Schulte JH,
648 Tytgat GA, Dolman MEM, Janoueix-Lerosey I, Gerhard DS, Caron HN, Delattre O, Khan
649 J, Versteeg R, Schleiermacher G, Molenaar JJ, Maris JM (2015) Relapsed neuroblastomas
650 show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet* 47 (8):864–871.
651 doi:10.1038/ng.3333

- 652 44. Gericke J, Ittensohn J, Mihály J, Álvarez S, Álvarez R, Töröcsik D, Lera ÁRd, Rühl R
653 (2013) Regulation of Retinoid-Mediated Signaling Involved in Skin Homeostasis by RAR
654 and RXR Agonists/Antagonists in Mouse Skin. PLoS ONE 8 (4):1-11.
655 doi:10.1371/journal.pone.0062643
- 656 45. Qiao J, Paul P, Lee S, Qiao L, Josifi E, Tiao JR, Chung DH (2012) PI3K/Akt and ERK
657 regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. Biochem Biophys
658 Res Commun 424 (3):421–426. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.125
- 659 46. Li D, Yamada T, Wang F, Vulin AI, Samuels HH (2004) Novel Roles of Retinoid X
660 Receptor (RXR) and RXR Ligand in Dynamically Modulating the Activity of the Thyroid
661 Hormone Receptor/RXR Heterodimer. J Biol Chem 279 (9):7427–7437.
662 doi:10.1074/jbc.M311596200
- 663 47. Decherf S, Seugnet I, Becker N, Demeneix BA, Clerget-Froidevaux M-S (2013)
664 Retinoic X receptor subtypes exert differential effects on the regulation of Trh
665 transcription. Mol Cell Endocrinol 381:115–123. doi:10.1016/j.mce.2013.07.016
- 666

Online Resource 1

Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation.

Molecular Neurobiology

Carolina Saibro Girardi¹, Diana Carolina Rostirolla¹, Fernanda Janini Mota Lini¹, Pedro Ozorio Brum¹, Jeferson Delgado¹, Camila Tiefensee Ribeiro¹, Luana Heimfarth¹, Alice Kunzler¹, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain¹

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil.

Correspondence: Daniel Pens Gelain. E-mail: dgelain@yahoo.com.br

Table 1. Primer sequences for qPCR. Forward and reverse primers user for amplification of cDNAs of interest, with the predicted amplicon sizes.

Gene	Primers	Amplicon (pb)
<i>B2M</i>	5' TGCTGTCTCCATGTTTGAT 5' TCTCCGCTCCCCACCTCTA	86
<i>ENO2</i>	5' CTGACAAAGTCCTGGTAGAGTG 5' GATCGTTATTGGCATGGATGTTG	138
<i>GAPDH</i>	5' AATCCCATCACCATCTTCCAG 5' TTCACACCCATGACGAACAT	194
<i>GNB2L</i>	5' GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG 5' GCTTGCAGTTAGCCAGGTTT	224
<i>RARA</i>	5' CGAGCAGGACACCATGAC 5' GCGAAGGCAAAGACCAGG	102
<i>RARB</i>	5' GTTTGCTAAACGTCTGCCTG 5' TCATGGTGTCTTGTCTGGG	131
<i>RARG</i>	5' ATGAAAATCACCGACCTCGG 5' TTTCAGGGTTCTCCAGCATG	121
<i>RXRA</i>	5' AGGACTGCCTGATTGACAAG 5' GACTCCACCTCATTCTCGTTC	142
<i>RXRB</i>	5' GACCTTACATACTCTTGCCGG 5' CATCCCCATCCTTGTCTTTC	160
<i>SYP</i>	5' AGACAGGGAACACATGCAAG 5' TCTCCTTAAACACGAACCACAG	123
<i>TAU</i>	5' GACAGAGTCCAGTCGAAGATTG 5' AGGAGACATTGCTGAGATGC	196

Table 2. Primary antibodies. List of primary antibodies targets with respective manufacturers and catalog numbers used for immunoassays.

Protein	Manufacturer	Catalog nr.
ERK1/2	Cell Signaling	9102S
Neurofilament-L	Cell Signaling	2837
p-ERK1/2	Cell Signaling	9106S
RAR α	Santa Cruz Biotechnology	sc-551
RAR β	Santa Cruz Biotechnology	sc-552
RAR γ	Abcam	ab97569
RXR α	Cell Signaling	5388S
RXR β	Cell Signaling	8715S
RXR γ	Cell Signaling	5629S
Synaptophysin	Cell Signaling	4329S
Tau	Cell Signaling	4019S
TH	Cell Signaling	2792S
β 3-Tubulin	Invitrogen	480011
β -Actin	Sigma-Aldrich	A1978

Online Resource 2

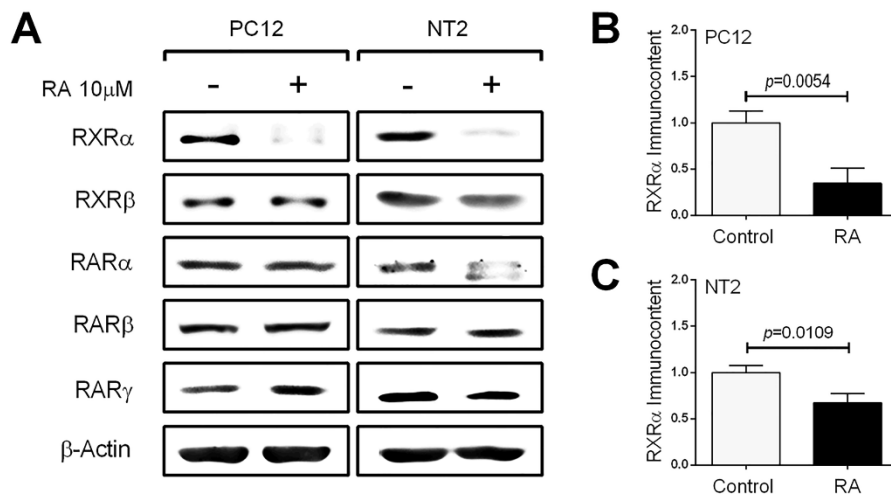
Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation.

Molecular Neurobiology

Carolina Saibro Girardi¹, Diana Carolina Rostirolla¹, Fernanda Janini Mota Lini¹, Pedro Ozorio Brum¹, Jeferson Delgado¹, Camila Tiefensee Ribeiro¹, Luana Heimfarth¹, Alice Kunzler¹, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain¹

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil.

Correspondence: Daniel Pens Gelain. E-mail: dgelain@yahoo.com.br



Immunocontent of retinoid receptors in PC12 and NT2 cells after RA induction. **A** PC12 and NT2 representative western blot of RXR and RAR isoforms in control (-) or RA-treated (+) cells after one day of induction. Immunocontent levels of RXR α in **B** PC12 and **C** NT2 cells treated with RA compared to control. β -Actin was used as internal control and results are expressed in terms of RR/ β -Actin. Immunocontents provided by densitometry analysis. Bars at mean \pm SD of three independent experiments analyzed by Student's t test, with the respective p values indicated.

Online Resource 3

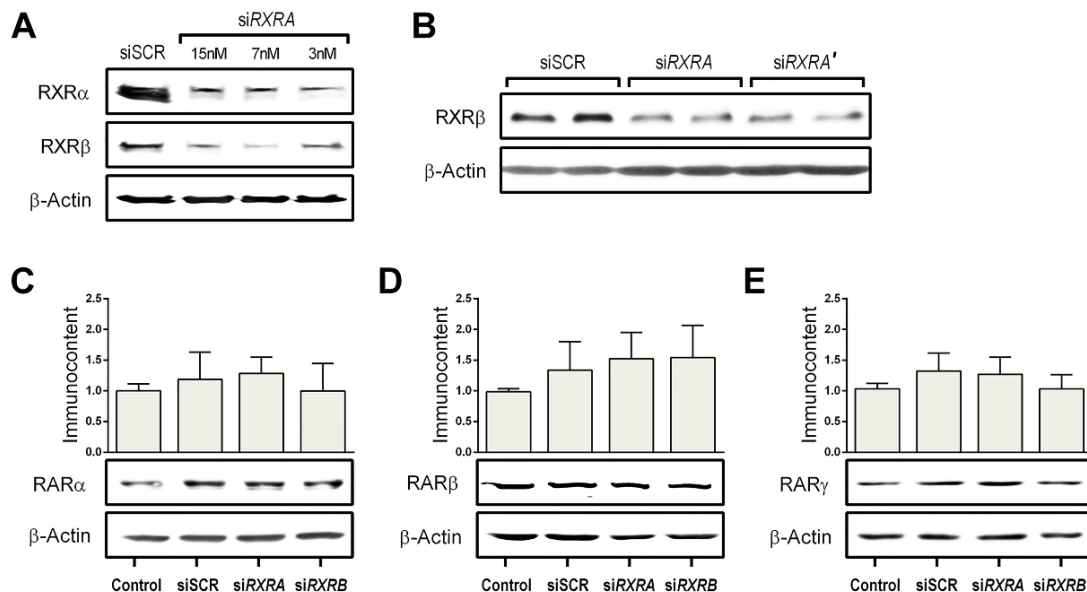
Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation.

Molecular Neurobiology

Carolina Saibro Girardi¹, Diana Carolina Rostirolla¹, Fernanda Janini Mota Lini¹, Pedro Ozorio Brum¹, Jeferson Delgado¹, Camila Tiefensee Ribeiro¹, Luana Heimfarth¹, Alice Kunzler¹, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain¹

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil.

Correspondence: Daniel Pens Gelain. E-mail: dgelain@yahoo.com.br



Immunocontent of retinoid receptors after two days of transfection of SH-SY5Y cells. **A** Representative western blot of RXR α and RXR β in cells transfected with variable concentrations of siRXRA compared to siSCR. **B** Representative western blot of RXR β in cells transfected with siRXRA containing variable sequences (siRXRA and siRXRA') at final concentrations of 30nM, compared to siSCR. **C-E** Western blot and respective densitometric analysis of RAR α , RAR β , and RAR γ , respectively, in siSCR, siRXRA and siRXRB-transfected cells (all at 30nM final concentrations). β -Actin was used as internal control and results are relatively to β -actin immunocontent. Bars at mean \pm SD of three independent experiments.

Online Resource 4

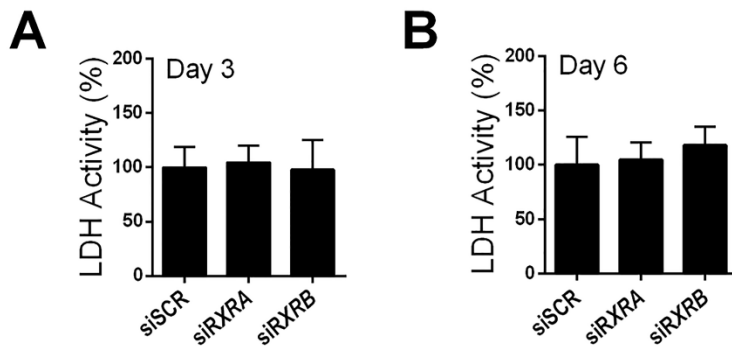
Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation.

