



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

BIOTECNOLOGIA

Carolina Saibro Girardi

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO E DA LOCALIZAÇÃO
CELULAR DOS RECEPTORES DE RETINOIDES
DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL INDUZIDA
PELO ÁCIDO RETINOICO**

PORTO ALEGRE

2015

Carolina Saibro Girardi

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO E DA LOCALIZAÇÃO
CELULAR DOS RECEPTORES DE RETINOIDES
DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL INDUZIDA
PELO ÁCIDO RETINOICO**

Trabalho de Conclusão apresentado ao
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito para a obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia Molecular.

Orientador:

Professor Dr. Daniel Pens Gelain

PORTO ALEGRE

2015

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Dr. Daniel Gelain, pela oportunidade de trabalhar em um grupo e em um projeto dos quais tenho grande satisfação em fazer parte e pelo interesse e suporte ao longo da realização do trabalho.

Aos membros do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da Universidade, que, direta ou indiretamente, foram muito importantes para a minha formação durante a Iniciação Científica. Em especial, ao Me. Juciano Gasparotto, a quem devo a maior parte da experiência adquirida em laboratório nesse período.

À Ma. Thallita Rabelo e à Dra. Florência Balbé-Tuana, que me auxiliaram diretamente na realização dos experimentos do presente trabalho e foram fundamentais para a conclusão do mesmo.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Laura Elena Sperling e Dra. Diana Carolina Rostirolla, pelas contribuições, pela disponibilidade e pela enorme gentileza.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS (Propesq-UFRGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), seja pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa ou pelas bolsas fornecidas ao longo da minha graduação.

A todos os que forneceram apoio e compartilharam comigo a realização desse trabalho, o meu muito obrigada.

Resumo

O ácido retinoico, um dos principais metabólitos da vitamina A e um importante morfógeno do sistema nervoso no desenvolvimento, promove a diferenciação e a parada no ciclo celular de células indiferenciadas principalmente por intermédio de receptores nucleares: os RARs (α , β e γ) e os RXRs (α , β e γ). Visando a melhor compreensão dos mecanismos moleculares por trás dos efeitos do ácido retinoico, foi investigada a modulação da expressão e da localização celular dos receptores de retinoides durante a diferenciação neuronal induzida pelo composto na linhagem derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A análise por *western blot* e RT-PCR quantitativo revelou que as diferentes isoformas de RAR e de RXR apresentam níveis variáveis de expressão durante a diferenciação neuronal e a análise por microscopia de imunofluorescência sugeriu o recrutamento da isoforma RAR β para o núcleo diante do estímulo pelo AR. Os resultados evidenciam, assim, a modulação da disponibilidade dos receptores de retinoides durante o tratamento com AR em SH-SY5Y, a qual pode ser essencial no controle da diferenciação neuronal.

Palavras-chave: Diferenciação neuronal, Ácido retinoico, SH-SY5Y, RAR, RXR.

Abstract

Retinoic acid is one of major metabolites of vitamin A and an important morphogen of the nervous system, which promotes differentiation and cell cycle arrest in undifferentiated cells mainly through nuclear receptors: the RARs (α , β and γ) and RXRs (α , β and γ). To clarify the molecular mechanisms underlying retinoic acid effects, the modulation of retinoid receptors expression and cellular localization during retinoic acid-mediated neuronal differentiation was investigated in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Western blot and quantitative RT-PCR analysis showed that distinct RAR and RXR isoforms feature varying degrees of expression through neuronal differentiation and immunofluorescence microscopy suggested RAR β recruitment into the nucleus in response to retinoic acid stimulus. Therefore, modulation of retinoid receptors availability following retinoic acid treatment in SH-SY5Y cells is evidenced, and it may play essential roles in neuronal differentiation.

Keywords: Neuronal differentiation, Retinoic Acid, SH-SY5Y, RAR, RXR.

Lista de Abreviaturas

| | |
|----------|--|
| AR | Ácido Retinoico |
| BDNF | <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> |
| BSA | Albumina de Serum Bovino |
| CDK | <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> |
| ChIP-seq | <i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i> |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-Fenilindol Dicloridrato |
| DBD | Domínio de Interação ao DNA |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ER | <i>Estrogen Receptor</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase |
| GDNF | <i>Glial-Derived Neurotrophic Factor</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| LBD | Domínio de Interação ao Ligante |
| LXR | <i>Liver X Receptor</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> |
| NFκB | <i>Nuclear Factor κB</i> |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> |
| NRF2 | <i>Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2</i> |
| NTD | Domínio N-terminal |
| PBS | Tampão Fosfato-Salino |
| PI3K | <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> |
| PKA | <i>Protein Kinase A</i> |
| RAR | <i>Retinoic Acid Receptor</i> |

| | |
|---------|---|
| RARE | Elemento Responsivo ao Ácido Retinoico |
| ROX | Espécies Reativas de Oxigênio |
| RR | Receptor de Retinoide |
| RT-qPCR | <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| RXR | <i>Retinoid X Receptor</i> |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |
| TH | Tirosina Hidroxilase |
| VDR | <i>Vitamin D₃ Receptor</i> |

Lista de Figuras

| | | |
|----------|--|----|
| Figura | Protocolo de diferenciação neuronal induzida pelo ácido retinoico em SH-SY5Y..... | 14 |
| Figura 2 | Morfologia das células SH-SY5Y diferenciadas..... | 17 |
| Figura 3 | Expressão dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação mediada pelo ácido retinoico..... | 18 |
| Figura 4 | Localização celular dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação mediada pelo ácido retinoico..... | 20 |
| Figura 5 | Ativação rápida de ERK induzida pelo ácido retinoico em SH-SY5Y..... | 26 |

Sumário

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 | Ácido Retinoico | 9 |
| 1.2 | Receptores de Retinoides | 10 |
| 2 | OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 | Objetivos Específicos | 12 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 13 |
| 4 | METODOLOGIA | 14 |
| 4.1 | Cultura Celular | 14 |
| 4.2 | Diferenciação Neuronal | 14 |
| 4.3 | RT-qPCR | 14 |
| 4.4 | <i>Western Blot</i> | 15 |
| 4.5 | Microscopia de Imunofluorescência | 15 |
| 4.6 | Análise Estatística | 16 |
| 5 | RESULTADOS E CONCLUSÕES..... | 17 |
| 5.1 | Modulação da Expressão dos Receptores de Retinoides | 17 |
| 5.2 | Modulação da Localização Celular dos Receptores de Retinoides | 19 |
| 6 | DISCUSSÃO | 21 |
| 6.1 | Modulação dos Receptores de Retinoides..... | 21 |
| 6.2 | Receptores de Retinoides e Vias Não Genômicas..... | 25 |

1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento populacional, que atinge diversos países atualmente e que tende a se intensificar nas próximas décadas principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (Shetty, 2012), representa um desafio aos sistemas de saúde e torna relevantes os estudos relativos às doenças crônicas associadas ao envelhecimento. Entre elas estão as doenças neurodegenerativas, as quais estão relacionadas com a perda neuronal e podem implicar no prejuízo das funções motora e cognitiva dos pacientes.

