

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

*Ações Extranucleares da Vitamina A mediadas pela
Produção de Espécies Reativas do Oxigênio*

Fábio Klamt

Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

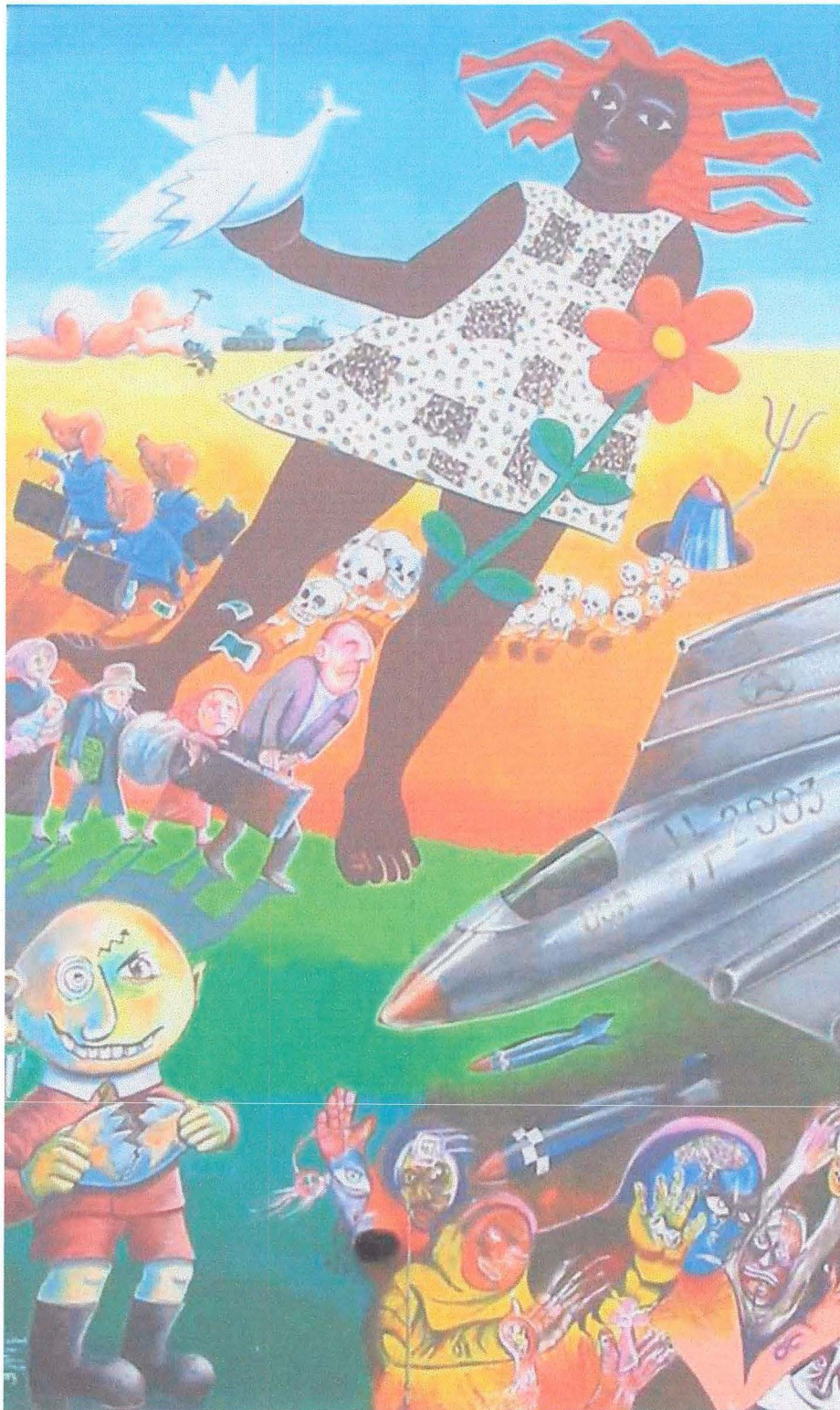
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – Bioquímica



Porto Alegre

2003

UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca



Mural Global

Autoria diversa, 3º FSM / Porto Alegre, Brasil

Só me dói viver se não for por amor.

Gabriel García Márquez

Aos meus pais e minha irmã, com amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por tudo o que representam e por terem, de todas as formas, permitido a conquista e realização deste grande sonho.

Ao meu orientador, que desde a minha iniciação científica, apostou e investiu em mim, no meu potencial e sempre, incondicionalmente, esteve ao meu lado.

À Profa Elena Aida Bernard, pelas inúmeras contribuições e enorme paciência.

Aos colegas de laboratório, companheiros e grandes amigos: Amâncio, Felipe, Mario, Michael, Evandro, Fernanda, Manuela, Guilherme, Marcos, Daniel, Luis, Márcio, Ricardo, Emerson, Valesca, Rodrigo, Ramatis, pelas diversas e calorosas contribuições ao longo destes anos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, em especial Prof Diogo Onofre Souza e Marcos Perry, pela contribuição ímpar na minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas e grandes amigos, Cláudia Vasconcelos, Cléia Bueno, Sérgio Berselli e Isabel, por todos os auxílios possíveis e impossíveis realizados ao longo deste trabalho. Com certeza, sem a ajuda de vocês, nada disso seria concluído.

À Universidade Luterana do Brasil, por ter permitido, e financiado, a minha titulação.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS e, principalmente, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul que me possibilitaram desenvolver este trabalho, que tanto significa para mim, em um centro de excelência internacional.

À Ana, pelo amor, carinho e companheirismo nas horas mais difíceis.

RESUMO

Apesar de ter sido umas das primeiras vitaminas descobertas, o conhecimento do amplo espectro de atividade biológica da vitamina A (retinol) permanece desconhecido. É bem descrita a ação biológica dos retinóides sobre a modulação da expressão gênica celular através de receptores nucleares. Entretanto, uma grande quantidade de evidências tem demonstrado um aparente aumento na carcinogênese induzida por retinol, mas os retinóides são, ainda hoje, comumente utilizados na prevenção e tratamento de tumores. Estudos clínicos recentes demonstraram que a suplementação com retinóides resulta em um aumento na incidência de tumores e, além disso, tem-se descrito um efeito pró-oxidante do retinol em sistemas biológicos. Processos biológicos diversos são modulados por radicais livres. Como, classicamente, os retinóides regulam proliferação, diferenciação e morte celular, este trabalho teve como objetivo a caracterização do possível papel do estresse oxidativo gerado pela suplementação com retinol nestes fenômenos biológicos. A suplementação com retinol (7 μ M) causou um aumento no dano oxidativo celular mediado pela irradiação ultravioleta, na atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC), na genotoxicidade e na transformação pré-neoplásica. Todos esses efeitos foram revertidos ou atenuados com a co-administração de antioxidantes. Também demonstramos que o retinol ativou a maquinaria apoptótica mitocondrial em dois modelos experimentais, de forma dependente da produção de radicais livres. Estes resultados, somados, sugerem que fenômenos biológicos modulados pelo retinol são relacionados, ao menos parcialmente, à produção de espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

In spite of being one of the first vitamins to be discovered, the full range of biological activities of vitamin A (retinol) remains unknown. Biological actions of retinoids on modulation of cellular gene expression by nuclear receptors have been widely known. However, a growing body of evidence has demonstrated an apparent enhancement of carcinogenesis induced by retinol, but attempts to use retinoids for cancer prevention and therapy are, nevertheless, ongoing. Recent intervention studies revealed that supplementation with retinoids resulted in a higher incidence of cancer and besides that, a prooxidant effect of retinol in biological system has been described. Diverse biological processes are modulated by free radicals. Since classically retinoids modulates cellular proliferation, differentiation and cell death we decide to characterizes the possible role of oxidative stress generated by retinol supplementation on these biological processes. Retinol (7 μM) supplementation caused an enhancement in the UV-mediated cellular oxidative damaged, in ornithine decarboxylase (ODC) activity, genotoxicity and preneoplastic transformation. All these effect have been attenuated or reverted by antioxidant co-administration. We also demonstrated that retinol activates a prooxidant-dependent fashion the mitochondrial apoptotic machinery in two experimental models. Taken together, these findings suggest that the biological actions modulated by retinol may be partially related to free radical generation.

ÍNDICE

Índice de Figuras	9
Lista de Abreviaturas	10
Capítulo I	
1. <i>Introdução</i>	13
1.1 <i>A vitamina A (retinol)</i>	13
1.2 <i>Radicais livres e Sistemas Biológicos</i>	16
1.3 <i>Fisiologia dos radicais livres</i>	19
1.4 <i>Vitamina A e radicais livres</i>	22
1.5 <i>Vitamina A e a célula de Sertoli</i>	23
Capítulo II	
2. <i>Objetivos</i>	26
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	26
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	26
Capítulo III	
<i>Enhanced UV-mediated free radical generation; DNA and mitochondrial damage caused by retinol supplementation</i>	29
Capítulo IV	
<i>Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator</i>	35
Capítulo V	
<i>Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation induced by vitamin A supplementation</i>	41

Capítulo VI

*Retinol induces permeability transition and loss of membrane potential, increases lipoperoxidation, superoxide generation and enhances cytochrome c release from rat liver mitochondria.....*51

Capítulo VII

*Vitamin A supplementation induce mitochondrial superoxide radical generation and cytochrome c release, leading to caspase-3-dependent programmed cell death.....*75

Capítulo VIII

8. *Discussão Geral.....*102

Capítulo IX

9. *Conclusão.....*110

9.1 *Conclusões Específicas.....*110

9.2 *Conclusão Geral.....*111

Capítulo X

10. *Referências Bibliográficas.....*113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo proposto da ação dos retinóides na expressão gênica.....15

Figura 2: Papel mitocondrial na biosíntese de ATP e na retenção de fatores de indução a apoptose.....20

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta \Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

$\cdot\text{OH}$: radical hidroxil

ADH: álcool desidrogenases

AIF: fator de indução à apoptose

ALDH: aldeído desidrogenases

AP-1: proteína ativadora-1

AR: ácido retinóico

Bcl: família de proteínas anti e pró-apoptóticas descritas de linfomas de células B

CARET: estudo da eficácia do beta-caroteno e retinol

CAT: catalase

cit. c: citocromo c

cRaf: Ser/thr proteína quinase ativada por RAS-GTP

CRBP: proteína citoplasmática ligante a retinol

CuZnSOD: superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DNA: ácido desoxirribonucéico

GPx: glutatíão peroxidase

GSH: glutatíão reduzido

GSSG: glutatíão oxidado

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio

JNK: c-Jun amino-terminal quinase

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MnSOD: superóxido dismutase dependente de manganês

mPT: permeabilidade transitória mitocondrial

NAD⁺: adenina nicotinamida dinucleotídeo

NADH: adenina nicotinamida dinucleotídeo reduzida

NFkB: fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

O₂^{•-}: radical superóxido

ODC: ornitina decarboxilase

PKC: proteína quinase C

PTP: poro de permeabilidade transitória

RAR: receptor de ácido retinóico

Ras: proteína G monomérica

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: receptor de retinóides X

SOD: superóxido dismutase

Capítulo I

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 A vitamina A (Retinol)

A vitamina A (*all-trans* retinol) e seus derivados naturais, coletivamente referidos como retinóides, são nutrientes essenciais provenientes da dieta, responsáveis pela regulação de uma gama diversa de processos fisiopatológicos que envolvem desde fenômenos de embriogênese, reprodução e visão, até diferenciação e manutenção da homeostase tecidual, proliferação celular e morte de células normais e neoplásicas. Apesar de ter sido um dos primeiros compostos antioxidantes a ser descoberto, em 1913, a ampla ação biológica dos retinóides ainda nos dias de hoje permanece desconhecida [1].

A principal fonte de retinóides naturais são, em animais, o tecido adiposo e o fígado – local de grande reserva na forma de ésteres de retinol – e os vegetais amarelos e verdes, que possuem grandes quantidades de carotenóides. Os ésteres de retinol ingeridos são hidrolizados a retinol por uma enzima hidrolase presente na luz do intestino. Tanto o retinol quanto os carotenóides são prontamente absorvidos pela mucosa intestinal. Uma vez absorvidos, os retinóides são incorporados aos quilomicrons para serem transportados, via circulação linfática, para o fígado, além de, em menor grau, testículos, pulmão, rins, tecido adiposo e músculo esquelético [2]. Uma vez dentro das células alvo, a vitamina A é convertida ao ácido retinóico – a forma descrita mais ativa biologicamente – pela ação de duas famílias de álcool desidrogenases. O primeiro passo é a conversão oxidativa reversível de retinol em retinal, mediado pela família de enzimas microsossomais álcool desidrogenases (ADH), enzimas estas que utilizam NAD^+ oxidado como cofatores, gerando

NADH. O próximo passo, a conversão oxidativa irreversível de retinal em ácido retinóico, que é catalisada pelas enzimas aldeído dehidrogenases (ALDH) e por isoenzimas da família do citocromo P450 (CYP) (Figura 1). Uma vez no citoplasma, o ácido retinóico e algumas classes de retinóides ligam-se a duas classes de receptores nucleares: receptores de ácido retinóico (RAR) e receptores de retinóides X (RXR); receptores estes que possuem diferentes isoformas ($-\alpha$, $-\beta$, e RAR- γ ; $-\alpha$, $-\beta$, e RXR- γ) [3]. Estes receptores nucleares formam homo- e hetero-dímeros, ligando-se a regiões promotoras de genes responsivos a retinóides, através dos elementos responsivos ao receptor de ácido retinóico (RARE) e elementos responsivos ao receptor de retinóides X (RXRE), modulando a expressão de diversos genes (Figura 1) [4].