Molecular Neurobiology

Carolina Saibro Girardi¹, Diana Carolina Rostirolla¹, Fernanda Janini Mota Lini¹, Pedro Ozorio Brum¹, Jeferson Delgado¹, Camila Tiefensee Ribeiro¹, Luana Heimfarth¹, Alice Kunzler¹, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain¹

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil.

Correspondence: Daniel Pens Gelain. E-mail: dgelain@yahoo.com.br



Cell membrane leakage during neuronal differentiation of transfected cells. Supernatant lactate dehydrogenase (LDH) activity (in arbitrary units) at days **A** 3 and **B** 6 of RA-induced differentiation in cells silenced with siRXRA and siRXRB, relative to siSCR. Bars at mean \pm SD of six independent experiments.

3. CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

De acordo com os objetivos propostos, os resultados apresentados fornecem as seguintes conclusões:

- A. Estabelecer os parâmetros induzidos pela diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.
- A diferenciação com AR promove parada no ciclo celular em SH-SY5Y.
 - A diferenciação com AR induz modificações morfológicas características de neurônios maduros e a regulação positiva dos marcadores neuronais enolase 2, sinaptofisina e β 3-tubulina.
 - As células SH-SY5Y diferenciadas com AR aumentam a expressão do marcador de fenótipo catecolaminérgico TH.
 - O controle com SFB 1% também promove parada no ciclo celular em SH-SY5Y, mas em menor efeito quando comparado à diferenciação com AR. No entanto, o grupo controle não se mostra capaz de alterar a expressão de neuromarcadores.
- B. Avaliar a modulação dos níveis de expressão das diferentes isoformas de RXR e RAR durante a diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.
- As células SH-SY5Y proliferativas expressam RXR α e RXR β , além de todas as isoformas de RARs.
 - O AR regula os níveis de transcritos e de proteína de forma diferencial, tanto em relação aos RXRs quanto aos RARs.
 - RXR α e RXR β são variavelmente regulados pelo AR ao longo da diferenciação neuronal de SH-SY5Y; eles têm seu imunoconteúdo diminuído em etapas iniciais da diferenciação – apesar de níveis inalterados de transcritos no mesmo estágio – mas sua expressão de mRNA é aumentada em estágios avançados de diferenciação.

- Os RARs têm sua expressão regulada positivamente tanto em estágios iniciais quanto em estágios avançados da diferenciação das células SH-SY5Y; porém, apenas RAR β têm seus níveis de proteína aumentados.
 - A redução no imunoconteúdo de RXR α em resposta ao AR é conservado também nos modelos *in vitro* de diferenciação neuronal PC12 e NT2.
- C. Determinar os efeitos do silenciamento isolado das isoformas RXR α e RXR β para os parâmetros induzidos pela diferenciação neuronal mediada pelo AR nas células SH-SY5Y.
- Os níveis de expressão de RXR α influenciam também a expressão de RXR β .
 - A expressão de RXR α no Dia 0 da diferenciação neuronal é necessária para a indução de parada no ciclo celular e para a adoção de parâmetros neuronais induzidos pelo AR.
 - A expressão de RXR α afeta a ativação da via não genômica de ERK1/2.
 - A expressão de RXR β no Dia 0 da diferenciação neuronal não mostra-se necessária para os parâmetros induzidos pelo AR; pelo contrário, o seu silenciamento favorece a neuritogênese nas células SH-SY5Y.
 - As isoformas RXR α e RXR β não são sinônimas na diferenciação neuronal pelo AR e sua expressão afeta de forma diferencial os processos celulares regulados pela molécula em SH-SY5Y.

3.1. Diferenciação da Linhagem de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y como Modelo de Estudo das Vias de Sinalização do Ácido Retinoico

As células SH-SY5Y são frequentemente utilizadas no estado proliferativo como modelos úteis para o estudo de mecanismos do metabolismo tumoral de neuroblastomas (Ramos *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017; Westerlund *et al.*, 2017), e no estado diferenciado como modelo de neurotoxicidade (Cheung *et al.*, 2009). O AR talvez seja o morfógeno mais utilizado para induzir a transição entre o estado proliferativo e o diferenciado na linhagem SH-SY5Y, dada a eficiência do seu tratamento em promover a adoção de fenótipo neuronal nessas células; no entanto,

ainda restam dúvidas a respeito dos mecanismos pelos quais o AR é capaz de induzir esses efeitos tanto em SH-SY5Y quanto em outras linhagens. Por esse motivo, as células SH-SY5Y são também amplamente empregadas em estudos que buscam entender os mecanismos moleculares da diferenciação pelo AR e, assim, o modelo pode ser útil sob diferentes aspectos. Por um lado, se considerarmos que retinoides são utilizados no tratamento de neuroblastomas (Reynolds *et al.*, 2003), mas que muitas linhagens são resistentes a tal tratamento (Westerlund *et al.*, 2017), o modelo de diferenciação de SH-SY5Y com AR é útil para a compreensão de mecanismos de resistência tumoral. Por outro lado, as células SH-SY5Y mostram-se capazes de adotar diversas características fenotípicas observadas em neurônios maduros diante do tratamento com AR e, somado ao fato de que o seu cultivo é simples e facilmente reprodutível, elas tornam-se um modelo interessante para a compreensão dos mecanismos que permitem que células indiferenciadas adotem o fenótipo neuronal mediante indução por AR.

Na literatura relativa à diferenciação mediada por AR das células SH-SY5Y, entretanto, ocorrem uma série de diferentes protocolos de cultivo, assim como parâmetros de diferenciação variáveis. Com isso, a determinação do fenótipo específico adotado pelas células SH-SY5Y após a diferenciação ainda é alvo de caracterizações na literatura (Lopes *et al.*, 2010; Korecka *et al.*, 2013; Pasquali *et al.*, 2014; Filograna *et al.*, 2015; Teppola *et al.*, 2015). Esses estudos são fundamentais para estabelecer parâmetros de diferenciação da linhagem SH-SY5Y, assim como para validar diferentes protocolos. Dessa forma, o estudo atual traz a caracterização dos efeitos induzidos pelo presente protocolo de diferenciação neuronal mediado pelo AR das células SH-SY5Y que, posteriormente, poderão ser empregados na avaliação de intermediários moleculares que possibilitam tais efeitos.

Foi visto que o protocolo de diferenciação com AR, com a contribuição do cultivo em concentrações reduzidas de soro, induziu parada no ciclo celular nos estágios intermediários do processo. Em estágios mais avançados da diferenciação o protocolo provocou a regulação positiva de marcadores neuronais: houve aumento da transcrição dos genes para enolase 2 e sinaptofisina, além de aumento no conteúdo proteico de TH e de β 3-tubulina. Por fim, as modificações morfológicas

características da diferenciação neuronal da linhagem também puderam ser observadas.

Protocolos semelhantes já demonstraram anteriormente a redução na proliferação celular nas células SH-SY5Y diante do tratamento com AR nas concentrações de 10 μ M (Kunzler *et al.*, 2016) e 100 μ M (Almeida *et al.*, 2017). Além das claras modificações morfológicas, a regulação positiva de marcadores de neurônios maduros, como NeuN (Lopes *et al.*, 2010), MAP2 (Schneider *et al.*, 2011), NF-L (Teppola *et al.*, 2015) e β 3-tubulina (Filograna *et al.*, 2015) encontra-se relatada na literatura, com doses e períodos de exposição semelhantes aos utilizados no presente estudo. O aumento na presença de sinaptofisina assim como a reciclagem de vesículas sinápticas indicam a presença de processos sinápticos funcionais nas células SH-SY5Y diferenciadas com AR (Sarkanen *et al.*, 2007; Teppola *et al.*, 2015). O fenótipo dopaminérgico também é amplamente explorado; a superexpressão de TH, em especial, é comumente citada (Lopes *et al.*, 2010; Frota-Junior *et al.*, 2011 ; Kunzler *et al.*, 2016), e a síntese e o armazenamento de dopamina mostram-se aumentados nas células SH-SY5Y tratadas com AR (Korecka *et al.*, 2013). Além disso, também é observada a diminuição da presença de nestina (Lopes *et al.*, 2010), um clássico marcador de precursores neurais.

Assim, a presente caracterização valida o protocolo empregado na diferenciação neuronal da linhagem SH-SY5Y e vai ao encontro de demonstrações anteriores da capacidade da linhagem em transitar de um estado proliferativo e indiferenciado, semelhante ao tumoral, para um fenótipo diferenciado e característico de neurônios dopaminérgicos maduros diante da longa exposição ao AR. Análises de parâmetros funcionais, como produção de dopamina e disparo de potenciais de ação, por exemplo, também seriam necessários para estabelecer as células SH-SY5Y diferenciadas como um modelo neuronal funcional. De qualquer forma, a caracterização estabelece parâmetros de diferenciação úteis para a linhagem SH-SY5Y, assim como demonstra que o cultivo em SFB 1% tem efeito isolado sobre a parada no ciclo celular, mas não sobre a indução de marcadores neuronais.

3.2. Modulação dos Níveis dos Receptores de Retinoides pelo Ácido Retinoico na Diferenciação Neuronal

Durante a década de 90, após a caracterização dos receptores de retinoides, diversos estudos buscaram definir o padrão de expressão gênica desses receptores nucleares nos tecidos de mamíferos. Observou-se que os RXRs são amplamente expressos, tanto ao longo do desenvolvimento quanto nos organismos adultos, mas que ocorrem disparidades no padrão de expressão quando levadas em consideração as diferentes isoformas (revisado por Germain *et al.*, 2006b). A isoforma RXR β tem expressão largamente distribuída e pode ser detectada na maior parte dos tecidos. RXR α também é amplamente presente em muitos tecidos e é a isoforma de RXR mais expressa na pele e no fígado. Já RXR γ tem padrão de expressão mais restrito aos músculos, à hipófise e a determinadas regiões do sistema nervoso. Os RARs, por sua vez, também apresentam padrões variados de expressão ao longo do desenvolvimento (disponível na revisão de Germain *et al.*, 2006a). RAR α encontra-se expresso em uma variedade de tecidos, enquanto RAR β e RAR γ têm distribuição mais restrita.

Ao mesmo tempo, desde a caracterização desses receptores foram realizados diversos estudos *in vitro* para verificar de que maneira o próprio AR poderia modular a expressão dos seus mediadores celulares, o que poderia também fornecer algumas informações sobre qual a importância de cada isoforma para os efeitos do AR. A modulação de RARs pelo AR encontra-se explorada de forma vasta na literatura, em linhagens de hepatoma (Thé *et al.*, 1989; Wan *et al.*, 1998), melanoma (Clifford *et al.*, 1990), carcinoma (Wu *et al.*, 1992; Cheung *et al.*, 2000; Zechel, 2005), células linfoides (Ballow *et al.*, 2003), preadipócitos (Kamei *et al.*, 1993) e neuroblastomas (Clagett-Dame *et al.*, 1993; Lovat *et al.*, 1993; Redfern *et al.*, 1994; Carpentier *et al.*, 1997). O estudo da expressão de RXRs, apesar de menos explorada, também conta com caracterizações em hepatoma (Wan *et al.*, 1998), carcinoma (Wan *et al.*, 1994; Cheung *et al.*, 2000; Zechel, 2005) e neuroblastoma (Carpentier *et al.*, 1997; Rana *et al.*, 2002).