Os tratamentos atualmente empregados contra as doenças neurodegenerativas, com enfoque no combate aos sintomas, costumam deixar de fazer efeito e apresentar efeitos adversos com a progressão da doença. Assim, novas abordagens terapêuticas que visem a reposição da função neuronal, como o transplante celular e como a indução da diferenciação das células-tronco neurais endógenas, constituem as alternativas mais promissoras para o combate às doenças neurodegenerativas. No entanto, tanto estudos em animais quanto estudos clínicos têm demonstrado eficácia variável dessas abordagens (Barker *et al.*, 2015; Kimbrel e Lanza, 2015), sendo necessário o refinamento dessas terapias e a maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação neuronal.

A diferenciação *in vitro* de células com potencial neurogênico é, atualmente, a principal estratégia empregada na investigação dos mecanismos moleculares da diferenciação neuronal, e a cultura de linhagens celulares têm sido amplamente utilizadas com esse fim (Abemayor e Sidell, 1989; Pålman *et al.*, 1990; Agholme *et al.*, 2010). Para a diferenciação são utilizados fatores capazes de induzir parâmetros funcionais e morfológicos característicos de neurônios adultos, tais como o AR e neurotrofinas como o NGF, o GDNF e o BDNF.

1.1 Ácido Retinoico

A vitamina A (retinol) e seus metabólitos ativos (denominados coletivamente como retinoides) são responsáveis pela morfogênese e homeostase em diversos tecidos nos vertebrados. Entre os mais notáveis metabólitos da vitamina A está o AR: necessário para a neurogênese primária, é considerado fator fundamental para a transformação da neuroectoderme posterior após a indução neural, além de atuar no estabelecimento de linhagens neuronais e de controlar a expressão de genes envolvidos nas suas funções (Zile, 2001; Malaspina *et al.*, 2003; Duester, 2008). O AR tem sido amplamente empregado *in vitro* por suas habilidades em induzir diferenciação, em inibir a proliferação celular e em regular a apoptose em diversos tipos celulares (Noy, 2010; Janesick *et al.*, 2015), características que tornam o AR

uma molécula de interesse clínico, útil em protocolos de diferenciação visando reposição funcional e, até mesmo, em tratamentos de combate a neoplasias.

Diferentemente de outros fatores proteicos envolvidos na diferenciação neuronal, o AR é uma pequena molécula lipofílica capaz de difundir-se através das membranas celulares e que tem a maior parte de seus efeitos mediados por receptores nucleares, os RARs e os RXRs, que atuam classicamente por regulação transcricional. Entre os efeitos genômicos do AR estão desde a regulação de genes relacionados aos primeiros estágios do desenvolvimento, como os genes Hox, até a regulação de genes envolvidos com a diferenciação de precursores neurais, como os genes Pax6 e Olig2 (Duester, 2008). Estudos *in vitro* também indicam a importância do AR para a modulação de genes relacionados à função neuronal *in si* (Kumar *et al.*, 2007; Korecka *et al.*, 2013), e de genes envolvidos com a sobrevivência neuronal, como os genes p53 e Bcl-2 (Noy, 2010; Pasquali *et al.*, 2014).

Além disso, surgem cada vez mais evidências da capacidade dos retinoides em provocar efeitos rápidos, extranucleares e não-transcricionais. Esses efeitos têm se mostrado importantes para a diferenciação neuronal e evidenciam a presença de componentes não genômicos na regulação dos efeitos do AR.

1.2 Receptores de Retinoides

Os RARs e os RXRs, presentes nas isoformas α , β e γ , são considerados os principais mediadores dos efeitos do AR. Da família dos receptores nucleares hormonais, atuam classicamente como fatores transcricionais ativados por ligante: quando ativos, modulam a expressão de genes responsivos a retinoides por meio da interação com elementos responsivos (denominados RAREs) nas regiões promotoras de genes alvos.

Os RRs promovem os efeitos genômicos do AR por meio de complexas vias de transdução de sinal, que dependem da formação de homo e heterodímeros entre as isoformas de RARs e RXRs e da participação de cofatores importantes para modificações na compactação da cromatina e na arquitetura do DNA. Além disso, os RRs têm sido também relacionados aos efeitos rápidos e independentes de transcrição do AR. Apesar de o papel isolado dos receptores ser pouco compreendido, sabe-se que a presença de múltiplas isoformas é uma das principais responsáveis pela diversidade de possibilidades na regulação das vias de transdução de sinal do AR.

Visando, assim, investigar a modulação da presença dos RRs, foi realizada a caracterização da expressão e da localização celular das diferentes isoformas ao longo da

diferenciação neuronal induzida pelo AR. Para isso, foram utilizadas as células derivadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y, amplamente utilizadas como modelo neuronal *in vitro* (Constantinescu *et al.*, 2007; Agholme *et al.*, 2010). Isoladas a partir de células neurais neoplásicas imaturas, são capazes de se diferenciar diante de uma série de estímulos e de apresentar características de neurônios dopaminérgicos adultos, sendo úteis, particularmente, para estudos relativos à doença de Parkinson (Xie *et al.*, 2010). Diante do tratamento com AR, as células SH-SY5Y são capazes de superexpressar uma série de marcadores neuronais, inclusive a enzima TH, determinante para o fenótipo dopaminérgico (Lopes *et al.*, 2010; Korecka *et al.*, 2013; Pasquali *et al.*, 2014), sendo de grande utilidade, assim, para o estudo dos mecanismos da diferenciação mediada pelo AR.

2 OBJETIVOS

Investigar os mecanismos moleculares da diferenciação neuronal mediada pelo AR em modelo SH-SY5Y no que diz respeito à modulação dos seus receptores durante o processo.

2.1 Objetivos Específicos

- i. Investigar a ocorrência de modulação da expressão dos RRs pela caracterização dos níveis dos transcritos e do imunoconteúdo das diferentes isoformas de RARs e RXRs ao longo da diferenciação induzida pelo AR;
- ii. Avaliar a ocorrência de modulação da localização celular dos RRs ao longo da diferenciação mediada pelo AR por análise de imunofluorescência.

3 JUSTIFICATIVA

A elucidação de mecanismos moleculares envolvidos no controle da diferenciação neuronal mediada pelo AR, com o estabelecimento dos detalhes acerca da modulação de proteínas reguladoras do processo, fornecerá novos alvos moleculares para o desenvolvimento e otimização de terapias de reposição da função neuronal.

No caso, a compreensão da forma como o AR é capaz de regular de maneira diferencial as isoformas de seus próprios receptores em modelo SH-SY5Y fornece novas ferramentas para o entendimento dos mecanismos moleculares necessários à diferenciação neuronal e para a melhor compreensão dos papéis que essas isoformas podem desempenhar ao longo do processo. Essas descobertas, em conjunto, têm potencial de aplicação em protocolos de diferenciação neuronal visando a reposição funcional em doenças neurodegenerativas, dado que os níveis e a ativação dos RRs podem ser manipulados *in vitro*, por meio de silenciamento ou superexpressão das isoformas ou de tratamento com retinoides com afinidades específicas.