Classicamente, diversos autores relacionam os efeitos biológicos dos retinóides à sua conversão a ácido retinóico e este como regulador metabólico da célula alvo, através da modulação da expressão de genes. A capacidade dos retinóides de induzir maturação celular pela promoção de diferenciação celular tem sido amplamente utilizada em intervenções terapêuticas, principalmente no tratamento de tumores epiteliais e leucemias do tipo promielocíticas agudas mediadas pela translocação cromossomal t(15;17), que causa uma deficiente expressão de RAR- α [5]. Em tumores epiteliais, o tratamento com ácido retinóico é efetivo em diversos estágios durante o processo de carcinogenesis, como um inibidor da metaplasia escamosa e como um agente preventivo na formação de novos tumores.

Porém, recentemente, diversos trabalhos têm demonstrado que os retinóides possuem ações biológicas que não envolvem sua interação com receptores nucleares [6]. Dentre estes efeitos, destacam-se a modulação direta da atividade de proteínas relacionadas

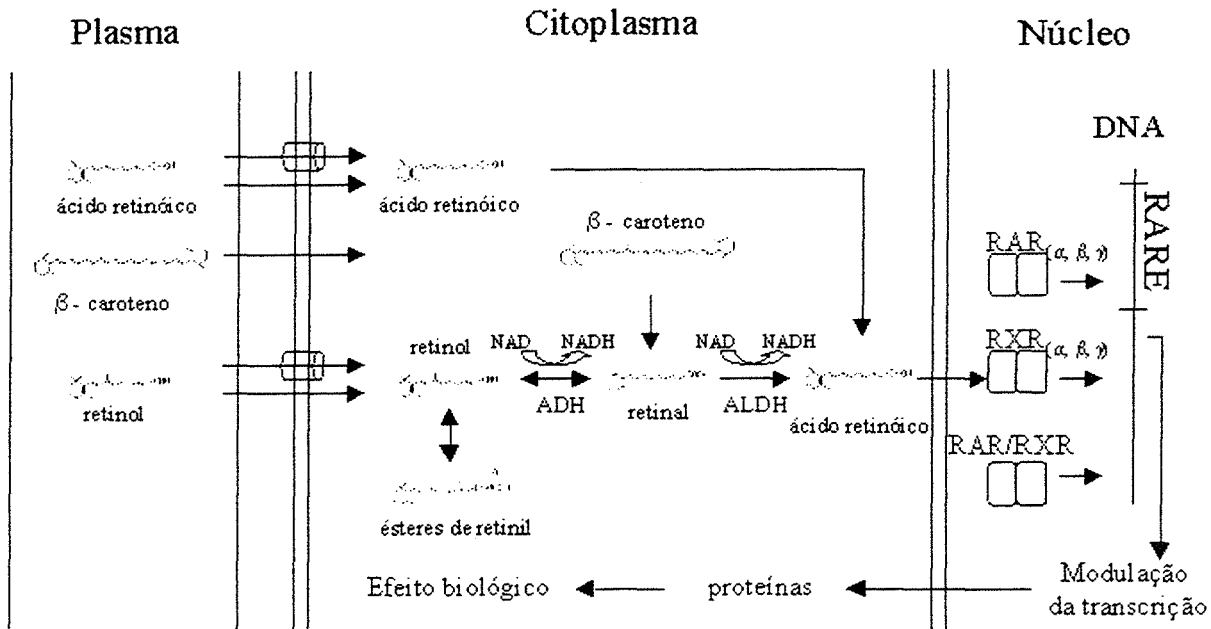


Figura 1: Mecanismo proposto da ação dos retinóides na expressão gênica. No plasma, os retinóides são transportados ligados a proteínas ligantes de retinóides (RBP), sendo absorvidas pelas células alvo por receptores específicos (RR) ou diretamente através da membrana plasmática. Uma vez no citoplasma, os retinóides são direcionados para o armazenamento (ésteres de retinil) ou metabolizados a ácido retinóico e direcionados ao núcleo, reprimindo ou ativando a expressão de genes alvos através da ligação dos receptores às seqüências responsivas (RARE). ADH, álcool desidrogenases; ALDH, aldeído desidrogenases; RAR, receptores nucleares de ácido retinóico; RXR, receptores nucleares de retinóides X; RARE, elementos responsivos aos receptores nucleares de ácido retinóico. Adaptado de Roos *et al* [2].

com a sinalização celular, como a proteína quinase C (PKC) [7], a cRaf [8], e a tioredoxina redutase [9]. Como tem-se demonstrado que a atividade destas enzimas são dependentes do estado de oxidação de alguns resíduos críticos de cisteína, especula-se que este mecanismo de regulação dos retinóides seja por modificação do estado redox das proteínas alvo.

1.2 Radicais Livres e Sistemas Biológicos

Os radicais livres são conceitualmente denominados como *compostos, átomos ou moléculas capazes de difundir pelo sistema e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo*, sendo assim extremamente reativos [10]. O termo ROS – espécies reativas do oxigênio – abrange coletivamente os radicais de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, radical superóxido; OH^{\bullet} , radical hidroxil; RO_2^{\bullet} , radical peroxil; RO^{\bullet} , radical alkoxil) e os derivados não-radicais potencialmente oxidantes (H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; HOCl, radical hipoclorito; O_3 , ozônio e singletos de $O_2 - ^1O_2$) [11]. Existem as chamadas espécies reativas do nitrogênio (RNS), que corresponde ao radical NO (óxido nítrico), ONOO⁻ (peróxido nitrito) entre outros [12]. Estes compostos, uma vez formados, são capazes de reagir com quase todas as biomoléculas celulares, através de cadeias de oxidorredução, causando inativação de enzimas, agregação ou fragmentação de proteínas, danos a molécula de DNA e lipídios de membrana.

Alberto Boveris e Britton Chance, juntos com outros grupos de pesquisa, demonstram que a principal fonte de produção de radicais livres em sistemas celulares é a cadeia transportadora de elétrons, presente nas mitocôndrias, durante o processo de

respiração celular, onde aproximadamente 4 % do oxigênio utilizado é parcialmente reduzido a $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 [13].

A geração de espécies reativas de oxigênio é uma resultante do metabolismo celular basal aeróbico e este fenômeno possui implicações fisiológicas em sistemas biológicos. Existe a necessidade de produção de uma taxa basal de radicais livres, sendo estes necessários como segundo mensageiros (como é o caso do NO e do H_2O_2) e indutores de expressão gênica. Diversos processos celulares, como proliferação, sinalização, diferenciação, morte celular programada – apoptose – são dependentes da formação de radicais livres [14]. Mas doenças como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida, aterosclerose, o processo natural de envelhecimento e diversas neuropatologias, como Parkinson e Alzheimer, estão correlacionadas com uma grande produção de espécies reativas do oxigênio [15].

Um complexo sistema de defesa antioxidante celular evoluiu junto com o metabolismo aeróbico, comprovando a sua citotoxicidade. Este sistema está baseado no balanço da atividade de diversas enzimas, como a *Cu/Zn*(citoplasmática)- e *Mn*(mitocondrial)-superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela dismutação do radical superóxido formando o peróxido de hidrogênio, que é transformado em água pela atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatíon peroxidase (GPx); ambas possuem como substrato o peróxido de hidrogênio, no entanto, a GPx é mais específica para lipoperóxidos.

Além das enzimas antioxidantes, existe um conjunto de moléculas de baixa massa molecular que funcionam como tampões redox do ambiente celular. Destacam-se dentro desta classe o peptídeo glutatíon (GSH) que, por apresentar cisteínas em sua composição, é um indicativo do estado redox das células e o ácido ascórbico (vitamina C). Em sinergia

com os mecanismos de defesa hidrossolúveis já descritos, existem os antioxidantes lipossolúveis que agem nas membranas celulares impedindo reações de cascata de lipoperoxidação. Entre estes estão as vitaminas como o α -tocoferol (vitamina E) e os derivados de β -carotenos (retinol ou vitamina A).

O α -tocoferol é o principal antioxidante celular lipossolúvel, sendo responsável pela captação dos radicais livres formados nas membranas celulares e, ao ser oxidado pelas ROS, gera um radical fenólico estável que é novamente reduzido e reciclado pelo ácido ascórbico através da atividade de enzimas redutases NADH/NADPH-dependentes [16]. Existem também alguns sistemas de defesa indiretos, como o de reparo de DNA, os quelantes endógenos de metais e a compartimentalização dos locais de produção de radicais livres [10]. Alguns trabalhos recentes demonstram que, em sistema nervoso central e na epiderme, o produto da atividade da enzima ornitina decarboxilase – as poliaminas – possuem uma função de apoio ao sistema antioxidante por funcionar como quelantes de metais [17, 18].

O processo patofisiológico chamado de estresse oxidativo se dá pelo desbalanço entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, isto é, um aumento da quantidade de ROS associado ou não com uma diminuição da capacidade celular de detoxificar estes compostos.

1.3 Fisiologia dos radicais livres

Como já dito anteriormente, a produção basal de radicais livres parece ter funções importantes em sistemas biológicos e não só vinculados a estados patológicos. Paradoxalmente, a formação de radicais livres está envolvida tanto na indução como no impedimento de fenômenos como morte celular programada e proliferação celular. Quantidades submicromolares de espécies reativas do oxigênio como o peróxido de hidrogênio estão relacionadas com processos fisiológicos como proliferação e diferenciação celular enquanto que doses maiores – na grandeza de milimolar – causam danos oxidativos em sistemas biológicos, que podem levar à formação de fenômenos fisiopatológicos como processos de inflamação, carcinogênese, necrose, entre outros [19].

A indução à apoptose é um processo fisiológico central para as células e a homeostase dos tecidos. Toda a resposta imune e ativação de células T é dependente de radicais livres. A morte de timócitos em amadurecimento é desencadeada por um súbito aumento (pulso) intracelular de oxidantes (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$), que sinaliza para estas células entrarem em apoptose [20]. Já em linhagens celulares U937, o peróxido de hidrogênio produzido por uma enzima de superfície celular, a γ -glutamil transpeptidase, difunde pela membrana plasmática e inibe a maquinaria de indução à apoptose e serve como um estímulo proliferativo [21]. Existem, basicamente, duas rotas propostas para a ativação da maquinaria apoptótica: uma dependente de receptores de membrana, levando à ativação de caspase-8; e a outra mediada pela liberação de fatores retidos na mitocôndria, principalmente o citocromo c e o fator de indução à apoptose (AIF) (Figura 2). Ambas vias culminam com a ativação de caspase-3, uma cisteína protease dita efetora, que leva ao

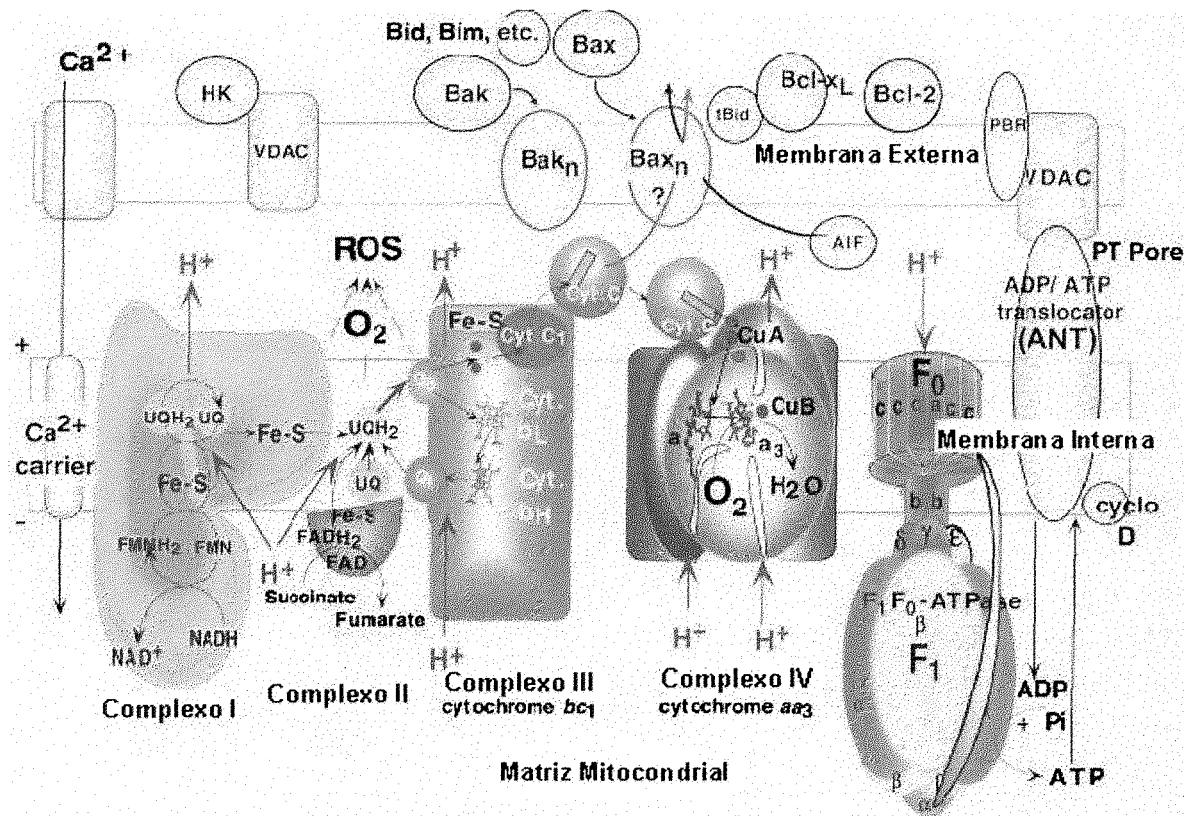


Figura 2: Papel mitocondrial na biosíntese de ATP e na retenção de fatores de indução a apoptose. Estão representados os complexos (I, II, III e IV) da cadeia transportadora de elétrons, a F₁F₀ –ATP sintase, os sítios de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a estrutura do poro de permeabilidade transitória (PTP), e a ação de proteínas pró- e anti-apoptóticas da família Bcl na regulação da liberação dos fatores apoptóticos citocromo *c* (cyt *c*) e AIF. (Modificado de Newmwer, 2003)

surgimento das características morfológicas da morte celular programada, como: condensação da cromatina, fragmentação internucleossomal do DNA, “blebbing” da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular envolto por membranas nos chamados “corpos apoptóticos”. Este tema será melhor abordado nos capítulos VI e VII.