Diante de todas essas caracterizações presentes na literatura, o intuito principal do presente estudo foi, em relação à modulação dos receptores de

retinoides induzida pelo AR, traçar um panorama geral do padrão de expressão das diferentes isoformas no presente protocolo de diferenciação neuronal da linhagem SH-SY5Y; ou seja, definir quais isoformas são expressas, quais as alterações que ocorrem inicialmente em resposta ao AR, como se encontra a expressão das isoformas nas células diferenciadas em comparação com as proliferativas e se o cultivo em concentrações reduzidas de SFB tem também efeitos sobre a expressão das mesmas.

Assim, foi realizada a caracterização dos níveis dos receptores de retinoides nas células SH-SY5Y, as isoformas RXR α , RXR β , RAR α , RAR β e RAR γ em diferentes estágios de diferenciação neuronal pelo AR. Semelhante com observações anteriores (Rana *et al.*, 2002), foi visto que nas células SH-SY5Y proliferativas as isoformas RXR α e RXR β apresentam-se expressas, enquanto a isoforma RXR γ não foi detectada – nem mesmo após a indução com AR. Em relação aos RARs, observamos também que, em níveis proteicos, as células proliferativas expressam em abundância as isoformas RAR α e RAR γ , enquanto RAR β encontra-se fracamente presente na ausência de AR, também de forma semelhante ao observado em estudos prévios com neuroblastoma (Carpentier *et al.*, 1997).

A expressão de ambos os genes para RXRs manteve-se inalterada nos primeiros estágios da diferenciação com AR (Dia 1); porém, nas células diferenciadas, a expressão das isoformas passa a ser positivamente regulada. A modulação de RXRs em estágio avançados da diferenciação neuronal, inexplorada até então em linhagens de neuroblastoma, sugere que a expressão de ambas as suas isoformas desempenha papéis importantes nesse estágio do processo. No caso do gene *RXRA*, curiosamente, essa regulação positiva nas células tratadas com AR por sete dias ocorre em contraposição à diminuição da expressão observada no grupo controle. Esse fenômeno indica que a expressão dessa isoforma, além de regulada direta ou indiretamente pelo longo período de exposição ao AR, pode também ser modulada pela disponibilidade de nutrientes e fatores de crescimento.

A expressão da isoforma RAR β é aumentada em grandes proporções diante do tratamento com AR, e esse aumento persiste ao longo de toda a diferenciação. Com RAREs caracterizados na sua região promotora ainda no início dos estudos com receptores de retinoides (Thé *et al.*, 1990), o gene *RARB* é atualmente um clássico marcador da atividade transcricional dos heterodímeros de RAR/RXR em diversas linhagens (Balmer e Blomhoff, 2002). Em neuroblastoma, muitos trabalhos mostraram a indução da expressão de RAR β , mas em relação aos demais RARs as evidências *in vitro* de regulação pelo AR não são consensuais. Análises semiquantitativas de transcritos indicaram por vezes o aumento apenas de RAR β , mas não de RAR α ou RAR γ (Clagett-Dame *et al.*, 1993; Lovat *et al.*, 1993; Redfern *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 2017) e, por outras vezes, o aumento também das demais isoformas (Carpentier *et al.*, 1997; Giannini *et al.*, 1997). A presente caracterização por RT-qPCR, assim, auxilia no estabelecimento de que todos os RARs têm expressão positivamente regulada pelo AR na diferenciação neuronal, sendo RAR β a isoforma superexpressa com maior intensidade.

O AR pode regular a expressão dos seus mediadores moleculares de diversas formas. Há RAREs bem estabelecidos nas regiões promotoras dos três genes para RARs; mais especificamente, a expressão dos subtipos gerados por uso alternativo de promotores *RARA2*, *RARB2* e *RARG2* pode ser regulada por regiões responsivas (Balmer e Blomhoff, 2002). Para RXRs, no entanto, restam dúvidas a respeito da capacidade de os heterodímeros RAR/RXR regularem diretamente a sua expressão. Mesmo que não estejam bem descritos RAREs nos promotores mínimos de RXRs (Balmer e Blomhoff, 2002), é possível que regiões regulatórias distais modulem a expressão dos mesmos dada a capacidade dos RAREs em atuar como *enhancers*. De qualquer forma, a sua regulação também pode se dar de forma indireta. O AR regula a expressão de diversos fatores de transcrição (Balmer e Blomhoff, 2002) assim como de microRNAs (Zhang, J. *et al.*, 2015), além de exercer modulação epigenética. Por fim, é necessário considerar que os mecanismos não-clássicos do AR, independentes de transcrição, podem também afetar a presença dos receptores de retinoides na célula.

Em decorrência das descobertas acerca de mecanismos de sinalização não-genômica, muitos estudos buscaram também entender como eventos

citoplasmáticos poderiam influenciar a disponibilidade e a atividade dos já clássicos mediadores do AR. Esses estudos apontaram, em grande parte, que esses eventos não genômicos atuam regulando a degradação proteossomal dos receptores de retinoides (revisado por Bour *et al.*, 2007; Tanoury *et al.*, 2013; Piskunov *et al.*, 2014), e implicam no fato de que a compreensão da modulação desses receptores deve considerar, além de modificações transcricionais, possíveis modificações nos níveis de proteína dependentes de degradação.

A presente caracterização por *western blot* dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação com AR demonstrou que, nas células SH-SY5Y, o AR também modula os níveis proteicos dos receptores de retinoides, mas com nítidas diferenças quando comparado à sua modulação transcricional. O imunoconteúdo de RAR α e RAR γ manteve-se sem alterações significativas ao longo de toda a diferenciação, mesmo com os níveis de transcritos dessas isoformas regulados positivamente pelo AR. No caso de RXR β , há um aumento claro nos níveis de proteína já no primeiro dia de tratamento, mas ele nem se compara à indução de mais de 100 vezes da transcrição observada para o gene *RARB*. Já em relação aos RXRs, foi observada inclusive uma diminuição no imunoconteúdo tanto de RXR α quanto de RXR β nas células com um dia de tratamento com AR quando comparadas às células proliferativas, mesmo diante dos níveis inalterados de transcritos dessas isoformas. Esses fenômenos podem ser explicado pela já bem estabelecida ativação de degradação proteossomal desses receptores em resposta ao AR; entretanto, a contribuição desse fenômeno para a sua transdução de sinal e, conseqüentemente, para os seus efeitos celulares, persiste como um alvo de discussão.

Os modelos atuais relativos à dinâmica da regulação gênica exercida pelos dímeros RAR/RXR consideram que a degradação proteossomal desses receptores tem papel importante para o fim do estímulo ao início de transcrição dos genes alvo (Bour *et al.*, 2007) e, assim, a degradação proteica dos receptores de retinoides pode ter papel importante na limitação das respostas transcricionais induzidas pelo AR. No modelo de diferenciação neuronal em questão, essa limitação poderia exercer diferentes funções. Ela pode refletir a necessidade de reciclagem constante do conteúdo dos fatores transcricionais em eventos biológicos, tais quais a

diferenciação neuronal, que envolvem a ativação orquestrada de programas de expressão gênica específicos em cada etapa do processo. Se considerarmos também que a diferenciação neuronal mediada pelo AR trata-se de um fenômeno que envolve grande estresse celular, e que, além de promover parada no ciclo celular e diferenciação, os dímeros RAR/RXR atuam promovendo apoptose em determinados contextos (revisado por Noy, 2010), é possível considerar que a limitação das respostas transcricionais dos heterodímeros pode ser importante para a promoção de sobrevivência celular. Além disso, levando em conta que as células SH-SY5Y tratam-se de um modelo derivado de neuroblastoma, é preciso considerar também que o fenômeno observado corresponda a um desequilíbrio nas vias de sinalização que levam à degradação dos receptores de retinoides e, assim, caracterize um mecanismo de resistência tumoral aos efeitos do AR. Por fim, a degradação dos receptores de retinoides pode ter efeitos ainda sobre a participação dos mesmos em vias citoplasmáticas e independentes de transcrição, já que eles também atuam intermediando a ativação de cascatas de cinases (Bour *et al.*, 2007).

São necessários, no entanto, mais estudos para estabelecer o proteassomo como agente regulatório nesse modelo de diferenciação neuronal, assim como para definir o papel da degradação dos receptores de retinoides nesse contexto. A compreensão da maneira com a qual o AR regula a presença dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação, pela soma de mecanismos de modulação tanto transcricional quanto do conteúdo proteico, contribuirá para entender como cada isoforma é requisitada em cada etapa do processo.

Especificamente em relação aos RXRs, a caracterização dos seus níveis de proteína durante a diferenciação neuronal das células SH-SY5Y trouxe um resultado inusitado: as isoformas RXR α e RXR β , presentes nas células proliferativas no Dia 0, têm seus níveis diminuídos em cerca de 50% nas etapas iniciais da diferenciação neuronal pelo AR. Com o intuito de verificar se a diminuição do conteúdo de RXRs é conservada em outros modelos de diferenciação neuronal sensíveis ao AR, foram avaliadas as linhagens PC12 e NT2. Nelas, o tratamento de 24 h com AR induziu a redução do imunoc conteúdo de RXR α .

A diminuição dos níveis proteicos da isoforma em células NT2 após um dia de diferenciação com AR 10 μ M já foi previamente observada (Cheung *et al.*, 2000), e seus níveis passam a ser regulados positivamente em estágios mais avançados do processo. Em cultura primária de células de Schwann, as células gliais do sistema nervoso periférico, foi observado que a isoforma RXR γ , expressa nesse tipo celular, também é regulada negativamente pelo AR (Latasa e Cosgaya, 2011), mas isso ocorreu tanto a nível de transcritos quanto de proteína. Estudos em neuroblastoma, no entanto, não observaram a mesma diminuição no imunoconteúdo das isoformas de RXRs (Carpentier *et al.*, 1997; Rana *et al.*, 2002). Resta, assim, que sejam realizados mais trabalhos para investigar de que forma a regulação negativa de RXRs é conservada diante do tratamento com AR no contexto neuronal, seja em modelos derivados de células neoplásicas ou não.

Da mesma forma, a obtenção de respostas para entender qual a função desse fenômeno para a diferenciação também é necessária. O perfil variável de expressão dos RXRs ao longo do processo demonstra que a presença das suas isoformas pode desempenhar papéis tempo dependentes para a diferenciação pelo AR. De qualquer forma, a compreensão da função dessa modulação durante a diferenciação neuronal deve, obrigatoriamente, considerar o fato de que os RXRs são parceiros de heterodimerização necessários a diversos outros receptores nucleares. Isso implica, portanto, no fato de que a regulação dos mesmos pelo AR afetará a habilidade da célula a responder a uma variedade de outros fatores.

3.3. Efeito do Silenciamento Isolado das Isoformas de RXRs para a Diferenciação Neuronal Mediada pelo Ácido Retinoico

A busca pelas funções dos receptores de retinoides foi, desde a caracterização dos mesmos, um tema de constante debate na literatura. Os RARs tornaram-se bem estabelecidos como os principais mediadores do AR, atuando como os seus receptores diretos. Em relação ao papel dos RXRs, no entanto, persistem diversos questionamentos. Além disso, a presença das diversas isoformas de receptores de retinoides acrescenta ainda mais complexidade na busca pela compreensão das suas funções.