4 METODOLOGIA

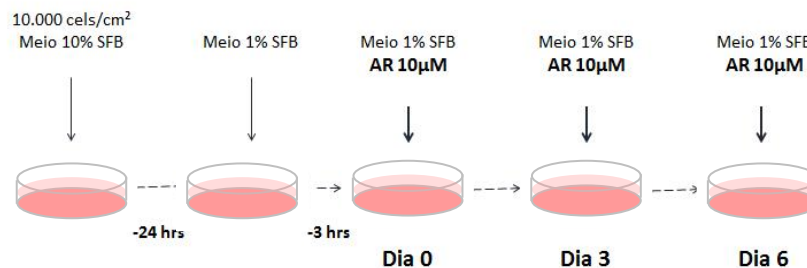
4.1 Cultura Celular

As células da linhagem SH-SY5Y provenientes da Coleção Europeia de Cultura Celular foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1) contendo SFB 10% e mantidas em estufa a 37°C e CO₂ 5%. As passagens foram realizadas quando atingida cerca de 90% de confluência celular, e as trocas de meio foram realizadas a cada dois dias. Para os experimentos foram utilizadas células entre 25 e 30 passagens.

4.2 Diferenciação Neuronal

As células SH-SY5Y foram semeadas em placas de cultura na confluência de 10 mil células/cm² em meio DMEM/F12 SFB 10% e, após 24 horas, foram submetidas ao protocolo de diferenciação neuronal. Após três horas de ambientação no meio de tratamento, DMEM/F12 SFB 1%, foi adicionado AR na concentração final de 10µM e, a cada três dias, foi realizada a troca de meio contendo o composto. Como controle foi mantido, também, um grupo tratado com o veículo do AR (DMSO) em meio DMEM/F12 SFB 1%. As células foram coletadas no dia zero, após a ambientação e anteriormente à adição de AR, e nos dias um, quatro e sete de diferenciação, após as trocas de meio.

Figura 1 – Protocolo de diferenciação neuronal induzida pelo ácido retinoico em SH-SY5Y.



Fonte: Elaborado pela autora (2015).

4.3 RT-qPCR

O RNA total das células SH-SY5Y foi isolado com reagente TRIzol® (Invitrogen, ref. 15596-026) e quantificado por meio de biofotômetro. Após síntese de cDNA pelo *kit* comercial SuperScript III (Invitrogen, ref. 11752-050), as reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com a utilização do *kit* comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ref. 4367659). Para a amplificação do cDNA de *rara* foram utilizados os *primers* direto 5' CGAGCAGGACACCATGAC e reverso 5' GCGAAGGCAAAGACCAGG, com um

amplicon esperado de 102 pb; para *rarβ*, os *primers* direto 5' GTTTGCTAAACGTCTGCCTG e reverso 5' TCATGGTGTCTTGTCTGGG, com um *amplicon* esperado de 131 pb; para *rary*, os *primers* direto 5' ATGAAAATCACCGACCTCGG e reverso 5' TTTCAGGGTTCTCCAGCATG, com um *amplicon* esperado de 121 pb; para *rxra*, os *primers* direto 5' AGGACTGCCTGATTGACAAG e reverso 5' GACTCCACCTCATTCTCGTTC, com um *amplicon* esperado de 142 pb; e para *rxrβ*, os *primers* direto 5' GACCTTACATACTCTTGCCGG e reverso 5' CATCCCCATCCTTGTCCTTTC, com um *amplicon* esperado de 160 pb. O gene endógeno utilizado foi o *gapdh*, amplificado com os *primers* direto 5' CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA e reverso 5' GCCAGTAGAGGCAGGGAT-GATGTTG, com um *amplicon* esperado de 251 pb.

4.4 Western Blot

Para a avaliação do imunoconteúdo foi realizada a lise das células SH-SY5Y por meio de tampão RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, IGEPAL® 1% v/v, sais biliares 0,5% m/v, SDS 0,1% m/v), seguida da quantificação proteica pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Após normalização e adição de tampão Laemmli (62.5 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, SDS 1%, glicerol 10% e β-mercaptoetanol 10%), os lisados celulares foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em tampão Tween-TBS (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 0,9% e Tween®-20 0,1%) contendo 5% de leite desnatado em pó durante uma hora para bloqueio, seguido de incubação com os anticorpos primários contra RARα (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-551), RARβ (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-552), RARγ (Abcam, ref. ab97569), RXRα (Cell Signaling, ref. 5388S), RXRβ (Cell Signaling, ref. 8715S) e β-Actina (Cell Signaling, ref. 4967S) durante 15 horas a 4°C e posterior incubação com os anticorpos secundários acoplados à peroxidase durante uma hora. Os anticorpos foram preparados em Tween-TBS e, no caso dos secundários, com a adição de 5% de leite desnatado em pó. A detecção da emissão de quimioluminescência foi realizada em fotodocumentador (ImageQuant LAS 400, GE Healthcare Life Sciences).

4.5 Microscopia de Imunofluorescência

As células SH-SY5Y na placa de cultura foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos e permeabilizadas com Triton 0,2% em PBS durante 30 minutos. Após bloqueio com solução de BSA 1% em PBS durante 30 minutos, foi realizada incubação com os anticorpos primários contra RARα (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-551), RARβ (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-552) e RARγ (Abcam, ref. ab97569) durante 15 horas a 4°C seguida da

incubação com os anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 488 (Life Technologies, ref. 982425) durante duas horas, todos preparados em BSA 1% em PBS. Após incubação com corante DAPI durante cinco minutos, as imagens foram obtidas por meio de microscópio de fluorescência (EVOS® FLoid® Cell Imaging Station, Life Technologies) e analisadas no *software* ImageJ.

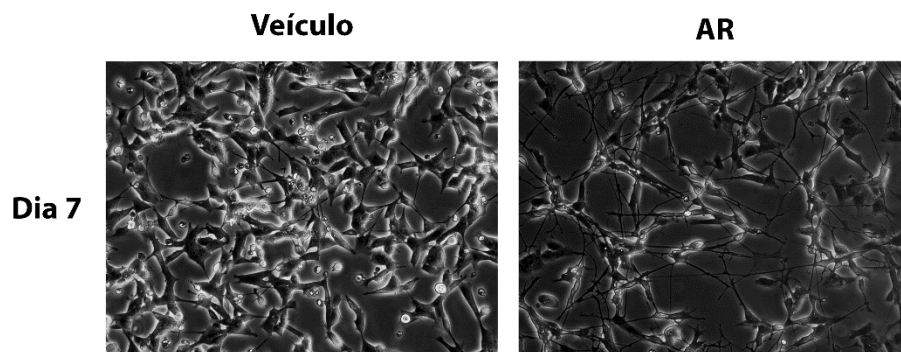
4.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey, com a utilização do *software* GraphPad Prism 6. Nas quantificações foi utilizado n de três e, quando necessário, foi realizada transformação logarítmica dos dados previamente às análises estatísticas.

