

# Caracterização do silenciamento do receptor RXR $\beta$ , envolvido na diferenciação neuronal mediada por ácido retinoico, em modelo SH-SY5Y.

Carolina Saibro Girardi <sup>1</sup>, Daniel Pens Gelain <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Carolina Saibro Girardi, Biotecnologia, Universidade Federal do

Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Daniel Pens Gelain



UFRGS  
PROFESQ

XXV SIC  
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

## INTRODUÇÃO

As células SH-SY5Y, uma linhagem de neuroblastoma, são utilizadas para estudar a fase inicial de diferenciação neuronal. A diferenciação dessas células, em fenótipo neuronal dopaminérgico, é induzida pelo tratamento com ácido retinoico e especula-se que o processo mediado por esse modelo seja devido ao ácido retinoico se ligar aos receptores RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$  e, dessa forma, modular a expressão de uma ampla quantidade de genes. Entretanto, ainda não está clara a participação de cada um desses receptores na ação mediada pelo tratamento com ácido retinoico nesse modelo de diferenciação.

Neste trabalho nós realizamos a validação do silenciamento do receptor de retinoides RXR $\beta$  para que, posteriormente, possa ser avaliada a participação desse receptor na diferenciação neuronal mediada pelo ácido retinoico.

## METODOLOGIA

O receptor para ácido retinoico e retinoides foi silenciado com o KIT *siRNA silence selected validated AMBION®*, com o tratamento de diferentes concentrações iniciais de células após 24, 48 e 72 horas de silenciamento utilizando siRNA e agente transfectante lipossomal, para a avaliação da eficiência do silenciamento do receptor. Além disso, houve a avaliação dos efeitos da transfecção em si, com o tratamento das células com siRNA *scramble* (com sequência sem sentido) e agente transfectante lipossomal contra um grupo controle. A validação do silenciamento foi realizada por meio de PCR em tempo real com a quantificação da expressão de mRNA do receptor e por meio de *Immunoblotting*, onde foi feita a detecção da fração proteica de RXR $\beta$ . O modelo utilizado nos tratamentos foi a linhagem SH-SY5Y.

### Immunoblotting

O imunocônteuído de RXR $\beta$  e de  $\beta$ actina foi avaliado por meio da imunodetecção das formas fosforiladas dessas proteínas, que são suas formas ativas. Após os tratamentos, as proteínas totais das células foram quantificadas (Kit *Bio-Rad DC protein assay*), normalizadas e fracionadas em tampão de sódio-dodecil-sulfato (SDS) 1% por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). As proteínas foram, então, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos primários contra as suas formas ativas descritas acima, produzidos em coelho (*Cell Signaling Technology, Inc., USA*). A detecção desses anticorpos foi realizada pela incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho acoplado à peroxidase, e as membranas foram, em seguida, incubadas com substrato quimioluminescente para peroxidase. A reação quimioluminescente resultante foi detectada em filme foto-sensível.

### qRT-PCR

O RNA total foi extraído com kit comercial *PURE LINK Invitrogen* e quantificado. Foi realizada a produção do cDNA com kit comercial *Super Script III invitrogen* e, após a obtenção do cDNA, as amostras foram avaliadas em PCR em tempo real com a utilização de *primers* customizados da *Applied Technonology* para RXR $\beta$  e GAPDH (Gliceraldeído Trifosfato Desidrogenase) e SYBR-Green.

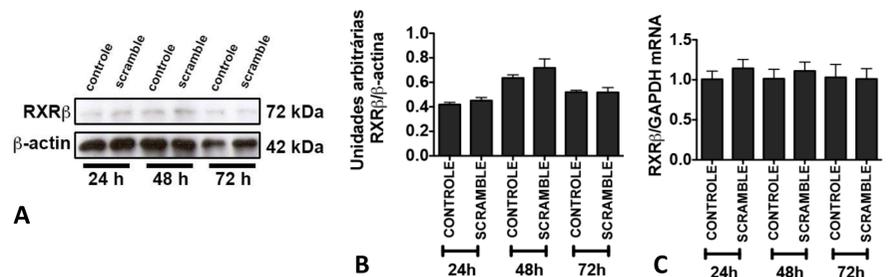
## REFERÊNCIAS

Lotta Agholmea, Tobias Lindstroma, Katarina Kágedalc, Jan Marcussona and Martin Hallbeckb, 2010. 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*, 20, 1069–1082.