Uma das formas de buscar respostas acerca das funções dos receptores de retinoides foi por meio da geração de animais com deleções nos genes das diferentes isoformas (Germain *et al.*, 2006b; Germain *et al.*, 2006a; Mark *et al.*, 2006). Os camundongos *knockout* para RAR α , para RAR β ou para RAR γ são viáveis, mas apresentam deficiências diversas que em geral correspondem a também às anormalidades observadas no quadro de SDVA. A deleção de RXR α , no entanto, leva à morte prematura do feto – possivelmente em função de falha cardíaca – com malformações também típicas de SDVA. A deleção de RXR β leva à morte de 50% dos fetos, e os que sobrevivem também apresentam malformações diversas, enquanto animais *knockout* para o gene de RXR γ são todos viáveis, mas também deficientes. Esses estudos reforçam a noção de que existem funções específicas para as diferentes isoformas de receptores de retinoides e auxiliaram na compreensão das mesmas, mas também indicam a presença de funções redundantes entre elas – o que não é surpreendente, dado que as diferentes isoformas surgiram a partir de um ancestral comum. Muitas das evidências em relação à redundância de isoformas, no entanto, podem ser geradas de maneira artefactual nos estudos de *knockout* gênico, e podem não representar as funções que as isoformas dos receptores de retinoides assumem originalmente (Germain *et al.*, 2006a). Além disso, a avaliação de muitas das funções célula-específicas pode ficar comprometida no estudo de animais *knockout*. Sendo assim, os conhecimentos acerca das funções isoladas das isoformas para a função neuronal são restritos, e abordagens que envolvam a deleção ou silenciamento durante um período específico de tempo e em tipos celulares definidos são necessários para auxiliar na obtenção dessas respostas. Nesse contexto, os estudos *in vitro* são de grande utilidade.

A maior parte das tentativas de entender o papel de cada isoforma na sinalização do AR em cultivos celulares consiste, no entanto, na utilização de ligantes e inibidores isoforma-específicos, principalmente em relação aos RARs. Muitas abordagens farmacológicas foram desenvolvidas para modular a atividade dos receptores de retinoides desde a caracterização dos mesmos: para as isoformas de RARs, são muitos os retinoides sintéticos e os antagonistas específicos; no caso dos RXRs, no entanto, a maior parte dos compostos não é

isoforma-específica (Maire *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2012). Esses estudos demonstraram que as três isoformas de RARs desempenham funções isoladas para os efeitos do AR em linhagens de carcinoma (Chiba, H *et al.*, 1997; Chiba, Hideki *et al.*, 1997; Zechel, 2005) e de neuroblastoma (Giannini *et al.*, 1997). A utilização de ligantes específicos de RXRs, no entanto, é pouco informativa em relação ao papel desses fatores como parceiros de heterodimerização dos RARs e reguladores das suas respostas. Apesar disso há indícios de que, apesar de a ativação dos heterodímeros de RAR/RXR estar subordinada à presença de ligantes de RARs, o tratamento conjunto de AR e ligantes específicos de RXRs tem efeito sinérgico na ativação do heterodímero (Minucci *et al.*, 1997). Além disso, ligantes de RXRs mostram-se capazes de regular genes responsivos ao AR por vias ainda desconhecidas (Széles *et al.*, 2010). Essas observações chamam atenção para a possibilidade de que, no contexto fisiológico, a ativação de RXRs por possíveis ligantes endógenos também contribua para a sinalização do AR, e sugerem a possibilidade da utilização conjunta de AR e ligantes de RXRs para fins clínicos.

Diante das informações limitadas a respeito das funções isoforma-específica dos RXRs para os efeitos do AR no contexto neuronal, o presente objetivo foi compreender qual o papel das duas isoformas expressas nas células SH-SY5Y, RXR α e RXR β , para a transdução de sinal do AR na diferenciação neuronal dessa linhagem. Para isso, foi realizado o silenciamento transitório de cada uma delas por meio de transfecção com siRNA, seguida da diferenciação neuronal com o AR. Assim, o intuito foi definir, mais especificamente, qual a importância da expressão de cada uma das isoformas nos primeiros estágios da indução com AR para a progressão no ciclo celular, para a indução de parâmetros neuronais e para a ativação de vias de cinases (a exemplo das respostas rápidas ao AR). Não é possível afirmar por meio da metodologia de silenciamento gênico, no entanto, se os efeitos celulares observados em resposta à transfecção ocorrem (i) como consequência direta da diminuição da presença das isoformas ou se (ii) como efeito indireto do silenciamento, ocasionados por intermédio de alterações em outros fatores celulares.

Foi observado que, a princípio, o silenciamento transitório (em cerca de 80%) dessas isoformas não resultou em prejuízos para a viabilidade ou para a morfologia

das células SH-SY5Y proliferativas. No entanto, o silenciamento resultou em alterações não só nos níveis da proteína alvo; no caso da transfecção com siRXRA, foi observada a diminuição também do imunoconteúdo de RXR β em cerca de 50% – mesmo em concentrações mínimas de siRXRA ou com a transfecção de diferentes sequências com o mesmo alvo. É de se esperar que os níveis de um receptor de retinoides afetem a expressão de outro, dada a sabida possibilidade de inter-regulação entre eles (Aggarwal *et al.*, 2006). Nenhum dos silenciamentos, no entanto, mostrou-se capaz de afetar a presença das isoformas de RARs.

Apesar de neutros para as células proliferativas, os silenciamentos tiveram consequências para a diferenciação das células SH-SY5Y após a transfecção. Os efeitos do silenciamento de RXR α e RXR β mostraram-se distintos e, em alguns aspectos, até mesmo opostos; essas observações apontam para o fato de que, na diferenciação neuronal pelo AR, a expressão das isoformas de RXRs não tem função sinônima.

O silenciamento da isoforma RXR α durante os primeiros momentos da indução com AR comprometeu a capacidade das células SH-SY5Y em responder à diferenciação, em todos os parâmetros analisados. Esses resultados evidenciam a necessidade da expressão de RXR α para os principais efeitos do AR em neuroblastoma: a parada no ciclo celular acompanhada da adoção de características neuronais. Em linhagem de carcinoma, estudos anteriores fizeram observações semelhantes e demonstraram que a deleção do gene de RXR α induziu resistência à diferenciação e parada no ciclo celular induzidos pelo AR (Clifford *et al.*, 1996; Chiba, Hideki *et al.*, 1997).

Alterações na disponibilidade e na função de RXR α têm sido, inclusive, relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias. A redução da presença da isoforma, relacionada por vezes à indução de fosforilações, de clivagens ou de translocações, estão relacionadas à progressão tumoral em queratinócitos (Chakravarti *et al.*, 2007; Hyter *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011), em carcinoma da tireoide (Takiyama *et al.*, 2004), em câncer de próstata (Zhong *et al.*, 2003) e em hepatocarcinoma (Matsushima-Nishiwaki *et al.*, 1996; Ando *et al.*, 2007). Também em hepatocarcinoma, no entanto, a perda da capacidade da célula em promover

degradação proteossomal de RXR α também mostra-se capaz de promover proliferação celular (Matsushima-Nishiwaki *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2002). Assim, a maneira pela qual os níveis de RXR α afetam o crescimento celular ainda precisa ser melhor esclarecida, e pode auxiliar na compreensão da função da modulação variável da isoforma ao longo da diferenciação mediada pelo AR em modelos neuronais.

O presente estudo somado às evidências na literatura reforça a ideia de que a isoforma RXR α é fundamental para a transdução de sinal do AR. Se a incapacidade das células em responder de forma eficiente ao AR se deve essencialmente à perda da presença de RXR α ou se à diminuição de RXRs como um todo – o que foi indicada na análise da expressão dos receptores diante do silenciamento com siRXRA – é uma questão que ainda precisa de respostas. De qualquer forma, os resultados evidenciam a necessidade de níveis adequados de expressão de RXR α para que a célula seja capaz de diminuir a progressão do ciclo celular e avançar na diferenciação neuronal.

E expressão isolada da isoforma RXR β , no entanto, não se mostrou necessária para os efeitos induzidos pelo AR que foram avaliados no presente trabalho. O silenciamento da isoforma não resultou em prejuízos para a indução de parada no ciclo celular durante a diferenciação e também não prejudicou a capacidade da célula em assumir características neuronais. O que se observou, inclusive, foi o oposto: a adoção de alguns parâmetros neuronais foi intensificada pelo silenciamento transitório de RXR β nos primeiros estágios da diferenciação pelo AR. Nas células diferenciadas após a transfecção, houve aumento da expressão de tau e de sinaptofisina, marcadores neuronais envolvidos com extensões neuríticas e processos sinápticos. Além disso, o silenciamento de RXR β no grupo controle implicou em neuritos em maior número e com maior comprimento quando comparados ao grupo siSCR mesmo na ausência de AR.

Essas observações sugerem que, pelo menos durante a transdução de sinal do AR durante os primeiros momentos da diferenciação, a isoforma RXR β possa exercer papéis inibitórios sobre processos envolvidos com a neuritogênese. A ideia de que receptores de retinoides podem atuar também em complexos de repressão

transcricional nos genes regulados pelo AR pode ajudar a compreender esse fenômeno. Por algum tempo imaginou-se que a troca de correpressores por coativadores ligados aos heterodímeros nos RAREs no DNA bastasse para explicar a troca do estado de repressão para ativação transcricional; no entanto, mais recentemente tem sido observado que o fenômeno também envolve uma troca na composição dos dímeros de receptores de retinoides. Na ausência de AR, heterodímeros RAR/RXR mas principalmente complexos contendo RXRs sem a presença de RARs atuam, em conjunto com correpressores, inibindo a transcrição de genes alvo; diante da indução por AR, essas regiões passam a ser ocupadas majoritariamente por dímeros de RAR/RXR que, com o auxílio de coativadores, ativam a transcrição dos genes alvo (Chatagnon *et al.*, 2015).

O que ainda permanece pouco compreendido é se essa dinâmica envolve também modificações no perfil de isoformas; ou seja, se isoformas distintas assumem de maneira diferencial esses papéis de ativação/repressão transcricional. Evidências em relação aos RARs apontam que isso seja provável, dado que isoformas distintas têm capacidades variáveis de atuar como repressoras transcricionais na ausência de AR em função de padrões distintos de interação com cofatores. Enquanto a isoforma RAR α exerce grande atividade repressora, as isoformas RAR β e RAR γ associam-se fracamente a correpressores e, na presença de ligante, atuam fortemente como ativadores transcricionais (Germain *et al.*, 2002; Farboud *et al.*, 2003; Hauksdottir *et al.*, 2003; Gericke *et al.*, 2013). Apesar de os RXRs terem estruturas muito similares entre si, é possível que algo semelhante ocorra também para esses receptores. A presente observação de efeitos divergentes do silenciamento de RXR α e RXR β na sinalização do AR vai ao encontro de estudos relativos à modulação das respostas transcricionais de TRs no metabolismo de hormônios tireoidais: RXR α e RXR β mostraram-se capazes de modular diferencialmente a atividade transcricional de TR tanto *in vitro* (Li *et al.*, 2004) quando *in vivo* (Decherf *et al.*, 2013), e esse efeito diferencial mostrou-se devido principalmente ao NTD das diferentes isoformas.