5 RESULTADOS E CONCLUSÕES

Foi realizada a caracterização dos níveis de expressão e da localização celular de diferentes isoformas de RARs e RXRs ao longo da diferenciação induzida pelo AR em células SH-SY5Y. As células foram coletadas ao longo da diferenciação, nos dias um (Dia 1), quatro (Dia 4) e sete (Dia 7), sempre após as trocas de meio e em conjunto com células que foram, paralelamente, tratadas com o veículo DMSO, para fins de comparação. Como controle, foram utilizadas células proliferativas (Dia 0), apenas ambientadas no meio de tratamento – para que efeitos decorrentes da troca do meio não sejam confundidos com efeitos do AR. Diante da adição de AR 10 μ M, as células têm sua taxa proliferativa diminuída e iniciam modificações morfológicas características de neurônios adultos, que ficam claras ao fim de sete dias de diferenciação (Figura 2).

Figura 2 – Morfologia das células SH-SY5Y diferenciadas.

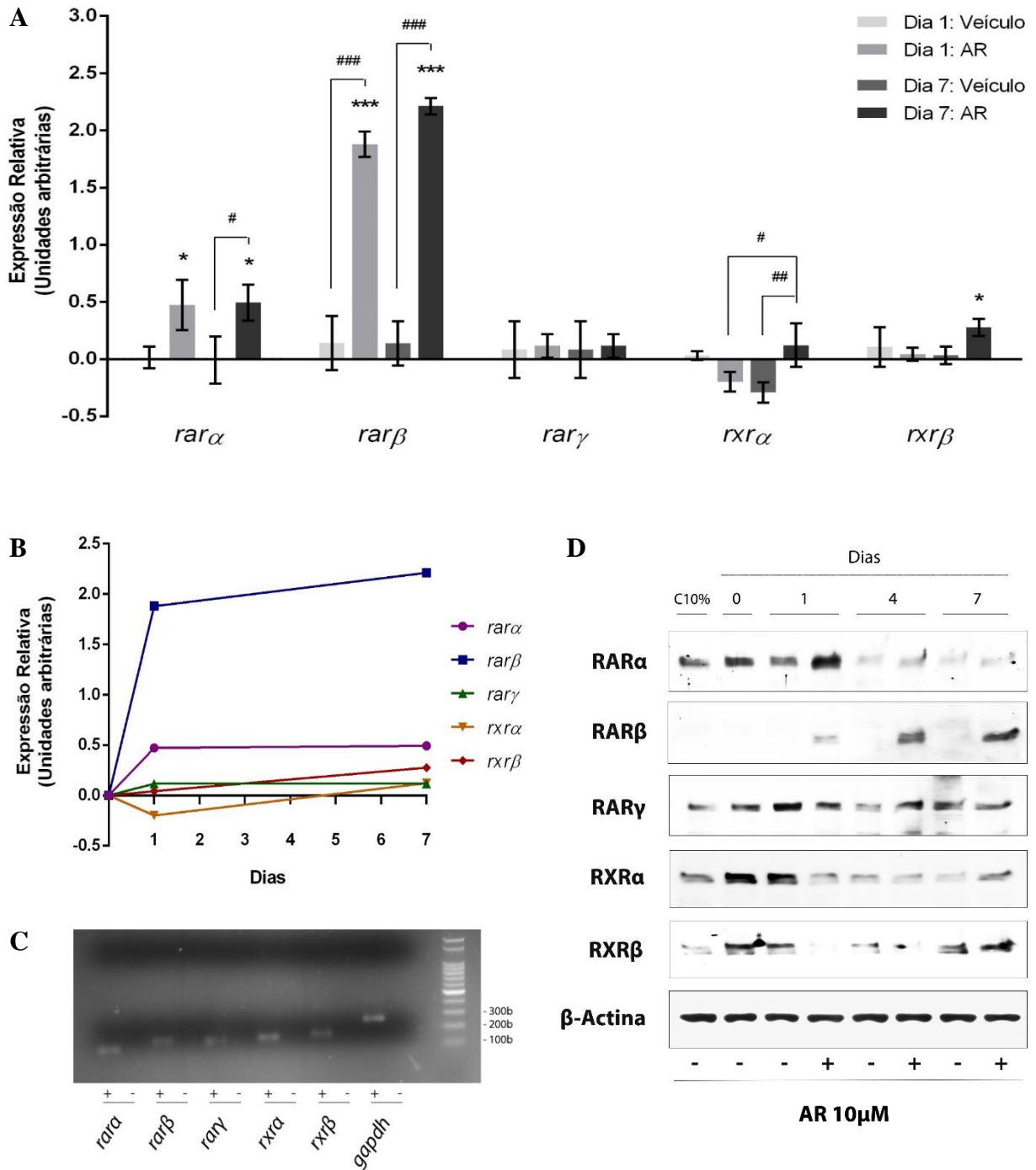


Fonte: elaborado pela autora (2015).

5.1 Modulação da Expressão dos Receptores de Retinoides

A determinação da expressão dos transcritos dos RRs revelou níveis variados de mRNA ao longo da diferenciação neuronal (Figura 3). As isoformas *rara* e *rar β* demonstraram aumento de expressão diante do tratamento com AR, tanto no início quanto no fim da diferenciação; o gene *rara* foi expresso cerca de três vezes mais diante do tratamento, enquanto a expressão do *rar β* sofreu um aumento de até de 150 vezes no sétimo dia de diferenciação. A análise por RT-qPCR também demonstrou a manutenção dos níveis baixos de transcritos de *rxra* e *rxr β* no primeiro dia de tratamento com AR, seguida do aumento da expressão dos receptores ao fim do processo; não foi observado, no entanto, variação na expressão de *rarg* (3.A e 3.B). A amplificação específica foi confirmada na curva de *melting* do qPCR (dado não exposto) e na

Figura 3 - Expressão dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação mediada pelo ácido retinoico.



(A) (B) RT-PCR quantitativo das isoformas *rara*, *rarβ*, *rarγ*, *rxra* e *rxrβ*, expresso em termos de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Valores de expressão normalizados por *gapdh*, relativos ao grupo controle (Dia 0) e transformados para escala logarítmica. * indica $p < 0,05$ e *** indica $p < 0,001$ em relação ao Dia 0. # indica $p < 0,05$; ## indica $p < 0,01$ e ### indica $p < 0,001$ em relação aos demais grupos indicados. (C) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação por RT-qPCR das isoformas *rara*, *rarβ*, *rarγ*, *rxra*, *rxrβ* e de *gapdh*. O tamanho dos fragmentos foi confirmado em 102, 131, 121, 14, 160 e 251pb, respectivamente. (D) Imunoconteúdo de RARα, RARβ, RARγ, RXRα and RXRβ ao longo da diferenciação, com células proliferativas usadas como controle (C_{10%}) e células ambientadas com meio 1% SFB antes do tratamento (0).