Vários trabalhos demonstram que os radicais livres funcionam como sinalizadores celulares [22]. O exemplo mais clássico disso é o efeito vasodilatador do radical NO, produzido pela enzima NO sintase de células do endotélio. Diferentes rotas de sinalização celular são dependentes da formação de radicais livres e oxidantes ou antioxidantes modulam a expressão gênica.

Para ativação da sinalização mediada pela rota do fator nuclear kapa B (NFκB), por exemplo, há necessidade de um ambiente oxidante mediado pela produção de H₂O₂ e O₂^{•-} pela enzima NAPH-oxidase, onde o inibidor desta rota – o IκB – é oxidado e marcado para degradação via proteossomos, permitindo que o NFκB seja translocado para o núcleo da célula e module a expressão de diversos genes alvos [15].

Mais de 130 genes ou proteínas têm suas atividades moduladas por radicais livres, seja H₂O₂, pela produção de ROS pela radiação UV ou ionizante, e radical superóxido. Entre estes alvos de modulação estão fatores de transcrição (myc, c-jun, c-fos, AP-1, NFκB, p53), proteínas quinases (PKC e B, MAP quinases, tirosina quinase – Syk, ZAP-70), enzimas (ciclooxigenase-2, catalase, ornitina decarboxilase, NO sintase, fosfolipase A, C e D, heme oxigenase, colagenase), receptores (insulina, PDGF, transferrina) e proteína ribossomal S6, HSP-70, FOS e colágeno [14]. O capítulo IV abordará o papel dos radicais livres produzidos pela suplementação com vitamina A na modulação da atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC).

Estas novas descobertas demonstram que os organismos se adaptaram evolutivamente à vida em um ambiente aeróbico, fazendo com que o produto de um metabolismo oxidante – os radicais livres – fossem utilizados como moléculas úteis, sejam como sinalizadores celulares ou moduladores de expressão gênica, demonstrando a importância do estudo destas moléculas na atualidade.

1.4 Vitamina A e radicais livres

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos clínicos e epidemiológicos buscaram uma correlação entre o consumo de suplementos vitamínicos na dieta com uma diminuição na incidência de diferentes tipos de tumores e doenças cardiovasculares. O primeiro grande estudo relacionando o consumo elevado de β -carotenos e retinol (β -carotene and Retinol Efficacy Trial; CARET), demonstrou um aumento na incidência de câncer de pulmão, o que causou a suspensão do estudo [23]. O aumento de concentração de retinol na dieta de camundongos irradiados com ultravioleta causa uma maior indução de tumores de pele, além de uma redução no tempo de surgimento dos primeiros nódulos tumorais, no entanto os mecanismos que levam a um aumento na incidência de tumores de pele mediado pela suplementação com retinol ainda não foi determinado [24]. A interação da suplementação com retinol e a ultravioleta na produção de radicais livres será melhor abordada no capítulo III.

Atualmente, diferentes estudos descrevem que os retinóides possuem propriedades pró-oxidantes, provavelmente pela presença, em sua estrutura, de ligações duplas

conjugadas. A suplementação com vitamina A causa, em culturas de células de Sertoli, um aumento na captação e armazenamento de Fe^{2+} , principalmente no núcleo e na fração mitocondrial, induzindo a formação do radical hidroxil [25]. Este estresse oxidativo causa um aumento no dano oxidativo a biomoléculas e na atividade de enzimas antioxidantes [26]. O tratamento com retinol aumenta a produção de radical superóxido *in vitro* e em cultivos celulares [27]. Estes resultados demonstram que a suplementação com vitamina A e o uso dos retinóides como coadjuvantes em diferentes intervenções terapêuticas devem levar em consideração a possível participação destes compostos em reações de oxirreduções, buscando minimizar a toxicidade destes compostos, além dos mecanismos de interação bioquímica e metabolização pelos sistemas biológicos. O possível papel genotóxico e carcinogênico do tratamento com retinol é o tema do capítulo V.

1.5 Vitamina A e a célula de Sertoli

A célula de Sertoli, utilizada como modelo nesta tese, é uma célula somática localizada na face basal dos tubos seminíferos, cuja função principal é compor o ambiente adequado e dar suporte físico para que ocorra o fenômeno de espermatogênese. A célula de Sertoli possui grande capacidade fagocitária dos debrís celulares provenientes da formação dos espermatozóides e forma a chamada barreira hemato-testicular, selecionando e provendo os fatores essenciais que entram em contato com a linhagem germinativa [28]. Como as células da pele, a célula de Sertoli é de origem epitelial e tem a capacidade de responder e armazenar grandes quantidades de retinol, além de possuir um amplo e completo sistema de proteção antioxidante e serem bem caracterizadas morfo e

fisiologicamente. Essas características, em conjunto, fazem com que culturas primárias de células de Sertoli sejam um bom modelo experimental para o estudo do papel das propriedades oxidativas do tratamento com retinol sobre os processos biológicos e bioquímicos regulados por estes compostos.

Capítulo II

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista que os retinóides são moléculas ativas em reações de oxiredução, com já comprovada capacidade de causar estresse oxidativo em sistemas biológicos e que, tanto dietas suplementadas com retinol quanto a utilização de retinóides no tratamento e prevenção de diversos tipos de tumores e doenças epidérmicas estão em ampla vigência em intervenções clínicas, nos dias de hoje, a presente tese de doutorado teve por objetivo principal a caracterização da possível ação biológica da vitamina A mediada pela produção de espécies reativas do oxigênio.

2.2 Objetivos Específicos

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos nos capítulos que seguem:

- Capítulo III: Avaliação do possível efeito da suplementação com vitamina A nos danos oxidativos causados pela irradiação com ultravioleta em cultivo de células de Sertoli;
- Capítulo IV: Avaliação do possível papel das espécies reativas de oxigênio produzidas pela suplementação com vitamina A na modulação da atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC) em cultivo de células de Sertoli;

- Capítulo V: Avaliação da genotoxicidade e tumorigenicidade da vitamina A em diferentes modelos animais, e o possível papel das espécies reativas de oxigênio nestes processos;
- Capítulo VI: Avaliação da influência do tratamento com vitamina A sobre a ativação de vias apoptóticas dependentes da mitocôndria e o possível papel das espécies reativas de oxigênio nestes processos, utilizando-se de mitocôndrias isoladas de fígado;
- Capítulo VII: Avaliação da suplementação com vitamina A na indução à apoptose e o possível papel das espécies reativas de oxigênio nestes processos em cultivo de células de Sertoli.

Capítulo III

***Enhanced UV-mediated free radical generation; DNA and mitochondrial
damage caused by retinol supplementation***

Photochem. Photobiol Sci. 2: 856-860, 2003

Capítulo IV

Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator

Mol Cell Biochem **208**: 71-76, 2000

Capítulo V

***Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation
induced by vitamin A supplementation***

Mut Res (Gen Toxicol Environmen Mutagen) **539**: 117 – 123, 2003.

Capítulo VI

***Retinol induces Permeability transition and loss of membrane potential,
increases lipoperoxidation, superoxide generation and enhances cytochrome
c release from rat liver mitochondria***

Manuscrito submetido para publicação

RETINOL INDUCES PERMEABILITY TRANSITION AND LOSS OF MEMBRANE
POTENTIAL, INCREASES LIPOPEROXIDATION, SUPEROXIDE GENERATION
AND ENHANCES CYTOCHROME C RELEASE FROM RAT LIVER
MITOCHONDRIA

Fábio Klamt*; Marcos Roberto de Oliveira; José Cláudio Fonseca Moreira

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS /

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;

*Departamento de Biologia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Cachoeira do Sul,
Brasil;

Address correspondence to: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, Departamento de
Bioquímica, ICBS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos
2600 - anexo. Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003. Tel: 55 51 316 55 49; FAX: 55 51
316 5535; e-mail: fklamt@terra.com.br / jcfm@vortex.ufrgs.br

Abstract

Biological actions of retinoids on modulation of cellular gene expression by nuclear receptors have been widely known. Recently, extra-nuclear effects of retinoids - such as modulation of PKC and Raf activities, inhibition of thioredoxin reductase, and interference in mitochondria homeostasis - have been proposed, but remain to be better elucidated. Considering that retinoids induce apoptosis in tumor cells by an unknown mechanism, and that mitochondria play a key role in controlling apoptosis via cytochrome c (cyt c) release and caspase-3 activation, we decided to investigate the possible effects of exposure of 3-month old Wistar rat liver mitochondria to different concentrations of retinol (vitamin A). We measured: lipoperoxidation (TBARS method); superoxide generation (adrenochrome formation); loss of membrane potential (rhodamine 123 fluorometric determination); mitochondrial swelling, and cyt c liberation (spectrophotometric determination). Results showed that retinol causes lipoperoxidation, as well as an increase in mitochondria swelling, which leads to a loss of membrane potential, in a dose dependent manner. As a consequence, there is cyt c release and an enhance in superoxide production by the electron transport chain. In view of these findings, our results demonstrate that retinol interferes with mitochondrial metabolism, promoting cyt c release, thus suggesting a putative mechanism of induction of apoptosis by retinoids.

Key words: vitamin A, retinol, mitochondria, cytochrome c, permeability transition.

Introduction

In spite of being one of the first vitamins to be discovered, the full range of biological activities of vitamin A (all-trans retinol) remains incomplete. Retinol and its derivatives, the retinoids, are recognized as key regulators of vertebrate development, cell growth, and differentiation processes. Retinoid action is mediated by specific nuclear retinoic acid receptors (RARs) and retinoid receptors (RXRs) belonging to the steroid / thyroid super-family of transcription factors [1]. In addition to these classical mechanisms, recent work suggested that retinoids may act directly on the modulation of different PKC isoforms, serine / threonine kinase and cRaf activities [2]. Retinoid supplementation has been widely used therapeutically in the prevention and treatment of several types of diseases, particularly epithelial cancers and leukemia, including both pre-malignant and malignant tumors [3]. There is substantial evidence that retinoids exert their effects through the induction of apoptosis in different tumor cell lines, but the precise mechanism leading to cell death remains to be fully established [4]. Moreover, retinoids inhibit Bcl-2 expression, a mitochondria-associated key factor that increases cell resistance to apoptosis [5].

Apoptosis is regarded as an active and organized form of cell death, triggered in response to physiologic or pathologic stimuli. Mitochondria play a central role in the initiation of apoptosis. Specifically, the release of different proteins that are usually present in the intermembrane space of these organelles has been observed during early stages of apoptotic cell death. Cytochrome c (cyt c), an essential constituent of the respiratory chain, is often released from mitochondria and, once in the cytosol, interacts with this adaptor molecule – Apaf-1 – resulting in the processing and activation of pro-caspase-9 in the

presence of dATP. Caspase-9, in turn, cleaves and activates effectors pro-caspase-3 and -7; being responsible for the biochemical and morphological features characteristic of apoptosis [6].

Although cyt c release activates the death machinery in many experimental models of apoptosis, the mechanism of translocation across the outer mitochondrial membrane remains unclear. It is generally accepted that increased mitochondrial permeability transition (mPT) by the open of the permeability transition pore (PTP), which accompanies a loss of transmembrane potential ($\Delta\psi_m$), and mitochondrial swelling, leads to cyt c release from mitochondria [7]. This process is induced by Ca^{2+} , oligomerization of pro-apoptotic proteins like Bax or Bid, and inhibited by cyclosporin A (CsA) and Bcl-2 protein. Besides that, oxidative damage to mitochondria by pro-oxidant or thiol-reactive agents induces mPT, and releases cyt c from its loosely bound phospholipid cardiolipin [8].

We have been studying the effect of retinol treatment on chromatin structure and DNA repair processes, as well as on reactive oxygen species metabolism. We and others authors demonstrated that retinol treatment caused an enhancement in antioxidant enzyme activities and oxidative damage to biomolecules, probably due to a retinol-mediated increase in iron uptake and storage, which in turn leads to highly reactive $\cdot OH$ radical generation by Fenton chemistry [9,10]. Previously, it has been observed that retinoic acid and its derivatives are able to induce swelling and release of cytochrome c in isolated mitochondria [11].

In this report, we decided to investigate the possible feature of retinol in the induction of membrane permeability transition and cytochrome c release from isolated mitochondria. Our results provide evidences for a possible mitochondria-mediated

mechanism of apoptosis induction by retinol. The data are discussed with reference to the use of retinol supplementation during therapeutic interventions.

Material and Methods

Chemicals

Vitamin A (all-trans retinol), fatty acid-free bovine serum albumin, rotenone, rhodamine 123, EGTA, and HEPES were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

Isolation of mitochondria

Mitochondria from fresh rat liver were isolated as described elsewhere [12]. Briefly, liver of Wistar rats suspended in ice-cold isolation buffer A (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EGTA, and 0.5 mg / mL fatty acid-free bovine serum albumin) was gently homogenized with a glass-homogenizer and centrifuged at 2000Xg for 10 min at 0 °C. Approximately three-quarter of the supernatant was further centrifuged at 10000Xg for 10 min at 0 °C in a new tube. The fluffy layer of the pellet was removed by gently shaking with buffer A and the firmly packed sediment was resuspended in the same buffer without EGTA and centrifuged at 10000Xg for 10 min at 0 °C. Mitochondria pellet was resuspended in buffer B (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 4,2 mM succinate, 0,5 mM KH₂PO₄, and 4 µg / mL rotenone). This procedure, which was designed to isolate intact mitochondria rather than to recover all of the mitochondria present in the liver, yielded about 20 mg of mitochondrial protein / g

of liver. Mitochondria protein was determined by the Bradford method with bovine serum albumin as standard. In some experiments 6 μ M CsA were also added.