No entanto, é importante ressaltar que os efeitos observados para o silenciamento de RXR β nos primeiros momentos da diferenciação neuronal não determinam que a isoforma não possa desempenhar outras funções para o

processo. Lembrando o fato de que a expressão da mesma mostrou-se positivamente regulada em estágios mais avançados da diferenciação na linhagem SH-SY5Y, é adequado considerar que a sua presença seja importante nesses momentos. Em linhagem de carcinoma, por exemplo, a deleção do DBD de RXR β levou a prejuízos para a diferenciação da linhagem (Minucci *et al.*, 1994). Em células de Sertoli, a isoforma é bem estabelecida como atuante no metabolismo de lipídeos (Mascrez *et al.*, 2004; Vernet *et al.*, 2008), indicando que RXR β possa atuar sobre outros processos celulares.

Por fim, é preciso considerar também outros fenômenos celulares induzidos pelo AR, relacionados com morte e sobrevivência celular, resposta a estresse e adaptação metabólica. O silenciamento tanto de RXR α quanto de RXR β pode ter consequências também para esses processos, que podem ser mediados não apenas pelos heterodímeros clássicos de RAR/RXR mas também por intermédio de PPAR β/δ /RXR (Neerven *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012), por exemplo. Além disso, não só as vias genômicas mas também eventos citoplasmáticos podem ser influenciados pela disponibilidade dos receptores de retinoides.

A rápida ativação da via da ERK1/2 é um parâmetro frequentemente observado em modelos celulares que, quando tratados com retinol ou AR, desenvolvem diferenciação neuronal. A fosforilação de ERK1/2 é observada em células de Sertoli diante do tratamento com retinol (Gelain *et al.*, 2006; Gelain *et al.*, 2012) e em células derivadas de carcinoma embrionário P19 (Gupta *et al.*, 2008), CTs embrionárias (Stavridis *et al.*, 2010) e SH-SY5Y (Miloso *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2015; Kunzler *et al.*, 2016) diante do tratamento com AR.

Observamos que a cinase é fosforilada em 15 e 30 min após o tratamento com AR nas células SH-SY5Y e, assim, analisamos os efeitos do silenciamento das isoformas RXR α e RXR β para a ativação da via não genômica do AR. Foi observado que, nas células siRXRA, os níveis de ERK1/2 fosforilada encontram-se bastante aumentados tanto na ausência de AR quanto após 15 min de tratamento. Assim, verificou-se que a expressão de RXR α influencia o nível de ativação da via da ERK1/2 mesmo na ausência de AR.

O tratamento das células SH-SY5Y com o inibidor de ERK1/2, U0126, resulta em perda de viabilidade celular por indução de apoptose, tanto na presença quanto na ausência de AR (Miloso *et al.*, 2004). Assim, a ativação de ERK1/2 pelo AR parece estar associada à indução de sobrevivência celular. No entanto, não se sabe que efeitos uma eventual superativação da via da ERK1/2 teria para o destino celular nesse modelo. A ativação dessa via está relacionada aos mais diversos processos celulares, inclusive com indução de proliferação celular; aumentos aberrantes nos níveis de ativação da via da ERK1/2 são, inclusive, associados à progressão tumoral (Roberts e Der, 2007) e linhagens de neuroblastoma resistentes ao tratamento quimioterápico frequentemente apresentam mutações que levam à superativação da via (Eleveld *et al.*, 2015). Assim, os níveis aumentados de fosforilação de ERK1/2 podem estar também relacionados com indução de proliferação no modelo de diferenciação das células SH-SY5Y, e o fenômeno pode auxiliar a explicar os demais efeitos observados para o silenciamento de RXR α . Apesar disso, o aumento da fosforilação de ERK1/2 no grupo controle não foi suficiente para induzir alterações significativas na progressão do ciclo celular e no crescimento populacional nesse grupo.

A maneira pela qual o silenciamento de RXR α teve efeitos sobre a ativação da via citoplasmática, no entanto, permanece desconhecida. Há evidências na literatura de RARs intermediando, de forma direta, a ativação de vias de ativação de cinases no citoplasma (Dey *et al.*, 2007; Masiá *et al.*, 2007; Chen e Napoli, 2008; Piskunov e Rochette-Egly, 2012), assim como outros receptores nucleares (revisado por Lösel e Wehling, 2003). No entanto, não foram observadas no presente trabalho alterações nos níveis de RARs em resposta ao silenciamento das isoformas de RXRs no Dia 0. Assim, as alterações na ativação de cinases observada em resposta ao siRXRA nesse mesmo dia parecem não ser dependentes de RARs, e sim de algum outro mecanismo desconhecido. Se a conexão entre RXR α e a via de ERK1/2 se dá de forma direta ou com intermédio de outros fatores é algo que precisará, ainda, ser respondido. De qualquer forma, RXRs em modelos diversos mostram-se capazes de mediar diretamente fenômenos não genômicos envolvidos com sobrevivência, inflamação e apoptose (revisado por Zhang, X. K. *et al.*, 2015).

3.4. Implicação de Funções Diferenciais dos RXRs para Abordagens Clínicas Visando a Recuperação da Função Neuronal

O presente trabalho traz a evidência de que a diminuição da expressão de cada uma das isoformas de RXRs em períodos determinados da diferenciação tem consequências sobre a capacidade das células em responder ao AR em linhagem de neuroblastoma. Assim, a modulação dos RXRs pode ser uma ferramenta útil durante a diferenciação de culturas celulares com o objetivo de posterior reposição funcional.

É necessário esclarecer, no entanto, de que maneira os RXRs participam da modulação da diferenciação pelo AR em modelos celulares que visam a aplicação em terapia celular, como CTs embrionárias e CTs neurais. A sinalização de AR e a expressão de RARs e RXRs é sabidamente necessária para a diferenciação neuronal de células pluripotentes (revisado por Maden, 2007). A isoforma RXR γ , no entanto, é ausente em hCTs e tem sua expressão diminuída ao longo da diferenciação espontânea de mCTs (Xie *et al.*, 2009), o que indica que a expressão de RXR α e RXR β governa a diferenciação neuronal pelo AR também nesses modelos. O papel de cada isoforma nesse contexto, no entanto, permanece pouco conhecido.

Além disso, vale lembrar que a modulação dos níveis de RXRs ao longo da diferenciação influencia não só a transdução de sinal do próprio AR, mas também a disponibilidade dos RXRs para a formação de complexos que participarão de respostas a outros fatores. Até o momento, pouco se sabe de que maneira os mecanismos de resposta ao AR se relacionam com essas demais vias; no entanto, respostas induzidas por heterodímeros permissivos de RXR têm sido extensivamente relacionadas à função neuronal (revisado por Olivares *et al.*, 2015). A ativação dos heterodímeros Nurr1/RXR, por exemplo, é importante para a transcrição de genes relacionados ao fenótipo dopaminérgico (Wallén-Mackenzie *et al.*, 2003) e promove a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em modelos de DP (Mcfarland *et al.*, 2013; Volakakis *et al.*, 2015). Já a ativação tanto de LXR/RXR quanto de PPAR/RXR parece atuar na diferenciação neuronal de progenitoras neurais (Mounier *et al.*, 2015) e reverter o dano induzido em modelos

de DA (Nam *et al.*, 2016; Mariani *et al.*, 2017). Essas observações tornaram o pan-agonista de RXRs, bexaroteno, já utilizado como agente antitumoral contra linfoma de células-T (Querfeld *et al.*, 2006), um forte candidato para o tratamento de doenças neurodegenerativas. No entanto, tanto em modelo de DP (Volakakis *et al.*, 2015) quanto de DA (O'hare *et al.*, 2016; Koster *et al.*, 2017) os resultados do tratamento de bexaroteno em animais mostram-se conflitantes.

Assim, a compreensão das funções isoladas dos RXRs mostra-se uma tarefa complexa, já que esses receptores parecem regular a diferenciação neuronal por meio de diferentes vias celulares. Somado à modulação da expressão dos RXRs ou mesmo ao desenvolvimento eficiente de moduladores isoforma-específicos, no entanto, o conhecimento a respeito desses mecanismos moleculares pode ser fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens eficientes para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

3.5. Perspectivas

- Investigar de que forma a influência diferencial de RXR α e RXR β sobre os efeitos celulares do AR na diferenciação neuronal se deve a vias genômicas (regulação transcricional) ou a vias não genômicas (modulação de vias de cinases e de produção de ERs) em SH-SY5Y.
- Verificar se as isoformas de RXRs desempenham papéis diferenciais em células neurogênicas como CTs neurais e se a modulação da expressão das mesmas pode ser empregada na otimização da diferenciação neuronal pelo AR.
- Avaliar, em CTs neurais, a eficiência da diferenciação pelo tratamento conjunto de AR com ligantes específicos de RXRs como o bexaroteno.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, S. et al. Phosphorylation of Retinoid X Receptor Suppresses its Ubiquitination in Human Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 332-340, 2002.
- AGGARWAL, S. et al. Nonclassical Action of Retinoic Acid on the Activation of the cAMP Response Element-binding Protein in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. **Mol Biol Cell**, v. 17, p. 566–575, 2006.
- AGHOLME, L. et al. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. **J Alzheimers Dis**, v. 20, n. 4, p. 1069-1082, 2010.
- ALMEIDA, V. R. et al. Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 10, p. 7610-7619, 2017.
- ANDO, N. et al. Expression of retinoid X receptor α is decreased in 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Oncol Rep**, v. 18, n. 4, p. 879-884, 2007.
- BALLOW, M. et al. Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. **Journal of Clinical Immunology** v. 23, n. 1, p. 46-54, 2003.
- BALMER, J. E.; BLOMHOFF, R. Gene expression regulation by retinoic acid. **J Lipid Res**, v. 43, p. 1773-1808, 2002.
- BARKER, R.; DROUIN-OUELLET, J.; PARMAR, M. Cell-based therapies for Parkinson disease —past insights and future potential **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 9, p. 492-503, 2015.
- BASTIEN, J.; ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. **Gene**, v. 328, p. 1–16, 2004.
- BLOMHOFF, R.; BLOMHOFF, H. K. Overview of Retinoid Metabolism and Function. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 7, p. 606-30, 2006.
- BOUR, G. et al. Cyclin H binding to the RAR activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. **PNAS**, v. 102, n. 46, p. 16608–16613, 2005.

BOUR, G.; LALEVÉE, S.; ROCHETTE-EGLY, C. Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 6, p. 302-309, 2007.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, S. et al. **Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology**. 8a ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011. ISBN 9780123749475.

BRUCK, N. et al. Phosphorylation of the Retinoid X Receptor at the Omega loop modulates the expression of retinoic-acid-target genes with a promoter context specificity. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 1229–1239, 2005.

CAÑÓN, E. et al. Rapid Effects of Retinoic Acid on CREB and ERK Phosphorylation in Neuronal Cells. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 12, p. 5583–5592, 2004.

CARPENTIER, A. et al. Distinct sensitivity of neuroblastoma cells for retinoid receptor agonists: evidence for functional receptor heterodimers. **Oncogene**, v. 15, n. 15, p. 1805-1813, 1997.

CHAKRAVARTI, N. et al. Decreased Expression of Retinoid Receptors in Melanoma: Entailment in Tumorigenesis and Prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4817-4824, 2007.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 9, p. 940-54, 1996.

CHATAGNON, A. et al. RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 10, p. 4833-54, 2015.