Fonte: elaborado pela autora (2015).

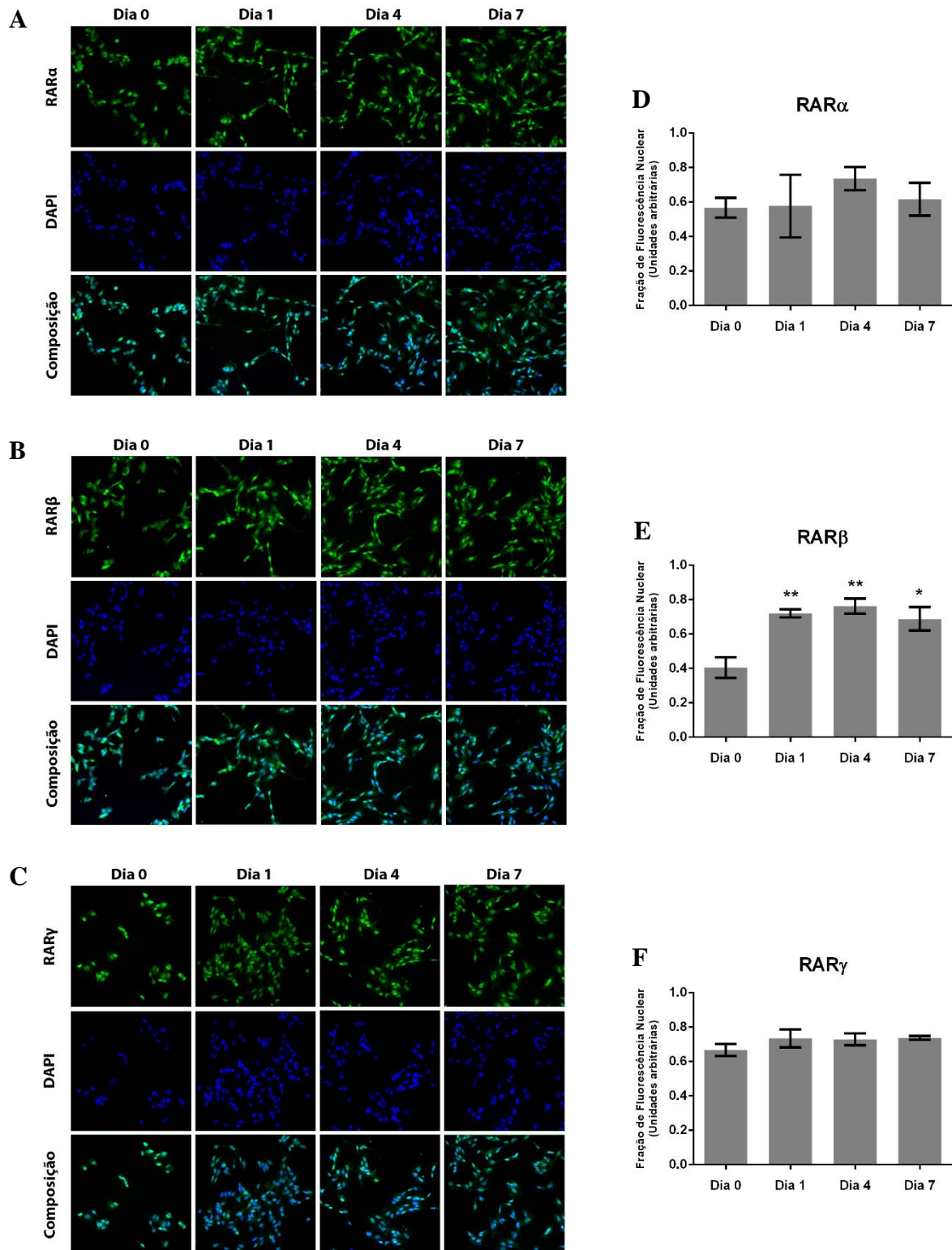
eletroforese realizada com os produtos finais da amplificação, que demonstrou a presença de *amplicons* específicos com os tamanhos esperados (3.C).

A expressão dos RRs também foi analisada quanto ao imunoconteúdo dos mesmos ao longo da diferenciação (3.D). Foi observado que a regulação positiva da transcrição de *rarβ* foi acompanhada do aumento do imunoconteúdo de RARβ ao longo de toda a diferenciação, enquanto a regulação positiva de *rara* implicou no aumento de RARα no primeiro dia do tratamento com AR, mas não nos dias seguintes. No caso dos RXRs, foi observada a diminuição do imunoconteúdo de ambas as isoformas no primeiro dia da diferenciação; ao final do processo, no entanto, o aumento observado na expressão de *rxra* e *rxrβ* parece ser traduzido no aumento da presença dos receptores. A isoforma RXRγ também foi analisada quanto ao imunoconteúdo e não foi detectada (dado não exposto). É notável, também, a capacidade da ambientação no meio contendo SFB 1% em induzir o aumento do imunoconteúdo dos RXRs quando comparado às células com meio contendo SFB 10%.

5.2 Modulação da Localização Celular dos Receptores de Retinoides

A análise por imunofluorescência indicou a localização celular das isoformas de RARα, RARβ e RARγ (Figura 4). A localização das isoformas RARα e RARγ manteve-se preferencialmente nuclear ao longo de toda a diferenciação (4.A e 4.C), com sinal de fluorescência nuclear em torno de 60 e 70%, respectivamente (4.B e 4.F). No caso do RARβ, no entanto, observa-se o aumento do sinal nuclear no início do processo de diferenciação (4.B); de 40%, o sinal passa para cerca de 70% logo no início do tratamento (4.E), o que sugere o recrutamento do receptor para o núcleo em função do estímulo por AR.

Figura 4 – Localização celular dos receptores de retinoides ao longo da diferenciação mediada pelo ácido retinoico.



Imunofluorescência das células marcadas com anticorpo contra (A) RAR α , (B) RAR β e (C) RAR γ ao longo da diferenciação. O núcleo celular foi corado com DAPI e a composição das imagens foi obtida pelo *software* ImageJ. A quantificação do sinal de fluorescência nuclear de (D) RAR α , (E) RAR β e (F) RAR γ ao longo da diferenciação foi obtido no mesmo *software*, pela média da razão entre a fluorescência nuclear e a fluorescência total celular. * indica $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$ em relação ao Dia 0.

Fonte: elaborado pela autora (2015).