Transmission electron microscopy analysis

Isolated mitochondria (0,25 mg) for TEM were fixed in 2.5% glutaraldehyde/1% paraformaldehyde (pH 7,2) for approximately 4 h. Samples were allowed to settle out by gravity and rinsed twice with 0,2 M phosphate buffer. The rinsed samples were centrifuged at 12500g for 10 min. Following centrifugation, samples were postfixed in 1% OsO₄ for 1 h, rinsed through a graded acetone series, and infiltrated with and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were cut and stained with uranyl acetate.

Measurement of the mPT by swelling of the mitochondria

The PTP opening was assayed essentially as described by Petronilli *et al.* (1993) [13]. Opening of the PTP causes mitochondria swelling that is conveniently assayed as a decrease in the light scattering (and thus absorbance) of a mitochondria suspension. Mitochondria (0.25 mg protein / mL) were suspended in cuvettes in buffer B. After 2-min equilibration period, different concentrations of retinol were added, and mitochondrial swelling was followed spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 540 nm, at 25 °C, for 10 min.

Measurement of mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_m$)

The $\Delta\psi_m$ was estimated by measurement of the fluorescence change of Rho 123 (0.1 μ M) as described [12]. Mitochondria (1 mg protein / mL) were incubated at 25 °C in buffer B containing 4 μ g / mL of rotenone, and $\Delta\psi_m$ was assessed by spectrophotometer

(RF-540) with excitation at 505 nm and recording at 534 nm after addition of 0.1 μ M Rho 123.

Measurement of cytochrome *c*

Cytochrome *c* release from rat liver mitochondria was assayed according to Borutaite *et al.* (1999) [14]. Mitochondria (1 mg / mL) were incubated with different concentrations of retinol for 10 min at 37 °C, and then centrifuged at 12000 rpm for 10 min in an eppendorf centrifuge. Supernatants were used for spectrophotometrically measurement of cytochrome *c* release from mitochondria by using the absorption difference of the wavelengths pair 550/540 nm for ascorbate-reduced minus ferricyanide-oxidised cyt *c* ($\epsilon = 18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The total amount of mitochondrial cyt *c* were determined in the pellets obtained after retinol treatment, and was measured spectrophotometrically as the second derivative ($d^2A/d\lambda^2$) of the absorption spectra, after extraction with *n*-butanol [11].

Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

Lipid peroxidation were measurement by the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adopted as an index of ROS production as previously described [15]. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% (TCA) and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% (TBA), then heated in a boiling water bath for 15 min. Butanol (2:1 v / v) was added and after a centrifugation (800 x g / 5 min) thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as MDA (malondialdehyde) equivalents (nmol / mg protein).

Mitochondrial Superoxide production

Superoxide production was determined in washed sub-mitochondrial particle (SMP) using a spectrophotometric assays based on superoxide-dependent oxidation of epinephrine to adrenochrome at 37 °C ($E_{480\text{nm}} = 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [16]. The reaction medium consisted of 0.23 M mannitol, 0.07 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), SMP (1.0 mg protein / mL), 0.1 μM catalase, and 1 mM epinephrine. Succinate (7 mM) was used as substrate. Superoxide dismutase (E.C. 1.15.1.1.) was used at 0.1-0.3 μM final concentration to give assay specificity.

Mitochondrial viability

Isolated liver rat mitochondria (1 mg / mL) supported with 5 mM succinate, was treated with different concentrations of retinol and incubated in buffer B with 0.25 mg / mL of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) at 37 °C / 30 min. After centrifugation in an eppendorf microcentrifuge (12000 rpm / 5 min), pellets were solubilized in 1 mL DMSO and MTT reduction was determined using the absorbance of the wavelength pair $A_{570-630} \text{ nm}$. It is widely assumed that MTT is reduced by active mitochondria [17].

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), using a Neuman-Keuls test to compare means values across groups. Differences were considered to be significant when $p < .05$.

Results

Induction of mPT opening and loss of mitochondria membrane potential by retinol

In isolated rat liver mitochondria, incubation with different concentrations of retinol caused an abrupt swelling in a dose dependence pattern (FIG. 1 and 2). Retinol in the concentration of 20 and 40 μM induces mitochondria permeability transition in the same degree as CaCl_2 150 μM , a classical mPT inducer (FIG. 2). As a consequence of the mPT opening, retinol caused a dose dependent loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) (FIG. 3).

Mitochondrial lipoperoxidation and increased superoxide radical generation by retinol

Figure 4 shows a significant increase in oxidative damage to mitochondrial lipids (A.), and superoxide radical generation (B.), mediated by retinol 20 and 40 μM ($p < .05$ and $p < .01$, respectively), as compared to vehicle alone.

Cytochrome *c* release and decreased mitochondrial viability by retinol

To determine the influence of retinol in the release of cyt *c*, we directly measured the presence of cyt *c* in the supernatants of mitochondria incubated under different conditions (Table 1), and in the total amount of mitochondrial cytochrome *c* (FIG. 5). Retinol caused cytochrome *c* release from mitochondria in a dose dependence pattern (Table 1). Retinol-mediated cyt *c* release was reverted to vehicle values when trolox 0.1 μM – an α -tocopherol analog – was co-administered, suggesting a possible involvement

of free radical (Table 1). As a positive control, CaCl_2 150 μM was administered. Retinol treatment caused a decrease in the total amount of mitochondrial cytochrome *c* (FIG. 5) and in mitochondrial viability, determined by MTT reduction (Table 1).

Discussion

Natural and synthetic derivatives of vitamin A show significant efficacy in the treatment of experimental breast cancers, acute promyelocytic leukemia and they play a fundamental role in chemoprevention of epithelial carcinogenesis and in differentiation therapy [18]. Although these outcomes support the possible use of retinoids in the prevention and the therapy of different types of tumors, the biochemical and cellular mechanisms by which retinoids may block (or promote) cancer progression are largely unknown. In terminal-differentiated mammalian cells, retinol supplementation causes oxidative DNA damage, leading to cell cycle progression and preneoplastic transformation [19]. Recent work demonstrated an enhancement in oxidative damage caused by ultraviolet irradiation mediated by vitamin A [20]. These contradictory findings require further research to elucidate the mechanism(s) by which retinoids may alternate from pro- to anti-DNA-damage inducers.

An increase in mitochondrial permeability is now established as an important route by which stimuli can activate apoptosis in mammalian cells [21]. There is, therefore, much interest in the development of suitable drugs for therapeutic intervention that can regulate the opening of such permeability transitions in tumor cells. Retinoic acid and its

derivatives are able to induce swelling and release of cytochrome *c* in isolated mitochondria [11]. Moreover, retinoids downregulate the expression of Bcl-X_L, one antiapoptotic member of Bcl-family, and have demonstrated an altered subcellular distribution of Bcl-2 [22, 23].

Exposing of isolated rat liver mitochondria to different concentration of retinol, the natural precursor of retinoic acid synthesis, caused mitochondrial permeability transition, loss of membrane potential and cytochrome *c* release in a concentration dependent pattern (Fig. 1, 2, 3, 5 and Table 1). When trolox is co-administered, no differences in the cyt *c* release is detected, as compared to control (Table 1), suggesting that this effect is not simply attributed to a general membrane disrupting action of retinol, as previously observed [24], but related to the oxidative damage generated by retinol supplementation (Fig. 3) [9,10,19,20]. Intense mitochondrial lipoperoxidation may disrupt the loose bound of cyt *c* from its membrane anchoring lipid, cardiolopin, permitting the release of cytochrome *c* to extramitochondrial environment (Fig. 4; Table 1) [8]. Recent experimental data suggest that several of classical biological effects of retinol supplementation, like well described elevation of ornithine decarboxilase (ODC) activity, is caused by its pro-oxidant feature [25].

In conclusion we demonstrated, in the present report, that retinol administration is able to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated rat liver mitochondria and that this effect is, at least in part, related to the recent pro-oxidant feature of retinoids in biological system. These results suggest that, in addition to the use of combined therapies based on both maturation of neoplastic cells by retinoids and cell death induced by others chemotherapeutic drugs, new therapies exploring the direct influence of retinol in the activation of apoptotic machinery in tumor cells could be developed as well.

Acknowledgment

We thank Dr Elena Aida Bernard for critical discussions and Brazilians funds CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS.

References

- [1] VL Seewaldt, EC Dietze, BS Johnson, SJ Collins, MB Parker. Retinoic Acid-mediated G1-S-Phase arrest of normal human mammary epithelial cells is independent of the level of p53 protein expression, *Cell Growth & Differen.* **10**: 49-59, 1999.
- [2] B Hoyos, A Imam, R Chua, C Swenson, G-X Tong, E Levi, N Noy, U Hämmerling. The cysteine-rich regions of the regulatory domains of Raf and Protein Kinase C as Retinoid Receptor, *J Exp Med* **192**: 835-845, 2000.
- [3] D Hunter, and W Willet. Vitamin A and cancer. Epidemiological evidence in humans. In Blomhoff, R. (ed.) *Vitamin A in Health and Disease*, vol. 1, Marcel Dekker, New York, 561-584, 1994.
- [4] S Toma, L Isnardi, P Raffo, G Dastoli, E De Francisci, L Riccardi, R Palumbo and W Bollag. Effects of all-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid on breast cancer cell lines: Growth inhibition and apoptosis induction. *Int J Cancer* **70**: 619-627, 1997.

- [5] N Agarwal, and K Mehta. Possible involvement of Bcl-2 pathway in retinoid X receptor alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 251-253, 1997.
- [6] MO Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **401**: 770-776, 2000.
- [7] G La Piana, D Marzulli, MI Consalvo, and NE Lofrumento. Cytochrome *c*-induced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide oxidation, mitochondrial permeability transition, and apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **410**: 201-211, 2003.
- [8] M Ott, JD Robertson, V Gogvadze, B Zhivotovsky, and S Orrenius. Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process. *PNAS* **99**(3): 1259-1263, 2002.
- [9] F Dal-Pizzol, F Klamt, MS Benfato, EA Bernard, JCF Moreira. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* **34**: 395-404, 2000.
- [10] F Dal-Pizzol, F Klamt, MLC Frota Jr, LF Moraes, JCF Moreira, MS Benfato. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* **33**: 677-687, 2000.
- [11] MP Rigobello, G Scutari, A Friso, E Barzon, S Artusi, and A Bindoli. Mitochondrial permeability transition and release of cytochrome *c* induced by retinoic acids. *Biochem Pharmacol* **58**: 665-670, 1999.
- [12] M Narita, S Shimizu, T Ito, T Chittenden, RJ Lutz, H Matzuda, and Y Tsujimoto. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated mitochondria. *PNAS* **95**: 14681-14686, 1998.
- [13] V Petronilli, C Cola, S Massari, R Colonna, and P Bernardi. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem* **268**(29): 21939-21945, 1993.

- [14] V Borutaite, R Morkuniene, and GC Brown. Release of cytochrome *c* from heart mitochondria is induced by high Ca^{2+} and peroxynitrite and is responsible for Ca^{2+} -induced inhibition of substrate oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1453**: 41-48, 1999.
- [15] HH Draper, and M Hadley. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* **186**: 421-431,1990.
- [16] SL Arnaiz, MF Coronel, A Boveris. Nitric Oxide, Superoxide, and Hydrogen Peroxide production in Brain Mitochondria after Haloperidol Treatment. *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **3**: 235-243, 1999.
- [17] Y Liu, DA Peterson, H Kimura, and D Schubert. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* **69**: 581-593, 1997.
- [18] LA Hansen, CC Sigman, F Andreola, AS Ross, GJ Kelloff, and LM De Luca. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* **21**(7): 1271-1279, 2000.
- [19] F Klamt, F Dal-Pizzol, R Roehrs, RB Oliveira, R Dalmolin, JAP Henriques, HHR Andrades, ALLP Ramos, J Saffi, JCF Moreira. Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation induced by vitamin A supplementation. *Mut Res*, IN PRESS, 2003.
- [20] F Klamt, F Dal-Pizzol, EA Bernard, and JCF Moreira. Enhanced UV-mediated free radical generation; DNA and mitochondrial damage caused by retinol supplementation. *Photochem Photobiol Sci* **2**: 856-860, 2003.
- [21] G Kroemer. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 433-435, 2003.

- [22] CKA Hsu, AK Rishi, X-S Li, MI Dawson, U Reichert, B Shroot, and JA Fontana. Bcl-X_L expression and its downregulation by novel retinoid in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* **232**: 17-24, 1997.
- [23] A Bruel, E Karsenty, M Schmid, TJ McDonnell, and M Lanotte. Altered sensitivity to retinoid-induced apoptosis associated with changes in the subcellular distribution of Bcl-2. *Exp Cell Res* **233**: 281-287, 1997.
- [24] AH Goodall, D Fisher, and JA Lucy. Cell fusion, haemolysis and mitochondrial swelling induced by retinol and derivatives. *Biochim Biophys Acta* **595**: 9-14, 1980.
- [25] F Klamt, F Dal-Pizzol, NC Ribeiro, EA Bernard, MS Benfato, and JCF Moreira. Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator. *Mol Cell Biochem* **208**: 71-76, 2000.