CHEBARO, Y. et al. Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor Alpha Induces a Mechanical Allosteric Regulation and Changes in Internal Dynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 4, 2013.

CHEN, N.; NAPOLI, J. L. All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RAR α . **The FASEB Journal** v. 22, n. 1, 2008.

CHEUNG, W. M. W. et al. Expression of Retinoid Receptors During the Retinoic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Human Embryonal Carcinoma Cells. **J Neurochem**, v. 75, p. 34-40, 2000.

CHEUNG, Y.-T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 127–135, 2009.

CHIBA, H. et al. Distinct Retinoid X Receptor-Retinoic Acid Receptor Heterodimers Are Differentially Involved in the Control of Expression of Retinoid Target Genes in F9 Embryonal Carcinoma Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 6, p. 3013–3020, 1997.

CHIBA, H. et al. Specific and Redundant Functions of Retinoid X Receptor/Retinoic Acid Receptor Heterodimers in Differentiation, Proliferation, and Apoptosis of F9 Embryonal Carcinoma Cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 3, p. 735–747, 1997.

CLAGETT-DAME, M. et al. Identification and Characterization of All-trans-Retinoic Acid Receptor Transcripts and Receptor Protein in Human Neuroblastoma Cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 684-693, 1993.

CLARKE, N. et al. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert Rev Mol Med**, v. 6, n. 25, p. 1-23, 2004.

CLIFFORD, J. et al. RXR α -null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 16, p. 4142-4155,, 1996.

CLIFFORD, J. L. et al. Modulation by retinoids of mRNA levels for nuclear retinoic acid receptors in murine melanoma cells. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 10, p. 1546-55, 1990.

COSGAYA, J. M. et al. Comparison of the Effects of Retinoic Acid and Nerve Growth Factor on PC12 Cell Proliferation, Differentiation, and Gene Expression. **J Neurochem**, v. 66, n. 1, p. 89-98, 1996.

COYLE, D. E.; LI, J.; BACCEI, M. Regional Differentiation of Retinoic Acid-Induced Human Pluripotent Embryonic Carcinoma Stem Cell Neurons. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16174, 2011.

DECHERF, S. et al. Retinoic X receptor subtypes exert differential effects on the regulation of Trh transcription. **Mol Cell Endocrinol** v. 381, p. 115–123, 2013.

DESERGNE, B. RXR: From Partnership to Leadership in Metabolic Regulations. **Vitamins and Hormones**, v. 75, p. 1-32, 2007.

DEY, N. et al. CSK Controls Retinoic Acid Receptor (RAR) Signaling: a RAR–c-SRC Signaling Axis Is Required for Neurogenic Differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 1, 2007.

DONATO, L. J.; NOY, N. Suppression of Mammary Carcinoma Growth by Retinoic Acid: Proapoptotic Genes Are Targets for Retinoic Acid Receptor and Cellular Retinoic Acid–Binding Protein II Signaling. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, 2005.

ELEVELD, T. F. et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. **Nat Genet**, v. 47, n. 8, p. 864–871, 2015.

ESCRIVA, H.; BERTRAND, S.; LAUDET, V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. **Essays in Biochemistry**, v. 40, p. 11-26, 2004.

EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 255-266, 2014.

FARBOUD, B. et al. Isotype-Restricted Corepressor Recruitment: a Constitutively Closed Helix 12 Conformation in Retinoic Acid Receptors β and γ Interferes with Corepressor Recruitment and Prevents Transcriptional Repression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2844–2858, 2003.

FILOGRANA, R. et al. Analysis of the Catecholaminergic Phenotype in Human SH-SY5Y and BE(2)-M17 Neuroblastoma Cell Lines upon Differentiation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

FROTA-JUNIOR, M. L. C. D. et al. In vitro optimization of retinoic acid–induced neurogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, p. 325-34, 2011

GARCÍA-REGALADO, A. et al. Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. **Mol Cancer** v. 12, p. 44-56, 2013.

GELAIN, D. P. et al. Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. **Cell Signal**, v. 18, n. 10, p. 1685–1694, 2006.

GELAIN, D. P. et al. Retinol induces morphological alterations and proliferative focus formation through free radical-mediated activation of multiple signaling pathways. **Acta Pharmacologica Sinica** v. 33, p. 558–567, 2012.

GELAIN, D. P. et al. Retinol increases catalase activity and protein content by a reactive species-dependent mechanism in Sertoli cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174 p. 38–43, 2008.

GERICKE, J. et al. Regulation of Retinoid-Mediated Signaling Involved in Skin Homeostasis by RAR and RXR Agonists/Antagonists in Mouse Skin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.

GERMAIN, P. et al. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 712–725, 2006a.

GERMAIN, P. et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 760-772, 2006b.

GERMAIN, P. et al. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. **Nature**, v. 415, p. 187–192, 2002.

GIANNI, M. et al. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR γ degradation and transactivation. **European Molecular Biology Organization**, v. 21, n. 14, p. 3760-3769, 2002.

GIANNI, M. et al. P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RAR α -mediated transcription. **European Molecular Biology Organization**, v. 254, n. 4, p. 739–751, 2006.

GIANNI, M. et al. The AF-1 and AF-2 Domains of RAR γ 2 and RXR α Cooperate for Triggering the Transactivation and the Degradation of RAR γ 2/RXR α Heterodimers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34458-66, 2003.

GIANNINI, G. et al. Activation of Three Distinct RXR/RAR Heterodimers Induces Growth Arrest and Differentiation of Neuroblastoma Cells. **J Biol Chem**, v. 272, n. 42, p. 26693–26701, 1997.

GOLDSTEIN, J. T. et al. Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. **Arch Biochem Biophys**, v. 420, n. 1, p. 185–193, 2003.

GUPTA, P. et al. Retinoic acid-stimulated sequential phosphorylation, PML recruitment, and SUMOylation of nuclear receptor TR2 to suppress Oct4 expression. **PNAS**, v. 105, n. 32, p. 11424–11429, 2008.

HAUKSDOTTIR, H.; FARBOUD, B.; PRIVALSKY, M. L. Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 3, p. 373–385, 2003.

HONG-RONG, X.; LIN-SEN, H.; GUO-YI, L. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 8, p. 1086-92, 2010.

HUGHES, J. S.; LIENHARDT, H. F.; AUBEL, C. E. Nerve Degeneration Resulting From Avitaminosis A. **The Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 183–186, 1929.

HYTER, S. et al. Loss of nuclear receptor RXR α in epidermal keratinocytes promotes the formation of Cdk4-activated invasive melanomas. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 23, p. 635–648 2010.

IBGE. **Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílios**, Rio de Janeiro, v. 31, 2011.

IRIOKA, T. et al. Distinct effects of caudalizing factors on regional specification of embryonic stem cell-derived neural precursors. **Developmental Brain Research**, v. 154, p. 63–70, 2005.

JACOBS, S. et al. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. **PNAS**, v. 103, n. 10, p. 3902–3907, 2006.

JANESICK, A.; WU, S. C.; BLUMBERG, B. Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, n. 8, p. 1559-1576, 2015.

JAUL, E.; BARRON, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. **Frontiers in Public Health**, v. 5, 2017.

JONES-VILLENEUVE, E. M. et al. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. **Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 2, p. 253-262, 1982.

KAMEI, Y. et al. Retinoic acid receptor γ 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. **Biochemical Journal** v. 293, p. 807-812, 1993.

KIMBREL, E. A.; LANZA, R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 14, n. 10, p. 681–692, 2015.

KORECKA, J. A. et al. Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1-17, 2013.

KOSTER, K. P. et al. Rexinoids as Therapeutics for Alzheimer's Disease: Role of APOE. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 708 - 720, 2017.

KUNZLER, A. et al. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 9, p. 6903-6916, 2016.

LATASA, M.-J.; COSGAYA, J. M. Regulation of Retinoid Receptors by Retinoic Acid and Axonal Contact in Schwann Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2011.

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 955-965, 2016.

LEVIN, A. A. et al. 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . **Nature**, v. 355, p. 359–361, 1992.

LI, D. et al. Novel Roles of Retinoid X Receptor (RXR) and RXR Ligand in Dynamically Modulating the Activity of the Thyroid Hormone Receptor/RXR Heterodimer. **J Biol Chem**, v. 279, n. 9, p. 7427–7437, 2004.

LIANG, C.; YANG, L.; GUO, S. All-trans retinoic acid inhibits migration, invasion and proliferation, and promotes apoptosis in glioma cells in vitro. **Oncology Letters**, v. 9, p. 2833-2838, 2015.

LOPES, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain Research**, v. 1337, p. 85-94, 2010.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. . **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 46-56, 2003.

LOVAT, P. E. et al. Retinoic acid receptor expression during the in vitro differentiation of human neuroblastoma **Neuroscience Letters**, v. 162, n. 1, p. 109-113, 1993.

MACORITTO, M. et al. Phosphorylation of the Human Retinoid X Receptor at Serine 260 Impairs Coactivator(s) Recruitment and Induces Hormone Resistance to Multiple Ligands. **The Journal of Biological Chemistry** v. 283, n. 8, p. 4943–4956, 2008.

MADEN, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 755-765, 2007.

MAIRE, A. L. et al. Retinoid Receptors and Therapeutic Applications of RAR/RXR Modulators. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 505-527, 2012.

MARIANI, M. M. et al. Neuronally-directed effects of RXR activation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42270-42282, 2017.

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; CHAMBON, P. Function of Retinoid Nuclear Receptors: Lessons from Genetic and Pharmacological Dissections of the Retinoic Acid Signaling Pathway During Mouse Embryogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** v. 46, p. 451–80, 2006.

MASCRESZ, B. et al. Ligand-dependent contribution of RXR β to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. **EMBO reports**, v. 5, n. 3, p. 285-290, 2004.

MASIÁ, S. et al. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 10, p. 2391–2402, 2007.

MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R. et al. Phosphorylation of Retinoid X Receptor α at Serine 260 Impairs Its Metabolism and Function in Human Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Res**, v. 61, n. 20, p. 7675–7682, 2001.

MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R. et al. Aberrant metabolism of retinoid X receptor proteins in human hepatocellular carcinoma. **Mol Cell Endocrinol**, v. 121, n. 2, p. 179-190, 1996.

MCFARLAND, K. et al. Low Dose Bexarotene Treatment Rescues Dopamine Neurons and Restores Behavioral Function in Models of Parkinson's Disease. **ACM Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 1430-8, 2013.

MILOSO, M. et al. Retinoic Acid-Induced Neuritogenesis of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Is ERK Independent and PKC Dependent. **J Neurosci Res**, v. 75, n. 2, p. 241–252, 2004.

MINUCCI, S. et al. Retinoid X Receptor (RXR) within the RXR-Retinoic Acid Receptor Heterodimer Binds Its Ligand and Enhances Retinoid-Dependent Gene Expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 2, p. 644–655, 1997.

MINUCCI, S. et al. Dominant Negative Retinoid X Receptor β Inhibits Retinoic Acid-Responsive Gene Regulation in Embryonal Carcinoma Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 1, p. 360-372, 1994.

MOUNIER, A. et al. Bexarotene-Activated Retinoid X Receptors Regulate Neuronal Differentiation and Dendritic Complexity. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 34, p. 11862–11876, 2015.