6 DISCUSSÃO

Os avanços na biologia molecular ocorridos nas últimas décadas forneceram meios para a melhor compreensão da dinâmica de transdução de sinal que possibilita os diversos efeitos celulares do AR, principalmente no que diz respeito aos seus receptores. A caracterização da estrutura de RARs e RXRs, a compreensão das peculiaridades das múltiplas isoformas, a descoberta da participação de diversos corretores e a investigação das funções específicas tanto das isoformas isoladas quanto dos pares de dímeros por meio de *knockout* gênico forneceram diversas respostas acerca dos mecanismos moleculares por trás dos efeitos dos retinoides. No entanto, essas descobertas, somadas à mais recente caracterização de mecanismos não genômicos, mostraram também a grande complexidade envolvida na transdução de sinal do AR e levantaram novas questões que restam, ainda, ser respondidas.

6.1 Modulação dos Receptores de Retinoides

Os receptores RAR e RXR são codificados por genes distintos, sendo que suas isoformas α , β e γ são geradas por *splicing* alternativo e pelo uso de diferentes promotores (Chiba *et al.*, 1997; Zechel, 2005). Membros da família dos receptores nucleares hormonais, eles atuam principalmente como fatores de transcrição ativados por ligante e são caracterizados por estruturas bem conservadas: o domínio carboxi-terminal, de interação com o ligante (LBD), o domínio central de interação ao DNA (DBD) e o domínio amino-terminal altamente variável (NTD).

Os RARs são ativados pelas diferentes formas isoméricas do AR e, quando ativos, sofrem mudanças conformacionais que permitem a dimerização com outros receptores, tornando-se capazes de interagir com RAREs e de promover as respostas transcricionais induzidas pelo AR. Já os RXRs mostram-se passíveis de ativação principalmente pelo isômero 9-*cis*-AR, cuja concentração atinge níveis significativos apenas diante de doses farmacológicas de AR (na faixa de micromols/L). Assim, é sugerido que seu papel fisiológico seja devido principalmente ao fato de os RXRs ocorrerem como parceiros de heterodimerização para os RARs - e para outros múltiplos receptores nucleares -, servindo como reguladores das vias transcricionais induzidas pelo AR; não é excluída, no entanto, a hipótese de que esses receptores possam ser ativados por outros retinoides (Pérez *et al.*, 2012).

As respostas transcricionais mediadas pelo AR são determinadas, em grande parte, pelo perfil de isômeros que compõem os homo ou heterodímeros formados pelos RRs, podendo envolver, ainda, a dimerização desses receptores com outros receptores nucleares, como o

PPAR (Noy, 2010). Além disso, as diferentes isoformas contam com uma série de proteínas correguladoras, importantes para o remodelamento da cromatina e para a estabilização da maquinaria de transcrição. Assim, a presença de múltiplas isoformas na transdução de sinal do AR fornece diversas possibilidades na regulação da mesma, e a disponibilidade dessas isoformas é um fator determinante para as respostas celulares induzidas pelo AR. Apesar de ocorrerem funções redundantes, os diferentes RARs e RXRs são conservados na evolução dos vertebrados e apresentam diferentes padrões de expressão espaço-temporais no desenvolvimento e nos tecidos adultos, o que indica a presença de funções específicas (Dollé *et al.*, 1990; Chambon, 1994).

A capacidade do AR em regular de maneira diferencial a expressão das isoformas de seus próprios receptores tem sido investigada tanto em modelos *in vitro* quanto ao longo do desenvolvimento. A descrição de RAREs na região regulatória de *rar* já indicava a presença modulação cruzada entre os RRs (De Thé *et al.*, 1990; Chambon, 1996) e, de fato, a auto-indução da expressão dos receptores já foi descrita experimentalmente em algumas linhagens. Além disso, é provável ainda que a modulação da expressão dos RRs induzida pelo AR envolva outros fatores: sabe-se que o tratamento com o composto é capaz de regular fatores de transcrição diversos, como NF- κ B e Nrf2 (Pasquali *et al.*, 2014), e microRNAs também são descritos como atuantes na regulação da expressão gênica induzida pelo AR em nível de tradução (Zhang *et al.*, 2015).

Análises preliminares do grupo de pesquisa do qual faço parte, a partir de dados de microarranjo disponíveis em banco de dados público (Nishida *et al.*, 2008), já indicavam os resultados agora obtidos experimentalmente a partir de RT-qPCR e *Western Blot*. Em relação às células SH-SY5Y em estágios mais avançados de diferenciação, o presente trabalho demonstrou que os níveis de expressão de *rara*, *rar β* , *rxra* e *rxr β* encontram-se superiores aos níveis das células não diferenciadas – apesar de, no caso do RAR α , o aumento da expressão de transcritos não ter tido reflexo no imunoconteúdo. Os dados são compatíveis com o fato de as isoformas serem amplamente expressas no desenvolvimento e nos tecidos adultos e com estudos que demonstram a importância da expressão dos RRs para a função neuronal: a deleção de isoformas específicas em camundongos resultou em prejuízos cognitivos e RAR β mostrou-se necessário para a formação tanto de LTPs quanto de LTDs (Chiang *et al.*, 1998), por exemplo. Além disso, os resultados corroboram com a noção de que os RRs são importantes para a manutenção do estado diferenciado em si: níveis aberrantes de expressão dos receptores são observados em células tumorais – a diminuição da expressão de RAR β , por exemplo, é

associada à iniciação tumoral (Xu *et al.*, 1994 ; Lotan, 1996; Xu, 2001; Lai *et al.*, 2014) – e a deficiência de vitamina A, *in vivo*, caracteriza-se pelo aumento da incidência de câncer (Sun e Lotan, 2002). A isoforma RAR γ , no entanto, não demonstrou variação tanto em nível de RNA quanto de imunocontéudo em SH-SY5Y, apesar de a isoforma ter a transcrição aumentada em outras linhagens celulares diante do tratamento com AR (Wu *et al.*, 1992; Wan *et al.*, 1998 ; Zechel, 2005). No caso da isoforma RXR γ , não houve detecção da mesma pelo ensaio por *Western Blot*. A isoforma parece exercer papéis essenciais em regiões específicas do SNC (Wietrzych *et al.*, 2005), mas, ao contrário dos demais RXRs, o receptor tem padrão de expressão bastante restrito no desenvolvimento.

Já os dados de expressão relativos ao início do tratamento são importantes para esclarecer processos necessários à iniciação da diferenciação neuronal. A rápida regulação positiva das isoformas de RARs diante do tratamento com AR é compatível com outras observações *in vitro*: foi descrito o aumento da expressão de transcritos em linhagens de carcinoma (Wu *et al.*, 1992; Zechel, 2005), em linhagens de hepatoma (De Thé *et al.*, 1989; Wan *et al.*, 1998) e em células de Schwann (Latasa e Cosgaya, 2011). A iniciação da diferenciação mediada pelo AR, inclusive, mostra-se dependente da atividade dos RARs em algumas linhagens (Rochette-Egly e Chambon, 2001; Zechel, 2005).