Table 1: Release of cytochrome *c* and decrease in mitochondrial viability induced by retinol treatment.

treatments	Assays	
	cytochrome <i>c</i> released (pmol / mg protein)	MTT reduction (A.U.)
control	1.34 ± 0.10	0.28 ± 0.05
vehicle 3 µM	1.18 ± 0.38	0.20 ± 0.02
vehicle 40 µM	1.95 ± 0.16	-- --
retinol 3 µM	1.97 ± 0.16	0.29 ± 0.03
retinol 7 µM	2.80 ± 0.56	0.20 ± 0.02
retinol 20 µM	2.85 ± 0.15 *	0.18 ± 0.01*
retinol 40 µM	5.24 ± 0.66**	0.16 ± 0.01*
ret 40µM + trolox [®] 0.1µM	1.86 ± 0.29 [#]	-- --
Ca ²⁺ 150 µM	6.08 ± 1.57	-- --
1 % tritonX100 [®]	10.53 ± 1.54	-- --

1 mg of rat liver mitochondrial protein in 1 mL of buffer B (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 4,2 mM succinate, 0,5 mM KH₂PO₄, and 4 µg / mL rotenone) were treated by 10 min at 25 °C with different concentration of retinol and cyt *c* release were determined by the difference in A_{550/540} of ascorbate-reduced minus ferricnide oxidized supernadant (10000g / 5 min) ($\epsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Mitochondrial viability was spectrophotometric determined by MTT reduction at A₅₇₀₋₆₃₀ nm. Data represent means ± SEM (n = 6). * different from respective control group ($p < .05$); **($p < .01$); [#]Different from ret 40 µM ($p < .01$) (one way analysis of variance).

Figure Legend:

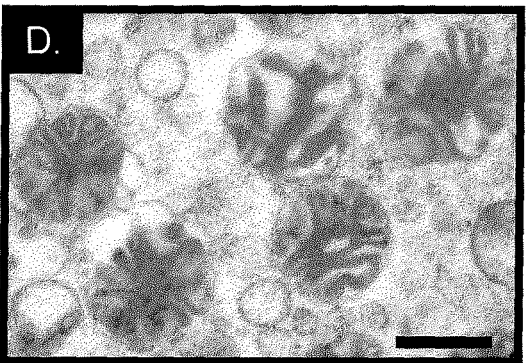
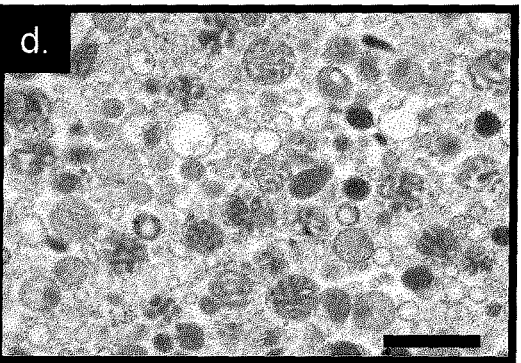
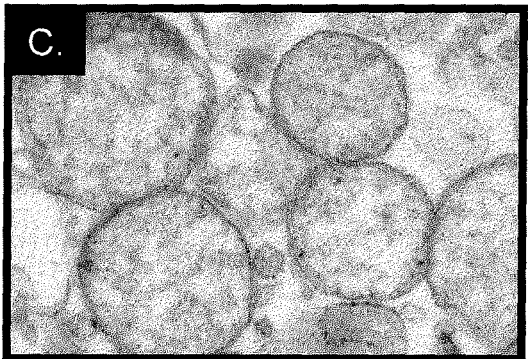
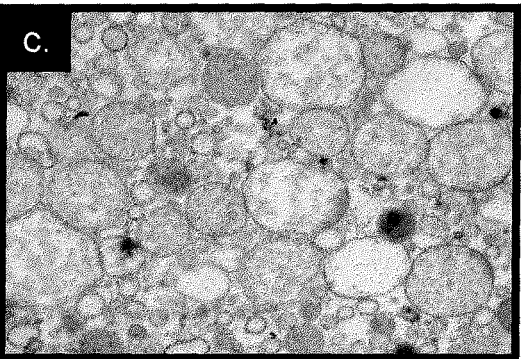
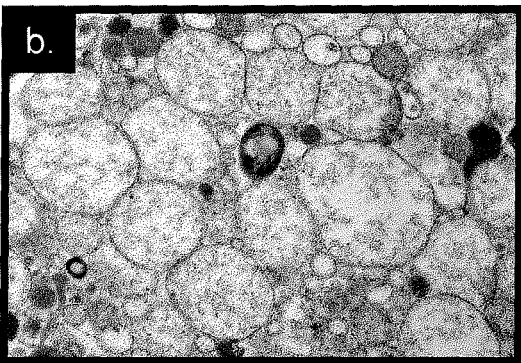
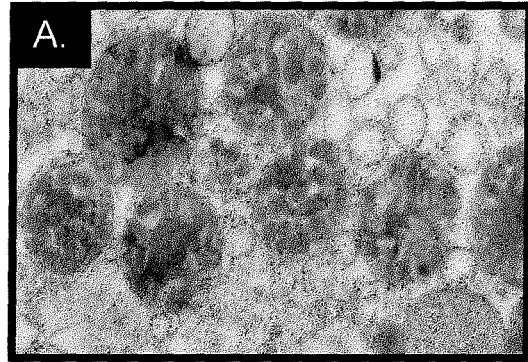
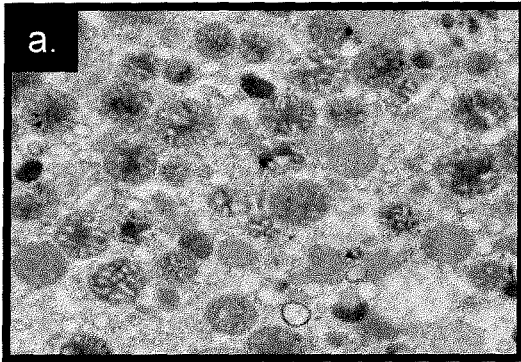
FIG. 1: Ultrastructure of mitochondria treated with retinol. Mitochondria (0.25 mg/ mL) were exposed to different treatments followed a 10 min incubation in buffer B and prepared for TEM analysis as described in Materials & Methods. Legend: (a) untreated; (b) 150 μ M of CaCl_2 ; (c) retinol 40 μ M; (d) retinol 40 μ M + 6 μ M CsA. Magnification = 10000X; Bar = 0,5 μ m. The right column is the same treatments, but magnification = 25000X; Bar = 0,2 μ m.

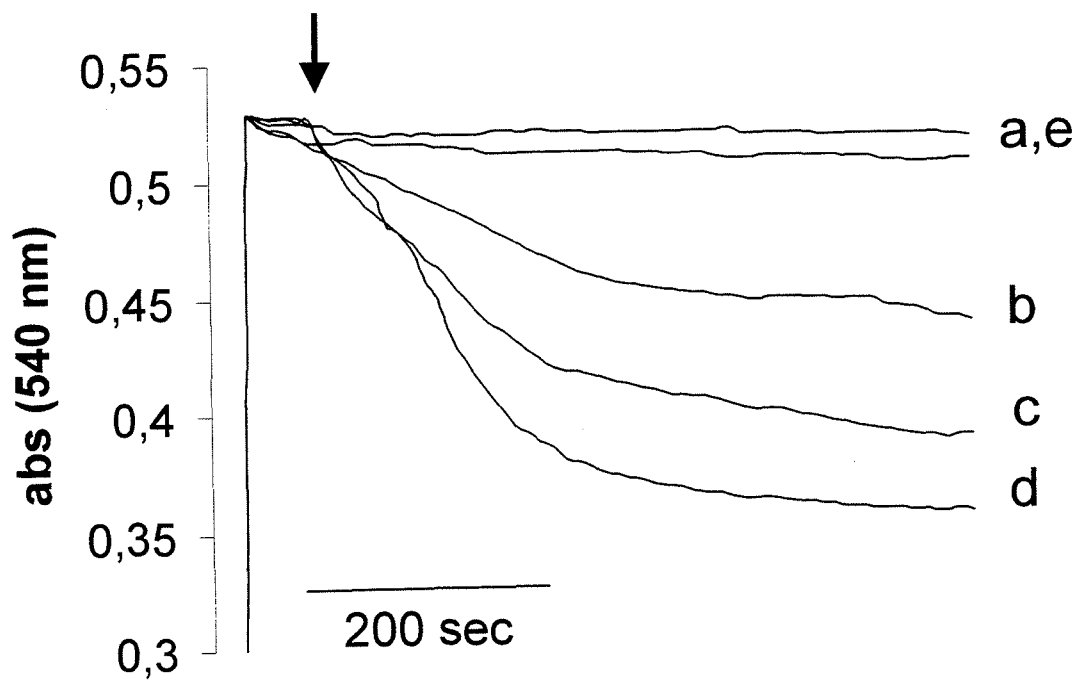
FIG. 2: Mitochondrial permeability transition mediated by retinol. Rat liver mitochondria (0.25 mg / mL) were incubated at 25 °C in buffer B. Swelling was triggered by the addition (at the arrow) of retinol at the following concentrations: untreated (a), 20 μ M (b), 40 μ M (c). As a positive control, 150 μ M of CaCl_2 were also added (d). The involvement of mPTP opening by retinol was assayed by co-administrating 6 μ M CsA with retinol 40 μ M (e). Representative of at least five independent experiment (n = 5).

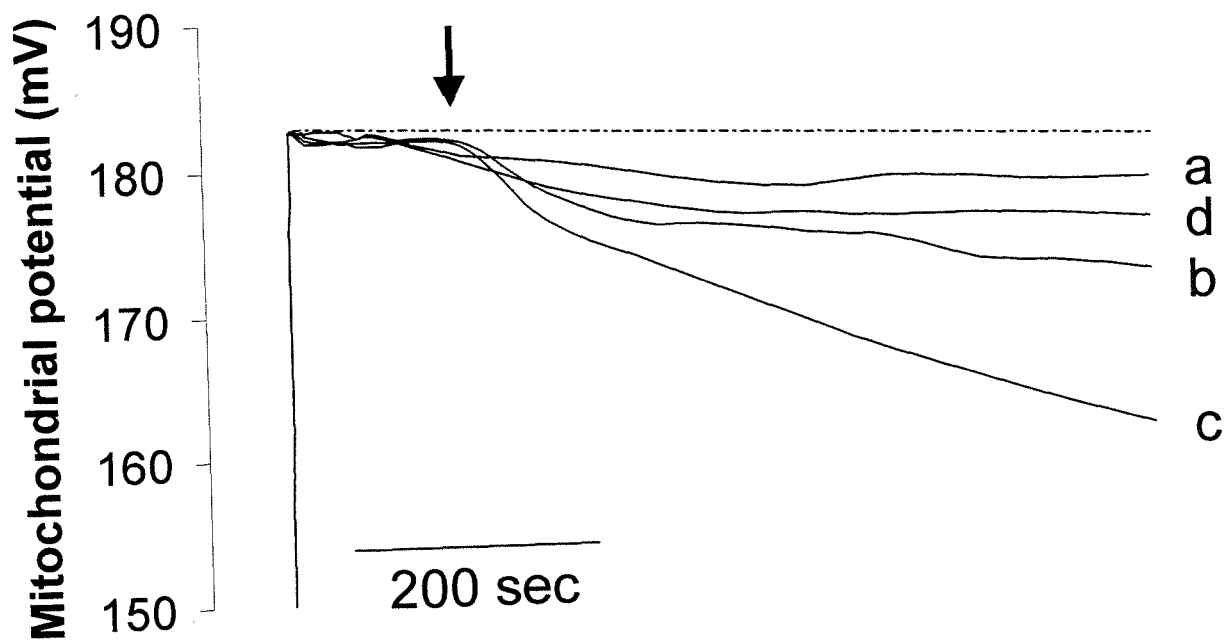
FIG. 3: Loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) by retinol. Rat liver mitochondria (1 mg / mL) were incubated at 25 °C in buffer B with Rh 123 (0.1 μ M). Energization of mitochondria was obtained by the addition of 4,2 mM succinate. Loss of $\Delta\psi_m$ was triggered by the addition (at the arrow) of retinol at the following concentrations: untreated (dashed line), 10 μ M (a), 20 μ M (b), 40 μ M (c). The involvement of mPTP opening by retinol was assayed by co-administrating 6 μ M CsA with retinol 40 μ M (d). Representative of at least five independent experiment (n = 5).

FIG. 4: Increased mitochondrial lipoperoxidation and superoxide radical generation by retinol. Rat liver mitochondria (1 mg / mL) were incubated at 25 °C by 10 min with different concentrations of retinol in 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 4,2 mM succinate, 0,5 mM KH_2PO_4 , and 4 μg / mL rotenone. Lipoperoxidation were determined by TBARS methods (A.), and superoxide radical generation by adrenochrome formation (B.). Data represent means \pm SEM (n = 6). * different from respective control group ($p < .05$); ** ($p < .01$), one way analysis of variance.