NAM, K. N. et al. RXR controlled regulatory networks identified in mouse brain counteract deleterious effects of A β oligomers. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24048-60, 2016.

NARAYANAN, R. et al. The Functional Consequences of Cross-talk between the Vitamin D Receptor and ERK Signaling Pathways Are Cell-specific. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 47298–47310, 2004.

NEERVEN, S. V.; KAMPMANN, E.; MEY, J. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 85, p. 433–451, 2008.

NOY, N. Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 30, p. 201–17, 2010.

O'HARE, E. et al. Lack of support for bexarotene as a treatment for Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 100, p. 124-30, 2016.

OLIVARES, A. M.; MORENO-RAMOS, O. A.; HAIDER, N. B. Role of Nuclear Receptors in Central Nervous System Development and Associated Diseases. **Journal of Experimental Neuroscience** v. 9, n. S2, p. 93-121, 2015.

PAN, J. et al. Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, p. 571–583, 2005.

PASQUALI, M. A. B. et al. Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1177–1183, 2008.

PASQUALI, M. A. B. et al. Gene Expression Profile of NF- κ B, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 1, p. 423-435, 2014.

PEINEMANN, F. et al. Retinoic acid postconsolidation therapy for high-risk neuroblastoma patients treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. **Cochrane Database Sys Rev**, v. 25, n. 8, 2017.

PÉREZ, E. et al. Modulation of RXR function through ligand design. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1821, p. 57–69, 2012.

PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. **Oncogene**, v. 31, n. 1, 2012.

PISKUNOV, A.; TANOURY, Z. A.; ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear and Extra-Nuclear Effects of Retinoid Acid Receptors: How They Are Interconnected. **Subcellular Biochemistry**, v. 70, p. 103-27, 2014.

PRÈ, D. et al. A Time Course Analysis of the Electrophysiological Properties of Neurons Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

QIAO, J. et al. PI3K/Akt and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 424, n. 3, p. 421–426, 2012

QUERFELD, C. et al. Bexarotene in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 7, n. 7, p. 907-915, 2006.

RAMOS, V. M. et al. NRF2 Mediates Neuroblastoma Proliferation and Resistance to Retinoic Acid Cytotoxicity in a Model of In Vitro Neuronal Differentiation. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 9, p. 6124-6135, 2015.

RANA, B. et al. Retinoid X receptors and retinoid response in neuroblastoma cells. **J Cell Biochem**, v. 86, n. 1, p. 67–78, 2002.

REDFERN, C. P. F. et al. Differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid on the induction of retinoic acid receptor-beta and cellular retinoic acid-binding protein II in human neuroblastoma cells. **Biochemical Journal** v. 304, p. 147-154, 1994.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.

REYNOLDS, P. et al. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. **Cancer Letters**, v. 197, n. 1-2, p. 185-92, 2003.

ROBERTS, P. J.; DER, C. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, p. 3291–3310, 2007.

ROY, B.; TANEJA, R.; CHAMBON, P. Synergistic Activation of Retinoic Acid (RA)-Responsive Genes and Induction of Embryonal Carcinoma Cell Differentiation by an RA Receptor α (RAR α)-, RAR β -, or RAR γ -Selective Ligand in Combination with a Retinoid X Receptor-Specific Ligand. **Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 6481–6487, 1995.

SAMARUT, E.; ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear retinoic acid receptors: Conductors of the retinoic acid symphony during development. **Mol Cell Endocrinol**, v. 348, p. 348–360, 2012.

SARKANEN, J.-R. et al. Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, p. 1941–1952, 2007.

SCHNEIDER, L. et al. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 11, p. 2007–2017, 2011.

SHETTY, P. Grey matter: ageing in developing countries. **The Lancet** v. 379, n. 9823, p. 1285 – 1287, 2012.

SIEGENTHALER, J. A. et al. Retinoic Acid from the Meninges Regulates Cortical Neuron Generation. **Cell**, v. 139, p. 597–609, 2009.

SOLOMON, C.; WHITE, J. H.; KREMER, R. Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor α . **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p. 1729–1735, 1999.

SPERLING, L. E. et al. Influence of random and oriented electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. **J Biomed Mat Res A**, v. 105, n. 5, p. 1333–1345, 2017.

SRINIVAS, H. et al. c-Jun N-Terminal Kinase Contributes to Aberrant Retinoid Signaling in Lung Cancer Cells by Phosphorylating and Inducing Proteasomal Degradation of Retinoic Acid Receptor α . **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 3, p. 1054–1069, 2005.

STAVRIDIS, M. P.; COLLINS, B. J.; STOREY, K. G. Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation. **Development** v. 137, p. 881-890, 2010.

STRICKLAND, S.; MAHDAVI, V. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. **Cell** v. 15, n. 2, p. 393–403, 1970.

STUDER, L. Derivation of dopaminergic neurons from pluripotent stem cells. **Progress in brain research**, v. 200, p. 243-63, 2012.

SZÉLES, L. et al. Research Resource: Transcriptome Profiling of Genes Regulated by RXR and Its Permissive and Nonpermissive Partners in Differentiating Monocyte-Derived Dendritic Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 11, 2010.

TAKIYAMA, Y. et al. Decreased Expression of Retinoid X Receptor Isoforms in Human Thyroid Carcinomas. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5851–5861, 2004.

TANOURY, Z. A. et al. Phosphorylation of the retinoic acid receptor RAR-gamma2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. **Journal of Cell Science** v. 127, n. 1, p. 2095–2105, 2014.

TANOURY, Z. A.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of Lipid Research**, v. 54, p. 1761-1775, 2013.

TEPPOLA, H. et al. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. **Neurochem Res**, v. 41, n. 4, p. 731-747, 2015.

THÉ, H. D. et al. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and β genes. **European Molecular Biology Organization**, v. 8 n. 2, p. 429-433, 1989.

THÉ, H. D. et al. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. **Nature** v. 343, n. 6254, p. 177-80, 1990.

VERNET, N. et al. Retinoid X receptor beta (RXRB) expression in Sertoli cells controls cholesterol homeostasis and spermiation. **Reproduction**, v. 136, p. 619–626, 2008.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VOLAKAKIS, N. et al. Nurr1 and Retinoid X Receptor Ligands Stimulate Ret Signaling in Dopamine Neurons and Can Alleviate Alpha-Synuclein Disrupted Gene Expression. **Journal of Neuroscience** v. 35, n. 42, p. 14370-85, 2015.

WALLÉN-MACKENZIE, Å. et al. Nurr1–RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. **Genes & Development**, v. 17, p. 3036–3047, 2003.

WAN, Y.-J. Y.; CAI, Y.; MAGEE, T. R. Retinoic acid differentially regulates retinoic acid receptor-mediated pathways in the Hep3B cell line. **Experimental Cell Research**, v. 238, n. 1, p. 241-7, 1998.

WAN, Y.-J. Y.; WANG, L.; WU, T.-C. J. The expression of retinoid X receptor genes is regulated by all-trans- and 9-cis-retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 210, n. 1, p. 56-61, 1994.

WANG, Z. et al. RXRa Ablation in Epidermal Keratinocytes Enhances UVR-Induced DNA Damage, Apoptosis, and Proliferation of Keratinocytes and Melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology** v. 131, p. 177–187;, 2011.

WESTERLUND, I. et al. Combined epigenetic and differentiation-based treatment inhibits neuroblastoma tumor growth and links HIF2 α to tumor suppression. **PNAS**, v. 114, n. 30, 2017.

WILSON, L. et al. Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. **Volume 269, Issue 2, 15 May 2004, Pages 433-446**, v. 269, n. 2, p. 433-446, 2004.

WOLF, G. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? **Nutr Rev**, v. 64, n. 12, p. 532–538, 2006.

WU, T. C.; WANG, L.; WAN, Y. J. Retinoic acid regulates gene expression of retinoic acid receptors alpha, beta and gamma in F9 mouse teratocarcinoma cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 51, n. 3, p. 219-24, 1992.

XIE, C.-Q. et al. Expression Profiling of Nuclear Receptors in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 5, p. 724–733, 2009.

XUNA, Z. et al. Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 133, p. 176–185, 2012.

YANG, J. et al. Analysis of retinoic acid-induced neural differentiation of mouse embryonic stem cells in two and three-dimensional embryoid bodies. **J Vis Exp** v. 22, n. 122, 2017.

YU, S. et al. Retinoic Acid Induces Neurogenesis by Activating Both Retinoic Acid Receptors (RARs) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor β/δ (PPAR β/δ). **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, 2012.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1205–1212, 2008.

ZECHEL, C. Requirement of Retinoic Acid Receptor Isotypes α , β and γ during the Initial Steps of Neural Differentiation of PCC7 Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 1629–1645, 2005.

ZHANG, J. et al. Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cell Differentiation by Altering Both Encoding RNA and microRNA Expression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2015.

ZHANG, X.; ZHOU, H.; SU, Y. Targeting truncated RXR α for cancer therapy. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 48, n. 1, p. 49–59, 2016.

ZHANG, X. K. et al. Regulation of the nongenomic actions of retinoid X receptor- α by targeting the coregulator-binding sites. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, p. 102–112, 2015.

ZHENG, X. et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. **eLife**, v. 5, p. 1-25, 2016.

ZHONG, C. et al. Aberration in the Expression of the Retinoid Receptor, RXR α , in Prostate Cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 2, p. 179-184, 2003.

ANEXO

*Curriculum Vitae***Girardi, C. S.****DADOS PESSOAIS**

Nome: Carolina Saibro Girardi

Nascimento: 05/05/1994, Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço profissional: Departamento de Bioquímica, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone profissional: 55 51 3308 5577

E-mail: girardi.cs@gmail.com

FORMAÇÃO

- Mar 2016 – Presente

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

- Mar 2012 – Dez 2016

Graduação em Biotecnologia Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- III Encontro Internacional de Engenharia de Tecidos., 2015. Porto Alegre, Brasil.
- 9th IBRO World Congress on Neuroscience, 2015. Rio de Janeiro, Brasil.
- IV Estudo da Sinalização Celular no Câncer, 2014. Porto Alegre, Brasil.
- II Encontro Internacional de Engenharia de Tecidos, 2015. Porto Alegre, Brasil.
- VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine South American Group. 2013. Buenos Aires, Argentina.
- III Encontro da Rede Gaúcha de Células-Tronco e Terapia Celular, 2012. Porto Alegre, Brasil.

ESTÁGIOS

- Jul 2016 – Dez 2016

Estágio Curricular

Instituto de Pesquisas com Células-Tronco (IPCT)

BOLSAS DE ESTUDO

- Jul 2014 – Dez 2015

Bolsa de Iniciação Científica

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - UFRGS

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain.

Fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Jul 2015 – Jun 2014

Bolsa de Difusão da Ciência: Programa de Popularização da Ciência

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - UFRGS

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain.

Fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Jul 2012 – Jun 2013

Bolsa de Iniciação Científica: Programa Jovens Talentos para a Ciência

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - UFRGS

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain.

Fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (Capes).

ARTIGOS EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS

GASPAROTTO, J.; GIRARDI, C. S.; SOMENSI, N.; RIBEIRO, C. T. ; MOREIRA, J. C. F.; MICHELS, M.; SONAI, B.; ROCHA, M.; STECKERT, A. V.; BARICHELLO, T.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F.; GELAIN, D. P. Receptor for advanced glycation endproducts mediates sepsis-triggered amyloid- β ; accumulation, tau phosphorylation, and cognitive impairment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 1, p. 226-244, 2018.