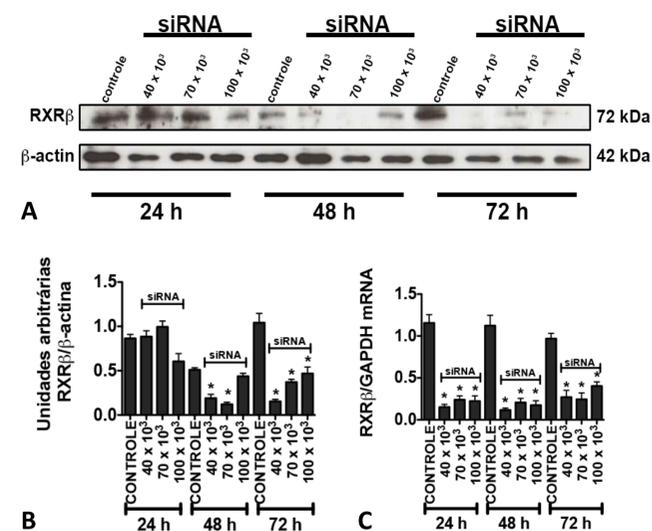
da Frota Junior ML, Pires AS, Zeidán-Chuliá F, Bristot IJ, Lopes FM, de Bittencourt Pasquali MA, Zanotto-Filho A, Behr GA, Klamt F, Gelain DP, Moreira JC, 2011.

In vitro optimization of retinoic acid-induced neurogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Molecular and Cell Biochemistry*, 358, 325-334.

## RESULTADOS



**Figura 1.** Tratamento com siRNA *scramble* (sequência sem sentido), a concentração de 70nM, agente transfectante e meio forte no grupo *scramble* e tratamento com meio forte no grupo controle. **(A)** Imunocônteuído do RXR $\beta$  e de  $\beta$ actina amostrais. **(B)** Quantificação do imunocônteuído RXR $\beta$ / $\beta$ actina (unidades arbitrárias). **(C)** Quantificação do mRNA RXR $\beta$ /GAPDH (expresso em  $\Delta$ Ct/ $\Delta$ Ct). Em **(B)** e **(C)** a significância estatística em relação ao controle está indicada com \*. ( $p < 0,05$ )



**Figura 2.** Tratamento com siRNA complementar ao mRNA do receptor RXR  $\beta$ , agente transfectante e meio forte nos grupos com 40.10<sup>3</sup>, 70.10<sup>3</sup> e 100.10<sup>3</sup> células e tratamento com siRNA *scramble* (sequência sem sentido), agente transfectante e meio forte no grupo controle. Em todos os grupos foi utilizada a mesma concentração de siRNA (70nM). **(A)** Imunocônteuído do RXR $\beta$  e de  $\beta$ actina amostrais. **(B)** Quantificação do imunocônteuído RXR $\beta$ / $\beta$ actina (unidades arbitrárias). **(C)** Quantificação do mRNA RXR $\beta$ /GAPDH (expresso em  $\Delta$ Ct/ $\Delta$ Ct). Em **(B)** e **(C)** a significância estatística em relação ao controle está indicada com \*. ( $p < 0,05$ )

## CONCLUSÃO

Pôde ser observado que, em 24 horas, houve uma diminuição significativa na produção e estabilização do RNAm do RXR $\beta$ , em 42 horas, houve diminuição também na fração proteica do receptor. Em 72 horas, no entanto, o silenciamento torna-se menos efetivo e há aumento nas quantidades de RNAm do receptor. Houve indução da diminuição de até 90% na produção e estabilização do RNAm deste receptor e da redução de até 70% da fração proteica do RXR $\beta$ .

Na comparação entre o grupo controle e o grupo tratado com o protocolo de silenciamento utilizando siRNA *scramble* foi observado que o tratamento não tem efeito significativo sobre a produção e estabilização do RNAm do receptor ou sobre a fração proteica do RXR $\beta$ .

A validação do silenciamento aqui obtida será, então, utilizada em futuros experimentos para avaliar a participação desse receptor na diferenciação neuronal mediada pelo ácido retinoico em modelo SH-SY5Y.

Alfeu Zanotto-Filho, Martin Cammarotab, Daniel P. Gelain, Ramatis B. Oliveira, Andres Delgado-Cañedoc, Rodrigo J.S. Dalmolina, Matheus A.B. Pasqualia, José Cláudio F. Moreira, 2008.

Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicology in Vitro*, 22, 1205-1212.

Fernanda Martins Lopesa, Rafael Schrödera, Mário Luiz Conte da Frota Júnior, Alfeu Zanotto-Filho, Carolina Beatriz Müllera, André Simões Piresa, Rosalva Thereza Meurer, Gabriela Delevati Colpob, Daniel Pens Gelaina, Flávio Kapczinskib, José Cláudio Fonseca Moreira, Marilda da Cruz Fernandes, Fabio Klamta, 2010.

Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research* 14, 85-94.



MODALIDADE  
DE BOLSA

BIPOP