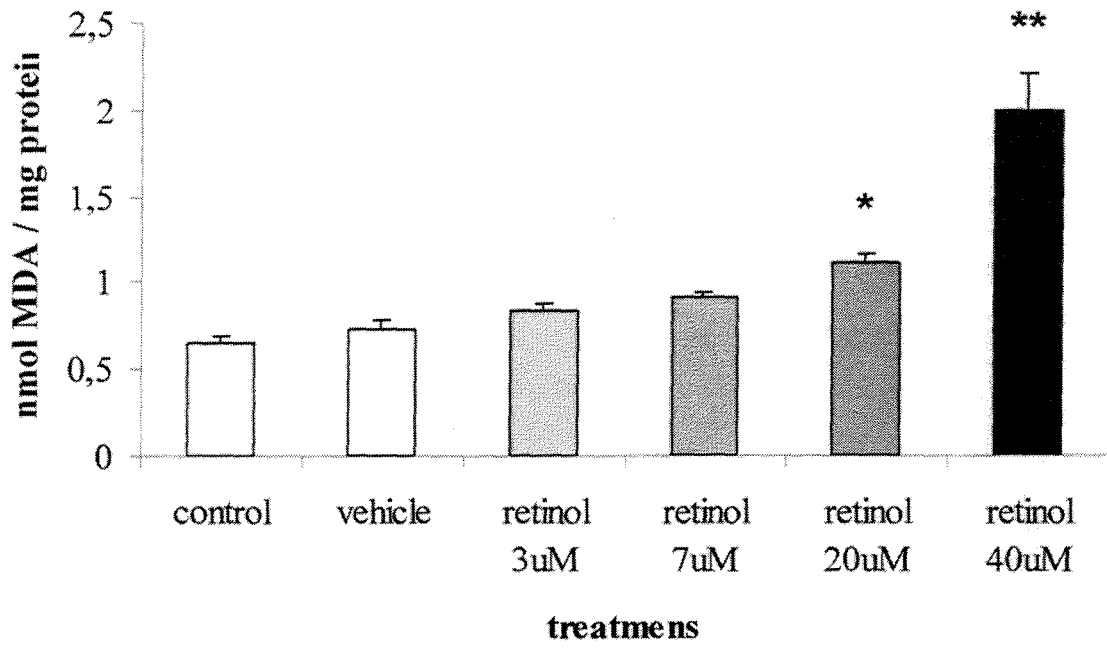
FIG. 5: Decrease in mitochondrial cytochrome *c* content by retinol. Rat liver mitochondria (1 mg / mL) were incubated at 25 °C by 10 min with different concentrations of retinol in buffer B. Cytochrome *c* were extracted from mitochondrial pellet with *n*-butanol, and spectrophotometric determined by the second derivative of the absorption spectra ($d^2A/d\lambda^2$). The resulting values were compared to a standard curve obtained using horse heart cytochrome *c*; the readings are linear in the range 0.1-1.5 μM cyt *c*. Data represent means \pm SEM (n = 6). * different from respective control group ($p < .05$); (one way analysis of variance).



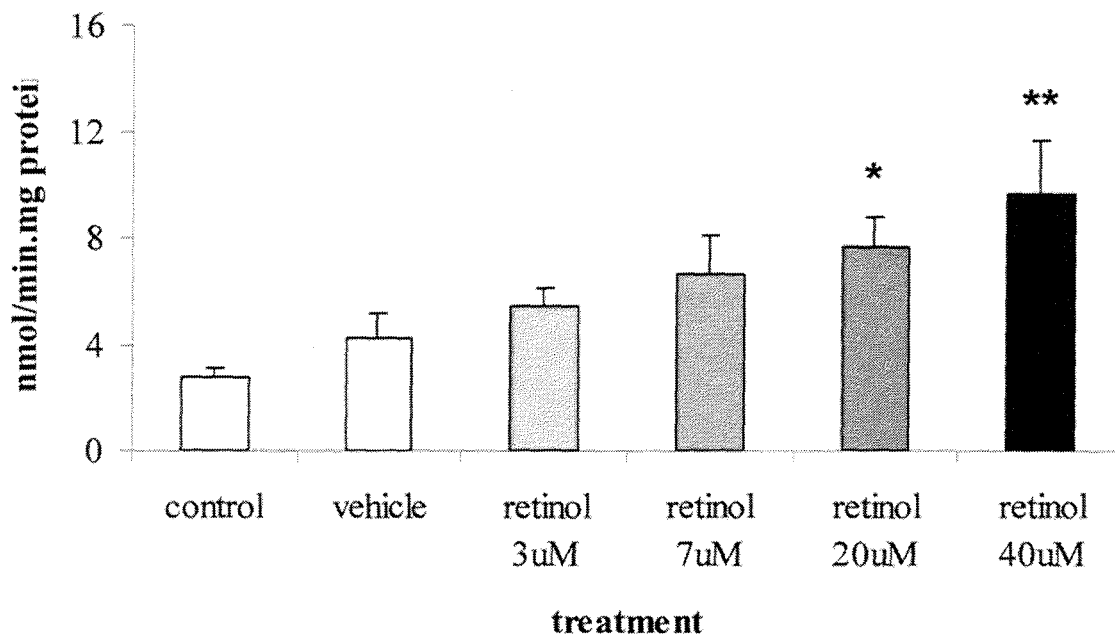


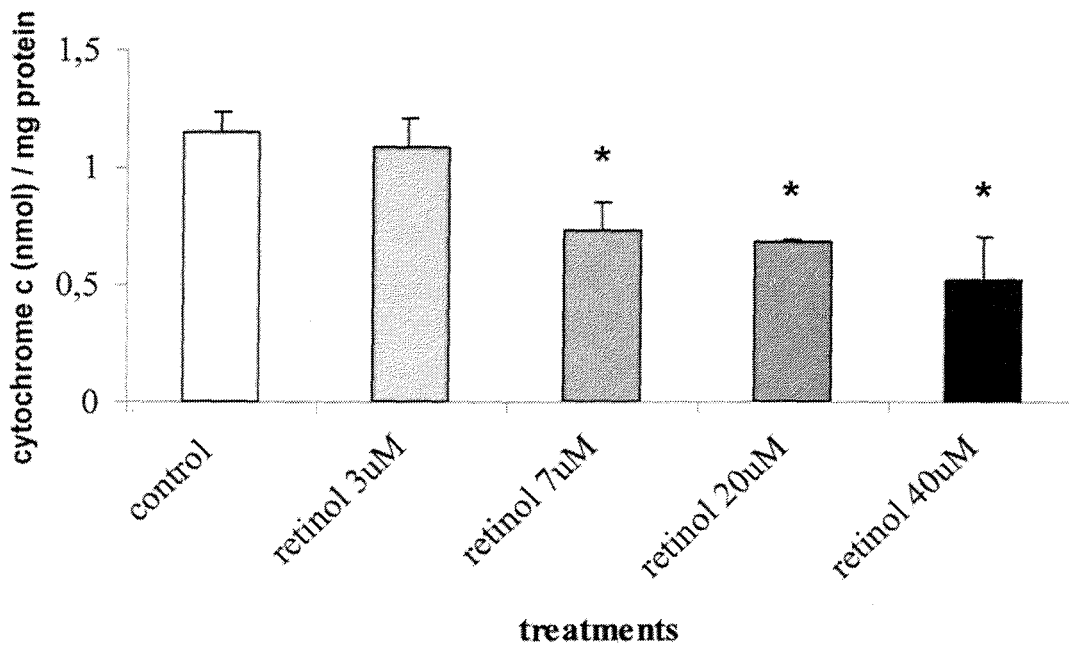
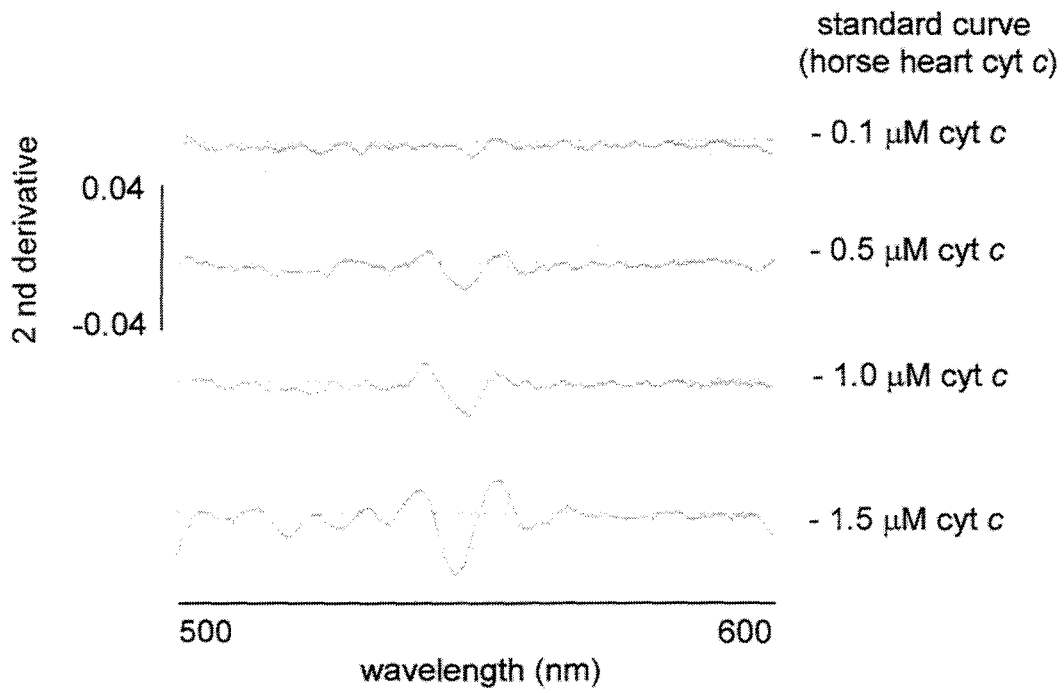


A.



B.





Capítulo VII

Vitamin A supplementation induce mitochondrial superoxide radical generation and cytochrome c release, leading to caspase-3-dependent programmed cell death

Manuscrito submetido para publicação

VITAMIN A SUPPLEMENTATION INDUCE MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE
RADICAL GENERATION AND CYTOCHROME C RELEASE, LEADING TO
CASPASE-3-DEPENDENT PROGRAMMED CELL DEATH

Fábio Klamt^{1,2,3}, Felipe Dal-Pizzol^{1,4}, Daniel Gelain¹, Ramatis Birnfield de Oliveira¹,
Michele Bastiani³, Fabiana Horn³, José Cláudio Fonseca Moreira¹

¹Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS /
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;

²Departamento de Biologia, Universidade Luterana do Brasil, Cachoeira do Sul, Brasil;

³Departamento de Biofísica, IB / UFRGS, Porto Alegre, Brasil;

⁴Departamento de Medicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC),
Criciúma, Brasil;

Address correspondence to: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, Departamento de
Bioquímica, ICBS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos
2600 - anexo. Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003. Tel: 55 51 316 55 49; FAX: 55 51
316 5535; e-mail: fklamt@terra.com.br / jcfm@vortex.ufrgs.br

Abstract

There are several reports suggesting that retinoid treatment leads to apoptosis in tumor cells, but the precise mechanism remains to be determined. Mitochondrial cytochrome *c* (cyt *c*) release and caspase-3 activation are a well described route of apoptosis induction. We previously described that retinol caused an increased free radical generation, which may be related with mitochondrial damage and apoptosis in cultured rat Sertoli cells. In this work, we investigate the effect of retinol (7 μM) treatment, a natural retinoic acid precursor, in total cellular nonenzymatic antioxidant status, mitochondrial superoxide production and cyt *c* release, and caspase-3 activation in cultured 15 day-old Wistar rat Sertoli cells. Apoptosis cell death mediated by retinol treatment was evaluated by nuclear TUNEL staining and conventional agarose gel electrophoresis for detection of internucleosomal DNA fragmentation. Our results showed that retinol treatment caused a rapid and temporary cellular oxidative pulse, which may be related to a decreased mitochondrial viability and an enhancement in superoxide radical generation by electron transport chain, both leading to cyt *c* release. In consequence, there is a substantial activation of caspase-3, which in turn induces Sertoli cells internucleosomal DNA fragmentation and positive nuclear staining to TUNEL assay. We also demonstrated that retinol treatment maintain cellular ATP levels probably by PARP cleavage, and a redox permissive environment to caspase-3 activity. In view of these findings, our data establish a putative mechanism in which retinol exert their effect through the induction of apoptosis in different tumor cell lines.

Key-words: retinol, oxidative stress, mitochondria, apoptosis, cytochrome *c*, Sertoli cells.

Introduction

Vitamin A (all-*trans* retinol) is an essential nutrient which can either be obtained directly in the diet or by the intake and conversion of pro-vitamin A β -carotenoid. Retinoids, the derivatives of vitamin A, have a broad range of effects on biological systems, regulating embryogenesis, neoplasia, and the maintenance of normal tissue homeostasis. The wide spectrum of physiological and pharmacological retinoids effects are attributed to both receptor-dependent and receptor-independent mechanisms [1]. Transcriptional regulation of target genes by retinoids is generally mediated by nuclear receptors: retinoic acid receptors (RAR α , - β , and - γ) and retinoid X receptors (RXR α , - β , and - γ) [2]. Once bound to ligand, these receptors homodimerises or heterodimerises, and the complex formed exerts its biological effects via binding to a particular *cis* element, the retinoic acid response element (RARE). Recently, several report demonstrate that retinol could directly modulate serine / threonine kinases, different PKCs isoforms, and cRaf activities by its electrons transfer capacity, functioning as a tag to enable the efficient and direct redox activation of these proteins [3,4].

Retinoid supplementation has been widely used therapeutically in the prevention and treatment of several types of diseases, particularly epithelial cancers and leukemia. A number of retinoids have now been described which induce programmed cell death, in what appears to be an RAR- and RXR-independent mechanism [5]. Apoptosis is regarded as an active and organized form of cell death, triggered in response to physiologic or pathologic stimuli. It is characterized by a number of well-defined features, which include condensation and fragmentation of the chromatin, internucleosomal DNA cleavage,

membrane blebbing, translocation of phosphatidylserine from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane and liberation of the so called “apoptotic bodies” [6]. Mitochondria play a central role in the initiation of apoptosis. Specifically, the release of different proteins that are usually present in the intermembrane space of these organelles has been observed during early stages of apoptotic cell death. Cytochrome c (cyt c), an essential constituent of the respiratory chain, is often released from mitochondria and, once in the cytosol, interacts with this adaptor molecule – Apaf-1 – resulting in the processing and activation of pro-caspase-9 in the presence of dATP. Caspase-9, in turn, cleaves and activates effectors pro-caspase-3 and -7; being responsible for the biochemical and morphological features characteristic of apoptosis [7].