SPERLING, L.; REIS, K.; POZZOBON, L.; GIRARDI, C. S.; PRANKE, P. Influence of random and oriented electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 5, p. 1333-1345, 2017.

PETIZ, L.; GIRARDI, C. S.; BORTOLIN, R. C.; KUNZLER, A.; GASPAROTTO, J.; RABELO, T. K.; MATTÉ, C.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Vitamin A Oral Supplementation Induces Oxidative Stress and Suppresses IL-10 and HSP70 in Skeletal Muscle of Trained Rats. **Nutrients**. v. 9, n. 4, p. 353-369, 2017.

KUNZLER, A.; ZEIDAN-CHULIÁ, F.; GASPAROTTO, J.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; PETIZ, L.; BORTOLIN, R. C.; ROSTIROLLA, D. C.; ZANOTTO-FILHO, A.; PASQUALI, M. A. B.; DICKSON, P.; DUNKLEY, P. R.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. **Molecular Neurobiology**. p. 54, n. 9, p. 6903-6916, 2017.

GASPAROTTO, J.; SENGER, M. R.; DEGROSSOLI, A.; SIMONE, S. G.; BORTOLIN, R. C.; SOMENSI, N.; GIRARDI, C. S.; SOUZA, C.; CALABRESE, K. S.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F.; SILVA-JUNIOR, F. P.; GELAIN, D. P. Increased tau phosphorylation and receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in the brain of mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 43, p. 37-45, 2015.

GASPAROTTO, J.; PETIZ, L.; GIRARDI, C. S.; BORTOLIN, R. C.; VARGAS, A. R.; HENKIN, B. S.; CHAVES, P. R.; RONCATO, S.; ZANOTTO-FILHO, A.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Supplementation with vitamin A enhances oxidative stress in the lungs of rats submitted to aerobic exercise. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. v. 40, n. 12, p. 1253-1261, 2015.

GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; BORTOLIN, R. C.; MORESCO, K.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; RABELO, T. K.; MORRONE, M. S.; VIZZOTO, M.; RASEIRA, M. C. B.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Effects of different products of peach (*Prunus persica* L. Batsch) from a variety developed in southern Brazil on oxidative stress and inflammatory parameters in vitro and ex vivo. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 55, n. 2, p. 110-119, 2014.

GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; KUNZLER, A.; GIRARDI, C. S.; PASQUALI, M. A. B.; RAMOS, V. M.; SIMOES-PIRES, A.; QUINTANS-JR, L.; BRANCO, A.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Hecogenin Acetate Inhibits Reactive Oxygen Species Production and Induces Cell Cycle Arrest and Senescence in the A549 Human Lung Cancer Cell Line. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 14, n. 8, p. 1128-1135, 2014.

GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; BORTOLIN, R. C.; GIRARDI, C. S.; KUNZLER, A.; RABELO, T. K.; SCHNORR, C. E.; MORESCO, K.; YATSU, F. K.; BASSANI, V. L.; VIZZOTO, M.; RASEIRA, M. C. B.; ZANOTTO-FILHO, A.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Preventive supplementation with fresh and preserved peach attenuates CCl₄-induced oxidative stress, inflammation and tissue damage. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 12, p. 1282-1295, 2014.

RESUMOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

GIRARDI, C. S.; BRUM, P. O.; DELGADO, J.; RIBEIRO, CAMILA T.; ROSTIROLLA, D. C.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, DANIEL P. Efeitos do Silenciamento de RXRA e RXRB para a Diferenciação Neuronal Mediada pelo Ácido Retinoico em SH-SY5Y. 37^a Semana Científica do HCPA, 2017, Porto Alegre. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37. p. 54, 2017.

SPERLING, L. E.; REIS, K.; GIRARDI, C. S.; PRANKE, P. Efficiency of Neural Differentiation of Mouse Wmbryonic Stem Cells Under the Treatment of Retinoids. ISSCR 2016 - International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, 2016, San Francisco. **ISSCR 2016 Poster Abstract Book**, p. 239-240, 2016.

SPERLING, L. E.; REIS, K.; POZZOBON, L.; GIRARDI, C. S.; PRANKE, P. A Comparative Study of Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells on Aligned and Randomized Electrospun Poly-Lactic Co-Glycolic Acid Scaffolds. ISSCR 2016 - International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, 2016, San Francisco. **ISSCR 2016 Poster Abstract Book**, p. 352-353, 2016.

GELAIN, D. P.; GASPAROTTO, J.; BORTOLIN, R. C.; GIRARDI, C. S.; MOREIRA, J. C. F.; SENGER, M. R.; SCHIRATO, G. V.; REZENDE-NETO, J. M.; DANTAS, R. F.; DAL-PIZZOL, F.; SILVA-JR, F. P. Schistosoma mansoni Infection Induces Molecular Markers of Idiopathic Neurodegenerative Diseases in Mice Brain Cortex. IBRO - 9th World Congress International Brain Research Organization, 2015, Rio de Janeiro. **Poster Sessions II - Disorders of the Nervous System**, p. 462, 2015.

GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; ZANOTTO-FILHO, A.; GELAIN, D. P. Retinoic Acid-Induced Modulation of Retinoid Receptors Expression During Neuronal Differentiation. IBRO - 9th World Congress International Brain Research

Organization, 2015, Rio de Janeiro. **Poster Session IV - Development**, p. 1362, 2015.

KUNZLER, A.; ZEIDAN-CHULIÁ, F.; GASPAROTTO, J.; PETIZ, L.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; DUNKLEY, P. R.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Retinoic acid-induced neurodifferentiation of SH-SY5Y cells involves reactive species production and oxidative stress. 25th Meeting of the International Society for Neuro-chemistry, 2015, Cairns. **Journal of Neurochemistry. Supplement**, v. 134. p. 255, 2015.

GELAIN, D. P.; GASPAROTTO, J.; BORTOLIN, R. C.; GIRARDI, C. S.; MOREIRA, J. C. F.; SENGER, M. R.; SCHIRATO, G. V.; REZENDE-NETO, J. M.; DANTAS, R. F.; SILVA-JR, F. P. Mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni* exhibit molecular markers of idiopathic neurodegenerative diseases. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry, 2015, Cairns. **Journal of Neurochemistry. Supplement.**, v. 134. p. 121, 2015.

GIRARDI, C. S.; GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; BORTOLIN, R. C.; KUNZLER, A.; MORESCO, K. S.; KLAFKE, K.; RABELO, T. K.; SCHNORR, C. E.; VIZZOTTO, M.; RASEIRA, M. C.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Suplementação preventiva com pêssego fresco e em compota atenua o estresse oxidativo, a inflamação e o dano tecidual induzidos por CCl₄. 34^a Semana Científica do HCPA, 2014, Porto Alegre. **Clinical & Biomedical Research**, v. 34. p. 36-36, 2014.

GIRARDI, C. S.; KOLLING, E. A.; PASQUALI, M. A. B.; GASPAROTTO, J.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Redox-dependent effects of vitamin A (retinol) on parameters of viability and neurotoxicity in human catecholaminergic SH-SY5Y cells. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine South American Group, 2013, Buenos Aires. **Book of Abstracts**, p. 107, 2013.

RABELO, T. K.; GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; BORTOLIN, R. C.; MORESCO, K.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; MORRONE, M. S.; VIZZOTO, M.; RASEIRA, M. C. B.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activities of peach (*Prunus persica* L. Batsch) and products in vitro and ex vivo. VI International Conference on Polyphenols and Health, 2013, Buenos Aires. **Book of Abstracts**, p. 35, 2013.

GASPAROTTO, J.; SOMENSI, N.; BORTOLIN, R. C.; MORESCO, K.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; RABELO, T. K.; SCHNORR, C. E.; KUNZLER, A.; VIZZOTO, M.; RASEIRA, M. C. B.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Anti-inflammatory effects of peach (*Prunus persica* L. Batsch) and derivate products on CCl₄-induced acute general injury in wistar rats. VI International Conference on Polyphenols and Health, 2013, Buenos Aires. **Book of Abstracts**, p. 55, 2013.

GASPAROTTO, J.; KUNZLER, A.; SOMENSI, N.; BORTOLIN, R. C.; MORESCO, K.; GIRARDI, C. S.; KLAFKE, K.; RABELO, T. K.; SCHNORR, C. E.; VIZZOTO, M.; RASEIRA, M. C. B.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Wistar rats on a diet including peach (*Prunus persica* L. Bastch) or derivate products were protected against CCl₄-induced oxidative stress. VI International Conference on Polyphenols and Health, 2013, Buenos Aires. **Book of Abstracts**, p. 59, 2013.

SOMENSI, N.; GASPAROTTO, J.; KUNZLER, A.; GIRARDI, C. S.; PASQUALI, M. A. B.; RAMOS, V. M.; SIMOES-PIRES, A.; QUINTANS-JR, L.; BRANCO, A.; MOREIRA, J. C. F.; GELAIN, D. P. Hecogenin acetate induce cell cycle arrest and

senescence in the lung cancer cell line A549. 5° Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013, Florianópolis. **Meeting Abstracts**, 2013.

DEMAIS TRABALHOS APRESENTADOS EM MOSTRAS

GIRARDI, C. S. Modulação da Expressão dos Receptores de Retinoides durante a Diferenciação Neuronal induzida por Ácido Retinoico. XXVII Salão de Iniciação Científica, 2015.

GIRARDI, C. S.; GELAIN, D. P. Desmistificando o Cientista. IV Feira de Ensino e Popularização da Ciência. 2014.

GIRARDI, C. S. Caracterização do silenciamento do receptor RXR-beta, envolvido na diferenciação neuronal mediada por ácido retinoico, em modelo SH-SY5Y. XXV Salão de Iniciação Científica, 2013.

CAPÍTULOS DE LIVROS

KUNZLER, A.; BRUM, F. L. S.; PEREIRA, G. A. M.; GIRARDI, C. S.; ROSA, H. T.; CALLONI, G. Bases moleculares da hereditariedade: ácidos nucleicos. In: Lucimar Filot da Silva Brum, Mônica Magdalena Descalzo Kuplich, Letícia Hoerbe Andrighetti. **Citologia, histologia e genética**. 1ed. Porto Alegre: SAGAH, 2018, v. 1. p. 65-80.

KUNZLER, A.; BRUM, F. L. S.; PEREIRA, G. A. M.; GIRARDI, C. S.; ROSA, H. T.; CALLONI, G. Alterações moleculares: deleção, inserção, substituição, expansão de bases. In: Lucimar Filot da Silva Brum, Mônica Magdalena Descalzo Kuplich, Letícia Hoerbe Andrighetti. **Citologia, histologia e genética**. 1ed. Porto Alegre: SAGAH, 2018, v. 1. p. 109-122.

KUNZLER, A.; BRUM, F. L. S.; PEREIRA, G. A. M.; GIRARDI, C. S.; ROSA, H. T.; CALLONI, G. Microscopia óptica. In: Lucimar Filot da Silva Brum, Mônica Magdalena Descalzo Kuplich, Letícia Hoerbe Andrighetti. **Citologia, histologia e genética**. 1ed. Porto Alegre: SAGAH, 2018, v. 1. p. 123-136.