A caracterização da modulação da expressão dos RXRs, entretanto, conta com dados bem mais restritos na literatura. A demonstração da diminuição no imunocontéudo de RXRs – que, no entanto, não foi observada em nível de RNA mensageiro – revela a ocorrência de regulação diferencial de RARs e RXRs diante do tratamento com AR e pode auxiliar a compreensão dos papéis desses receptores considerados auxiliares, envolvidos principalmente na regulação da transdução do sinal dos retinoides. Observação semelhante à diminuição do imunocontéudo de RXR α e RXR β em células SH-SY5Y foi feita em células de Schwann, que são células gliais responsáveis pela formação da bainha de mielina no SNP (Latasa e Cosgaya, 2011), onde houve a diminuição da expressão das isoformas de RXRs diante do tratamento com AR. Além disso, o aumento da expressão da isoforma RXR α foi associado ao aumento da taxa proliferativa em linhagem derivada de hepatoma (Wua *et al.*, 2004), podendo indicar que a diminuição do imunocontéudo de RXR α observado em SH-SY5Y no início da diferenciação pode ser importante para a parada no ciclo celular dessas células. É necessário, no entanto, confirmar se essa diminuição ocorre apenas em nível de imunocontéudo nas células SH-SY5H ou se envolve regulação transcricional, da mesma maneira que ocorre com o aumento dos RXRs em estágios mais avançados da diferenciação.

Os heterodímeros (RARs/RXR) têm sido indicados como as unidades funcionais preferencialmente responsáveis pela transdução de sinal do AR (Roy *et al.*, 1995; Chiba *et al.*, 1997; Kastner *et al.*, 1997; Zechel, 2005; Chatagnon *et al.*, 2015) e, recentemente, foi demonstrado por meio de ChIP-seq que o tratamento com AR em linhagem de carcinoma promove a substituição de homodímeros RXR/RXR por heterodímeros RAR/RXR nas regiões genômicas moduladas pelo AR (Chatagnon *et al.*, 2015). A modificação da disponibilidade de isoformas pode ser um fator importante para determinar a mudança no perfil de dímeros de RRs e a modulação da expressão dos receptores, com a diminuição da expressão das isoformas de RXR e o aumento das isoformas de RARs no início da diferenciação, pode auxiliar na compreensão desse fenômeno.

Além da expressão dos RRs, a disponibilidade dos mesmos para exercer os diversos efeitos do AR também é definida pela sua localização celular. Atuantes principalmente como fatores transcricionais, os receptores encontram-se preferencialmente no núcleo e possíveis modificações no padrão de localização celular têm influência direta na atividade transcricional e na interação dos mesmos com proteínas regulatórias.

A localização celular de alguns receptores nucleares já mostrou-se passível de modulação: é observada a translocação de VDR para o núcleo diante do tratamento com vitamina D (Gocek *et al.*, 2007; Gocek *et al.*, 2008) e o recrutamento de ER β para membrana plasmática induzido por estrogênio (Sheldahl *et al.*, 2008), e a regulação da localização desses receptores parece depender de mecanismos rápidos e não transcricionais. O recrutamento de RAR β para o núcleo diante do tratamento com AR em SH-SY5Y, sugerido pela análise por imunofluorescência, é compatível com os dados que demonstram a importância da atividade transcricional de RAR β na diferenciação. Será necessário, todavia, a confirmação da mudança na localização celular do receptor diante do estímulo por AR por meio de outras metodologias e será interessante, também, verificar a localização celular dos RXRs ao longo da diferenciação neuronal.

A partir dos resultados aqui obtidos, será possível verificar a real função da modulação dos RRs para a diferenciação neuronal. Abordagens que envolvam o silenciamento de isoformas ou a utilização de retinoides capazes de ativar isoformas específicas configuram-se como as principais estratégias para a compreensão funcional *in vitro*. Além disso, a caracterização da modulação dos RRs e da sua importância para a diferenciação neuronal pode auxiliar a compreensão da relação entre os receptores e as vias independentes de transcrição do AR.

6.2 Receptores de Retinoides e Vias Não Genômicas

A identificação de efeitos independentes de transcrição induzidos por moléculas lipofílicas acrescentou ainda mais complexidade aos mecanismos regulatórios dos receptores nucleares (Lösel e Wehling, 2003). Essas descobertas abriram portas para o estudo de novos alvos moleculares envolvidos nos mais diversos processos induzidos por essas moléculas, incluindo a diferenciação neuronal mediada pelo AR.

Os retinoides mostram-se capazes de promover, por exemplo, a ativação rápida de vias de sinalização celular em linhagem derivada de câncer de pulmão (A549), em linhagens derivadas de neuroblastoma humano e em cultura primária de células de Sertoli, modulando a ativação da via das MAPKs, incluindo suas subfamílias ERK1/2, p28 e JNK, e a via de PI3K/Akt, as quais são consideradas importantes para o controle do ciclo celular, para a sobrevivência da célula e para a promoção de modificações morfológicas no processo de diferenciação (Zanotto-Filho et al., 2008; Gelain et al., 2012; Qiao et al., 2012 ; García-Regalado et al., 2013). Os retinoides são descritos também como moléculas redox-ativas, capazes de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio na célula e de modular fatores do metabolismo redox (Gelain *et al.*, 2008; Pasquali *et al.*, 2008; Frota Junior *et al.*, 2011), o que indica a presença de componentes redox-sensíveis na sinalização do AR durante a diferenciação neuronal.

A ativação de cascatas de cinases e a geração de espécies reativas têm se mostrado processos interligados e importantes para a diferenciação mediada pela vitamina A e seus metabólitos (Gelain *et al.*, 2006 ; Gelain *et al.*, 2011 ; Gelain *et al.*, 2012). A forma com que esses processos encontram-se conectados com as vias clássicas de sinalização genômica, no entanto, ainda é pouco compreendida; em todo caso, os próprios RRs parecem ter papel central na integração dessas vias.

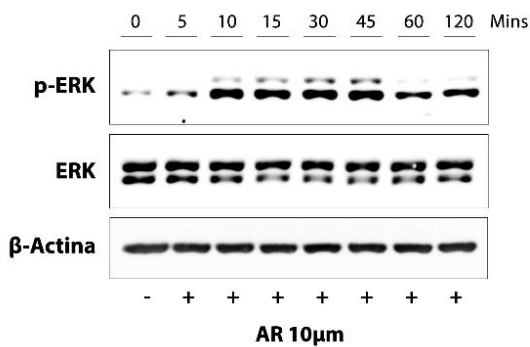
Observa-se que cascatas de ativação de cinases também são responsáveis pela regulação da atividade transcricional dos RRs. O resultado de modificações pelas cinases CDK7 e PKA no domínio NTD dos RARs, por exemplo, é a maior atividade transcricional desses receptores, apesar de não serem claros os mecanismos pelos quais essas modificações modulam a atividade dos mesmos (Bour *et al.*, 2007). Além disso, cinases da família das MAPKs mostram-se também capazes de regular os RRs. A enzima p38, quando ativa em resposta ao AR, é responsável pela fosforilação da isoforma RAR γ no NTD (Gianni *et al.*, 2002) e pela fosforilação de corretores do RAR α (Gianni *et al.*, 2006), as quais levam ao aumento da atividade transcricional desses receptores e estão relacionadas, ainda, à regulação da

ubiquitinação e degradação proteossômica dos mesmos. Já a enzima ERK mostra-se responsável pela fosforilação de RXR α no domínio LDB em modelo de diferenciação pela vitamina D e seu receptor VDR, parceiro de heterodimerização de RXRs (Solomon *et al.*, 1999; Narayanan *et al.*, 2004; Macoritto *et al.*, 2008).