Oxidants (reactive oxygen species) are generated during normal cellular metabolism and in high levels by activated phagocytes in inflammatory tissues, and are thought to mediate apoptosis. These oxidants might arise from leakage of electrons from mitochondria, from chemotherapeutic drug metabolism, or from activation of oxidases such as NAPH oxidase. There is substantial evidence that retinoids exert their effects through the induction of apoptosis in different tumor cell lines, but the precise mechanism leading to cell death remains to be fully established [8]. A growing body of evidence has demonstrated that retinoids have pro-oxidant properties, which might lead to cell oxidative damage and carcinogenesis [9]. In primary cultured Sertoli cells, retinol treatment (7 μ M, 24 h) caused an enhancement in antioxidant enzyme activities and oxidative damage to DNA, lipids and proteins, probably due to a retinol-mediated increase in iron uptake and storage, which in turn led to highly reactive \cdot OH radical generation by Fenton chemistry [10, 11]. We also demonstrated an enhance in 8-oxo 7,8 dihydro-2'-deoxyguanosine (8-

oxodG) in Sertoli cells treated with retinol [10]. These findings suggest a putative role for oxidative stress in retinol-induced apoptosis in mammalian cell lines.

In this report, we investigate and characterize the molecular mechanism involved in the decrease in viability of cultured rat Sertoli cells treated with retinol. Our result suggest that retinol supplementation causes a rapid and transient oxidative pulse that might cause cellular and mitochondrial injury, leading to the activation of a caspase-3-dependent programmed cell death. The data are discussed with reference to the use of retinol supplementation during therapeutic interventions.

Materials and Methods

Chemicals

Type I collagenase, medium 199, HBSS, trolox, and all-trans retinol were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. Trypsin was purchased from Difco, Detroit, MI, USA.

Cell isolation and culture

Sertoli cells from 15-day-old Wistar rats were prepared and cultured as previously described [12]. Animals were killed by either asphyxiation, testes were removed and washed in saline pH 7.4. Sertoli cells were isolated by enzymatic digestion of decapsulated testes with trypsin and type I collagenase. A small percentage (3-4%) of contamination by peritubular cells, determined by histochemical demonstration of alkaline phosphatase activity, was present in these Sertoli cell preparations.

After isolation, Sertoli cells were counted in a Neubauer chamber and cultivated at a plating density of 3.2×10^5 cells / cm^2 in medium 199 (pH 7.4) supplemented with 1% fetal bovine serum (v/v) in plastic vessels. Cells were maintained at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The medium was replaced after 24 h by serum-free medium

to remove unattached Sertoli and germinative cells. Experiments were performed on cells treated with retinol 7 μ M for 24 h. Control cultures received only the retinol solvent (0.1% ethanol, v/v). Previous testing had shown that ethanol alone had no effect in any of the experimental procedures (data not shown). The formation of oxidized retinol metabolites was monitored by spectroscopy of all retinol solution before its use. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. All results were normalized against protein content (Lowry et al, 1951), using bovine serum albumin as standard.

Conventional agarose gel electrophoresis for detection of internucleosomal DNA fragmentation

Low-molecular-weight apoptotic DNA fragments was isolated by the procedure of Herrmann et al [13]. DNA fragments (equivalent to $\sim 3 \times 10^6$ cells) were separated by 2% agarose electrophoresis at 80 V for 2 h, and was performed using 1 X TBE.

Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining

Apoptotic cell death was also examined by TUNEL staining. The cultured Sertoli cells were incubated for 12 and 24 hs with or without 7 μ M retinol, then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. According to the method of a TUNEL staining kit (*in situ* Cell death Detection Kit, Boehringer), the cells were treated with 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate for 2 min at 4 °C and labeled with terminal deoxyribonucleotidyl transferase for 30 min at 37 °C [14].

Assay of caspase-3 activity

Caspase-3 activity was measured as described previously [15]. Cell extracts were incubated for 30 min at 37 °C with 100 µM DEVD-AFC (7-amino-4-trifluoro-methylcoumarin) peptide substrate in a total volume of 200 µL adjusted with ICE buffer (50 mM Hepes buffer, pH 7.5, 10 % sucrose, 0.1 % Triton X-100), DTT (4 mM) was added to the reaction mixture. The fluorescence of cleaved AFC was measured at excitation and emission wavelengths of 400 and 505 nm, respectively. Although caspase-3 may be the major enzyme to cleave at DEVD sequences, other caspases can also recognize this sequence. Hence, DEVDase activity is referred to as “caspase-3-like”.

Measurement of mitochondrial superoxide generation

Submitochondrial particles (SMP) were isolated from Sertoli cells by differential centrifugation as previously described [16]. Superoxide production was determined in washed sub-mitochondrial particle (SMP) using a spectrophotometric assays based on superoxide-dependent oxidation of epinephrine to adrenochrome at 37 °C ($E_{480\text{nm}} = 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [16]. The reaction medium consisted of 0.23 M mannitol, 0.07 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), SMP (1.0 mg protein / mL), 0.1 µM catalase, and 1 mM epinephrine. Succinate (7 mM) was used as substrate. Superoxide dismutase (E.C. 1.15.1.1.) was used at 0.1-0.3 µM final concentration to give assay specificity.

Mitochondrial viability

Cultured Sertoli cells treated with retinol and incubated in buffer B with 0.25 mg / mL of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) at 37 °C / 30 min. After centrifugation in a eppendorf microcentrifuge (12000 rpm / 5 min), pellets were solubilized in 1 mL DMSO and MTT reduction was determined using the absorbance of the

wavelength pair $A_{570-630}$ nm. It is widely assumed that MTT is reduced by active mitochondria [17].

Total reactive antioxidant potential (TRAP)

The antioxidant potential of the cultured Sertoli cells was estimated by the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). The principle of TRAP measurement has been previously described [18]. Briefly, the reaction was initiated by injecting luminol and AAPH – a free radical source that produces peroxy radical at in a constant rate – in glycine buffer that resulted in steady luminescence emission. The addition of the samples homogenates decreases the luminescence proportionally to its antioxidant potential. The protein content of samples homogenates was determined (Lowry et al., 1951). The luminescence emission was followed for 60 min after the addition of the samples homogenates (150 μ g of protein). Chemiluminescence was read in a liquid scintillation counter (Wallace 1409) as counts for minutes (cpm).

ATP assay

Intracellular ATP levels were determined using luciferin/luciferase [19]. Briefly, cells (3×10^6 cells) that have been treated with 7 μ M retinol for different times were washed with PBS, resuspended in 250 μ L of 10 mM KH_2PO_4 , 4 mM MgSO_4 , pH 7.4, heated at 98 °C for 4 min, and placed on ice. At the time of the assay, a 50 μ L sample was added to 100 μ L of 50 mM NaAsO_2 , 20 mM MgSO_4 , pH 7.4, and 80 μ g of luciferin/luciferase. Light emission was quantified in Dynatech ML 3000 microtiter plate luminometer (Chantilly, VA, USA). Standard curves were run in all experiment and were linear in the range of 5 – 2500 nM

ATP. Stock ATP concentrations were measured spectrophotometrically at 259 nm using a molar extinction coefficient of 15,400.

Western blot analysis

Cell lysates were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to membranes as described previously [20]. After blocking with 5% milk, membranes were incubated with mouse monoclonal anti-PARP – poly(ADP-ribose) polymerase – or anti-cytochrome c followed by horseradish peroxidase-cojugated secondary antibodies. Bands were visualized by chemiluminescence using the ECL kit from NEM (Boston, MA, USA).

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), using a Neuman-Keuls test to compare mean values across groups. Differences were considered to be significant when $p < .05$.

Results

Nuclear TUNEL staining and cellular viability

Retinol (7 μ M, 24 h) treatment causes a decreases in Sertoli cells viability as demonstrated by the increased percentage of non-attached cells, as visualized by light microscopy (Fig. 1; D, black arrow). When these cells were analyzed by TUNEL assay, we observed a positive

nuclear staining with the morphological features of apoptotic cells (Fig. 1; B, white arrow). When trolox 0.1 μM , an analog synthetic of α -tocopherol, were co-administered there is a substantial decrease in nuclear TUNEL staining and a maintenance of cultured rat Sertoli cells viability (Fig. 1; C and E). There are no differences observed between groups during 12 h of retinol treatment (data not show).

Agarose Gel Eletrophoresis for detection of Internucleosomal DNA Fragmentation

Figure 2 demonstrates internucleosomal DNA fragments (ladder pattern) caused by 12 h of retinol 7 μM treatment (B), which is widely adopted as a fingerprint of apoptotic process. Trolox 0.1 μM co-administration inhibits DNA fragmentation induced by retinol (Fig. 2; C). No DNA fragmentation was observed in control untreated cells (A), or in Sertoli cells treated with vehicle alone (ethanol 0.1%) (data not show).

Cellular Redox environment

To verify a possible alteration on cellular redox environment caused by retinol, the total non-enzymatic antioxidant status (TRAP) of cultured Sertoli cells were determined during different times of treatment. Retinol caused a rapid and temporary oxidative pulse during the first 30 min of treatment, reverted by trolox 0.1 μM co-administration. After that, untreated control cells values were maintained for at least 24 h of retinol treatment (Fig. 3).

Mitochondrial Metabolism

Retinol supplementation (7 μM , 1 h) led to a temporary decrease in mitochondrial viability (Fig. 4; A). Indeed, retinol caused an abruptly increase in mitochondrial superoxide radical

generation (Fig. 4; B). Both effects were prevented by trolox 0.1 μ M co-administration (Fig. 4; A and B).

Cytochrome *c* release and caspase-3 activation

Western blot analysis demonstrate that retinol treatment causes elevated cyt *c* release from mitochondria (Fig. 5; A). As a consequence, there is an increase in caspase-3 activity in cultured rat Sertoli cells treated with retinol (Fig.5; B). Caspase-3 activity increases at 4 h of retinol treatment and is maintained for at least 24 h of treatment, and is partially prevented by trolox 0.1 μ M co-administration (Fig. 5; B).

PARP cleavage and ATP levels

To verify if there is a favorable conditions to apoptosis occurs in retinol treated Sertoli cells, we determined the pattern of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and the cellular ATP levels. Figure 6 (A) demonstrates that PARP protein is cleaved in all groups analyzed. Indeed, there is a reversible decrease in ATP content in the initial firsts hours of retinol treatment, which is re-established to control values during the incubation period (Fig. 6; B).

Discussion

Several studies previously demonstrated oxidative stress generation by natural and synthetic retinoids [9-12, 21, 22], but the precise biochemical mechanisms underlining the

fate of retinoid chemotherapeutic intervention in the induction of programmed cell death by the activation of mitochondrial pathway remains uncertainly. In isolated rat liver mitochondria we demonstrated that retinol administration induces permeability transition and loss of membrane potential, increases lipoperoxidation, superoxide generation and enhances cytochrome *c* release (submitted). In this context, this report examines and suggest the mechanism involving the induction of programmed cell death mediated by the pro-oxidant effect of retinol supplementation. In cultured rat Sertoli cells vitamin A induces an oxidant-dependent apoptosis, as suggested by the reversion mediated by co-administration of trolox in the positive cellular TUNEL staining and in “ladder pattern” of DNA fragmentation observed in retinol treated cells (Fig. 1 and 2). The presence of the polyene conjugated double bounds characteristic of all natural retinoids could be the source for the pro- and antioxidant properties of the molecule. Moreover, the Fenton-mediated high reactive $\cdot\text{OH}$ generation by the interaction of H_2O_2 with the increased cellular iron uptake and storage induced by retinol is another mechanism to explain prooxidant properties of vitamin A supplementation in biological systems [10].

Cellular administration of pro-vitamin A β -carotene cause an increase in subcellular concentration of this compound, principally in the mitochondrial fraction [24]. Retinol pro-oxidative effect caused a decreased mitochondrial viability and cytochrome *c* release (Fig. 4 and 5). Increased mitochondrial lipoperoxidation induces cyt *c* release by the oxidation of cardiolipin [25]. The release of cyt *c* to the extramitochondrial environment by retinol administration (Fig. 5) might lead to induce two processes: *i*) increased mitochondrial superoxide radical production (Fig. 4) [23]; *ii*) activation of the “apoptosome” complex and the effector caspase-3 (Fig. 5) [7]. Mitochondrial role on the activation of apoptotic

machinery may be limited by cellular redox environment [26], and the maintenance of ATP levels [27]. Because caspases are cysteine-dependent enzymes, their activity are sensitive to redox active agent such retinol. Even the redox status of cyt *c* will determine it capacity to activates caspases (Radi, 2003; personal communication). In fact, high oxidative environment change the pattern of cellular death from apoptosis to necrosis [27]. Retinol treatment is able to induces a cellular oxidative environment during the first half hour of incubation, but when cyt *c* is expected to be released to the cytoplasm – after 4 hour of incubation (Fig. 5) – the cellular redox environment is restored to control cells values (Fig. 3), permitting caspase-3 activation (Fig. 5).

Another limiting situation to activate apoptosis machinery is the intracellular ATP levels. During intensive oxidative biomolecule damage, with high DNA fragmentation, cellular PARP becomes activated. PARP activity causes a rapid depletion of NAD^+ content, leading to ATP depletion, which is required for apoptosis occurs [15]. Sertoli cells treated with retinol suffer intense DNA oxidative damage, including the formation of single and double strands fragment [10]. Surprisingly, PARP protein, a key substrate of cellular caspase-3, is in the cleaved state in control and retinol treated cells (Fig. 6). Apparently, the maintenance of cellular ATP levels during mitochondrial-mediated apoptosis in Sertoli cells could be mediated by cleavage-dependent-PARP diminished activity (Fig. 6).