Além disso, há indícios de que os RRs podem atuar como moléculas sinalizadoras para os próprios processos não genômicos. A ativação da via de PI3K/Akt mostrou-se dependente da expressão dos RARs *in vitro*, e foi demonstrada a associação física de RAR α com subunidades de PI3K. A localização celular da isoforma na membrana plasmática, inclusive, mostrou-se importante para a ativação da via (Masia *et al.*, 2007).

Em SH-SY5Y, foi observada a ativação rápida da via da ERK diante do tratamento com AR (Figura 5), além da descrição da participação de mecanismos redox-sensíveis na diferenciação neuronal induzida pelo composto (Nitti *et al.*, 2010; Frota Junior *et al.*, 2011). É possível que, assim como observado em outras linhagens, esses efeitos não transcricionais tenham influência sobre a regulação dos RRs e/ou, até mesmo, que os receptores sejam fatores importantes para a indução desses fenômenos; a expressão e a localização celular dos RARs e RXRs pode, assim, desempenhar papel importante na integração das vias genômicas e não genômicas do AR.

Figura 5 – Ativação rápida de ERK induzida por AR em SH-SY5Y.



Imunoconteúdo de ERK fosforilada (p-ERK) e de ERK total (ERK) nas células SH-SY5Y diante de zero a duas horas de tratamento com AR.

Fonte: elaborado pela autora (2015).

Por fim, o presente trabalho demonstra em SH-SY5Y a modulação dos RRs no tratamento com AR, algo até então pouco explorado em modelos neuronais. O entendimento da função da modulação das isoformas, assim como da relação entre as vias não genômicas e os receptores, estão entre os próximos passos para a melhor compreensão dos mecanismos por trás da diferenciação neuronal induzida pelo AR e, possivelmente, para aplicação em terapias de reposição neuronal.

Referências

- ABEMAYOR, E.; SIDELL, N. Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. **Environ Health Perspect.**, v. 80, p. 3-15, 1989.
- 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. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1069-1082, 2010.
- 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.
- 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 in Cell Biology**, 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 **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAMBON, P. The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. **Seminars in Cell Biology**, v. 5, p. 115-125, 1994.
- 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.
- CHIANG, M. Y. et al. An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. **Neuron** v. 21, n. 6, p. 1353-61, 1998.
- 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.
- CONSTANTINESCU, R. et al. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. **Journal of Neurotransmission Supplementum**, n. 72, p. 17-28, 2007.
- DE THÉ, H. et al. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor a and b and genes. **European Molecular Biology Organization Journal** v. 8, n. 2, p. 429-433, 1989.
- DE THÉ, H. 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.

DOLLÉ, P. et al. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. **Development**, v. 110, p. 1133-1151, 1990.

DUESTER, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. . **Cell**, v. 134, p. 921–931, 2008.

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

GELAIN, D. P. et al. Vitamin A (retinol) up-regulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through p38 and Akt oxidant-dependent activation. **Toxicology** v. 289, n. 1, p. 38-44, 2011

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. . **Cellular Signalling**, v. 18, 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.

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.

GOCEK, E.; KIELBIŃSKI, M.; MARCINKOWSKA, E. Activation of intracellular signaling pathways is necessary for an increase in VDR expression and its nuclear translocation. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 581, n. 9, p. 1751–1757, 2007.

GOCEK, E. et al. Side-chain modified vitamin D analogs induce rapid accumulation of VDR in the cell nuclei proportionately to their differentiation-inducing potential. **Steroids**, v. 73, n. 14, p. 1359-66, 2008.

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

KASTNER, P. et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. **Development** v. 124, n. 2, p. 313-26, 1997.

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.

KUMAR, M. et al. Neurospheres derived from human embryoid bodies treated with retinoic Acid show an increase in nestin and ngn2 expression that correlates with the proportion of tyrosine hydroxylase-positive cells. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 4, p. 667-81, 2007.

LAI, Z. L. et al. Methylation-associated gene silencing of RARB in areca carcinogens induced mouse oral squamous cell carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

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.

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.

LOTAN, R. Retinoids and their receptors in modulation of differentiation, development, and prevention of head and neck cancers. **Anticancer Research** v. 16, n. 4C, p. 2415-9, 1996.

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.

MALASPINA, A.; PEARCE, R. K. B.; GRAEBER, M. B. Nuclear Hormone and Orphan Receptors: Their Role in Neuronal Differentiation and Cytoprotection and in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 375–383 2003.

MASIAĆ, 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.

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.

NISHIDA, Y. et al. Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase- and TRKB-mediated signalling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **BMC Research Notes**, v. 1, 2008.

NITTI, M. et al. PKC delta and NADPH oxidase in retinoic acid-induced neuroblastoma cell differentiation. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 5, p. 828-35, 2010.

NOY, N. Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. . **Annual Review of Nutrition**, v. 30, p. 201–17, 2010.

PÅHLMAN, S. et al. Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v. 592, p. 25-37, 1990.

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. D. 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. **Molecular Neurobiology**, p. 1-13, 2014.

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

ROCHETTE-EGLY, C.; CHAMBON, P. F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. **Histology and Histopathology**, v. 16, n. 3, p. 909-22, 2001.

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.

SHELDAHL, L. C. et al. Estrogen induces rapid translocation of ER β , but not ER α , to the neuronal plasma membrane. **Neuroscience** v. 153, n. 3, p. 751–761, 2008.

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

SOLOMON, C.; WHITE, J. H.; KREMER, R. Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ -dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor α . **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p. 1729–1735, 1999.

SUN, S. Y.; LOTAN, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 41, n. 1, p. 41-55, 2002.

WAN, Y. J.; 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

WIETRZYCH, M. et al. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. **Learning and Memory**, v. 12, n. 3, p. 318-26, 2005.

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.

WUA, Y. et al. RXR α mRNA expression is associated with cell proliferation and cell cycle regulation in Hep3B cell. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 76, n. 1, p. 24-28, 2004.

XIE, H. R.; HU, L. S.; LI, G. Y. 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.

XU, X. C. Detection of altered retinoic acid receptor expression in tissue sections using in situ hybridization. **Histology and Histopathology**, v. 16, n. 1, p. 205-12, 2001.

XU, X. C. et al. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. **Cancer Research** v. 54, n. 13, p. 3580-7, 1994

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.

ZILE, M. H. Function of Vitamin A in Vertebrate Embryonic Development. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 705–708, 2001.