In the view of the present results, we suggest that retinol is able to induces a prooxidant mitochondrial-dependent activation of the apoptosis machinery, inducing Sertoli cells to die by programmed cell death. Additional studies are required to understand the significance of retinol supplementation in models of apoptosis induction in malignant cells and the intracellular pathways responsible for these retinol effects.

Acknowledgment

We thank Dr Elena Aida Bernard for critical discussions and Brazilians funds CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS.

References

- [1] R. Blomhoff, Vitamin A in Health and Disease, Marcel Dekker, New York. 1994, pp561-584.
- [2] L Altucci, and H Gronemeyer. Nuclear receptors in cell life and death. *TRENDS Endocrinol Metab* **12**(10): 460-468, 2001.
- [3] B Hoyos, A Imam, R Chua, C Swenson, G-X Tong, E Levi, N Noy, U Hämmerling. The cysteine-rich regions of the regulatory domains of Raf and Protein Kinase C as Retinoid Receptor, *J Exp Med* **192**: 835-845, 2000.
- [4] A Radomska-Pandya, G Ghen, PJ Czernik, JM Little, VM Samokyszyn, CA Carter, and G Nowak. Direct interaction of all-*trans*-retinoic acid with protein kinase C (PKC). *J Biol Chem*, **275**(29): 22324-22330, 2000.
- [5] JL Clifford, DG Menter, M Wang, R Lotan, and SM Lippman. Retinoid receptor-dependent and -independent effects of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **59**: 14-18, 1999.
- [6] MO Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **401**: 770-776, 2000.
- [7] G Kroemer. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 433-435, 2003.
- [8] S Toma, L Isnardi, P Raffo, G Dastoli, E De Francisci, L Riccardi, R Palumbo and W Bollag. Effects of all-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid on breast cancer cell lines: Growth inhibition and apoptosis induction. *Int J Cancer* **70**: 619-627, 1997.
- [9] F Klamt, F Dal-Pizzol, R Roehrs, RB Oliveira, R Dalmolin, JAP Henriques, HHR Andrades, ALLP Ramos, J Saffi, JCF Moreira. Genotoxicity, recombinogenicity

and cellular preneoplastic transformation induced by vitamin A supplementation.

Mut Res, IN PRESS, 2003.

- [10] F Dal-Pizzol, F Klamt, MLC Frota Jr, LF Moraes, JCF Moreira, MS Benfato. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* **33**: 677-687, 2000.
- [11] F Dal-Pizzol, F Klamt, MS Benfato, EA Bernard, JCF Moreira. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* **34**: 395-404, 2000.
- [12] F Klamt, F Dal-Pizzol, EA Bernard, and JCF Moreira. Enhanced UV-mediated free radical generation; DNA and mitochondrial damage caused by retinol supplementation. *Photochem Photobiol Sci* **2**: 856-860, 2003.
- [13] M Herrmann, H-M Lorenz, R Voll, M Grunke, W Woith, JR Kalden. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acid Res* **22**: 5506-5507, 1994.
- [14] K Takano, Y Nakamura, and Y Yoneda. Microglial cell death induced by low concentration of polyamines. *Neuroscience* **120**: 961-967, 2003.
- [15] Y-A Lee, and E Shacter. Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo. *Free Rad Biol Med* **29**(7): 684-692, 2000.
- [16] SL Arnaiz, MF Coronel, A Boveris. Nitric Oxide, Superoxide, and Hydrogen Peroxide production in Brain Mitochondria after Haloperidol Treatment. *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **3**: 235-243, 1999.
- [17] Y Liu, DA Peterson, H Kimura, and D Schubert. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* **69**: 581-593, 1997.

- [18] DDM Wayner, GW Burton, KU Ingold, and S Locke. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett* **187**(1): 33-37, 1985.
- [19] RG Spragg, DB Hinshaw, PA Hyslop, IU Schraustatter, CG Cochrane. Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D₁ cells after oxidant injury. *J Clin Invest* **76**: 1471-1476, 1985.
- [20] Y-L Lee, E Shacter. Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood* **89**: 4480-4492, 1997.
- [21] Y Chen, J Buck, and F Derguini. Anhydroretinol induces oxidative stress and cell death. *Cancer Res* **59**: 3985-3990, 1999.
- [22] M Murata, and S Kawanishi. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivatives via superoxide generation. *J Biol Chem* **275**(3): 2003-2008, 2000.
- [23] DD Newmeyer. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**: 481-490, 2003.
- [24] BP Chew, TS Wong, JJ Michal, FE Standaert, and LR Heirman. Subcellular distribution of β -carotene, retinol, and α -tocopherol in porcine lymphocytes after a single injection of β -carotene. *J Anim Sci* **69**: 4892-4897, 1991.
- [25] M Ott, JD Robertson, V Gogvadze, B Zhivotovsky, and S Orrenius. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *PNAS* **99**(3): 1259-1263, 2002.
- [26] S Pervaiz, and MV Clément. A permissive apoptotic environment: Function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 1145-1150, 2002.
- [27] Y-J Lee, and E Shacter. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* **274**(28): 19792-19798, 1999.

Figure Legend

Figure 1: Morphologic change of Sertoli cells during retinol treatment. Cells were treated for 24 h, harvested, stained with TUNEL and examined by fluorescence microscopy as described under “Materials & Methods” (original magnification, X400) (A-C) or directly analyzed by light microscopy (original magnification, X200) (D-F). Cells were treated with: *A* and *D*, no treatment; *B* and *E*, retinol 7 μM ; *C* and *F*, retinol 7 μM + trolox 0.1 μM . The data are from a representative study that was repeated at least three times.

Figure 2: Effect of retinol on apoptotic internucleosomal DNA fragmentation. Sertoli cells were treated by 12 h, harvested and DNA fragmentation were analyzed by conventional agarose gel eletrophoresis as described under “Materials & Methods”. Cells were treated with: *A*, no treatment; *B*, retinol 7 μM ; *C*, retinol 7 μM + trolox 0.1 μM . The data are from a representative study that was repeated at least three times. M.W.; Molecular weight standard.

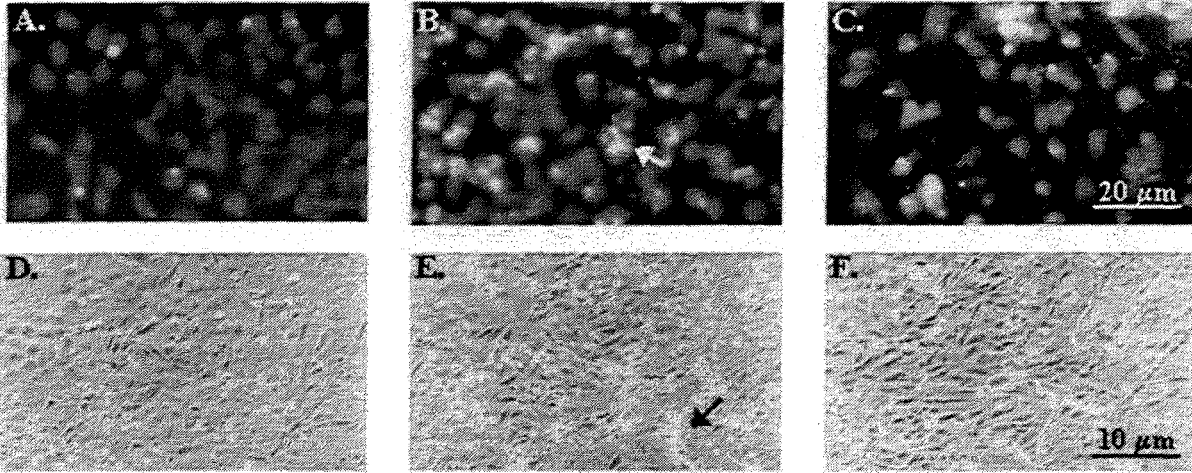
Figure 3: Inhibition of retinol-mediated change in Sertoli cells redox status by trolox co-administration. Cells were treated by different times and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as described under “Materials & Methods”. Cells were treated with: (■), no treatment; (O), retinol 7 μM ; (▲), retinol 7 μM + trolox 0.1 μM . The data are from a representative study that was repeated at least three times.** Different from control cells ($p < .01$) (ANOVA).

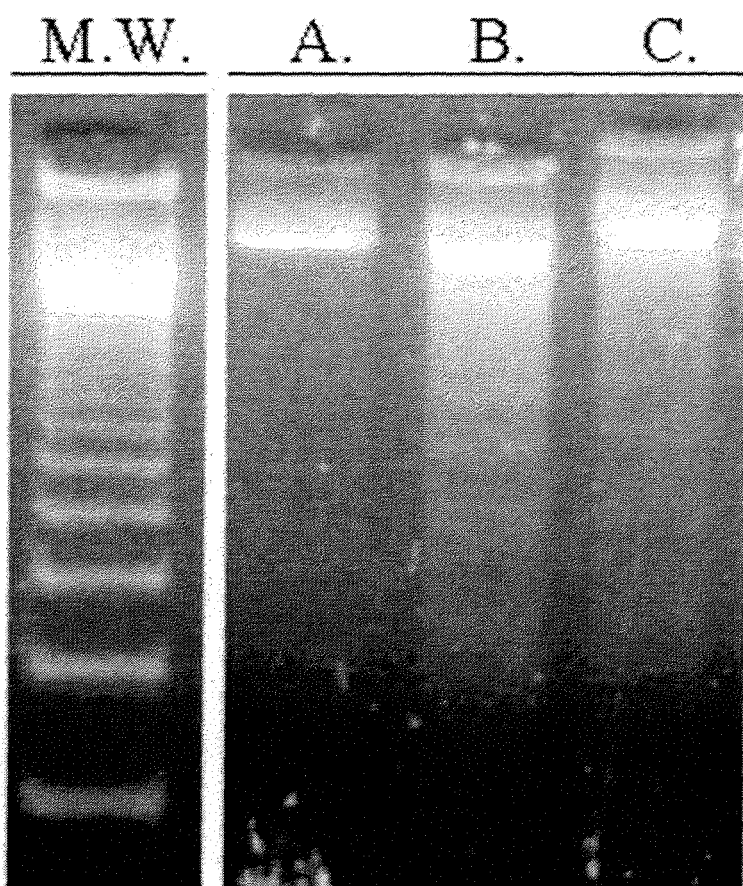
Figure 4: Inhibition of the time course retinol-mediated increased superoxide radical generation and decreased mitochondrial viability in Sertoli cells by trolox co-administration. Cells were treated by different times and MTT reduction (A.) and mitochondrial $O_2^{\cdot -}$ production (B.) were determined as described under "Materials & Methods". Cells were treated with: (■), no treatment; (O), retinol 7 μ M; (▲), retinol 7 μ M + trolox 0.1 μ M. Data represent mean \pm SEM of triplicates per experiment and four independent experiments (n = 4).** Different from control cells ($p < .01$); * ($p < .05$) (one-way analysis of variance).

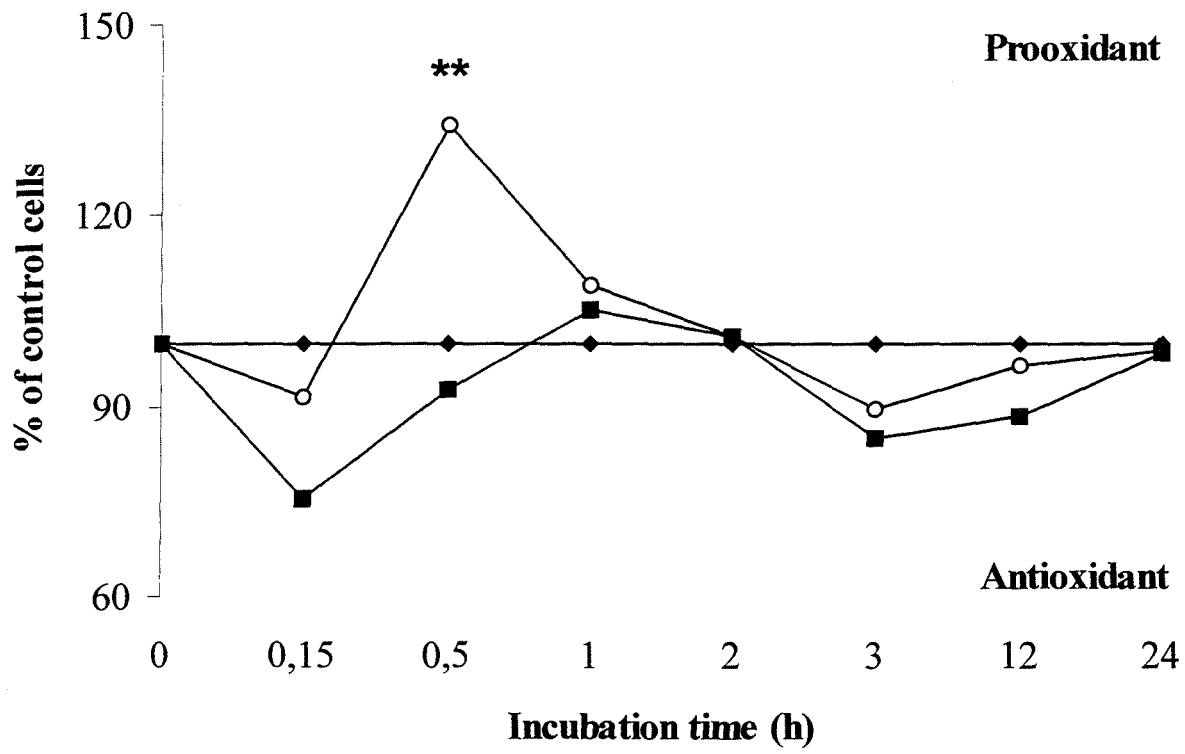
Figure 5: Time course of cytochrome *c* release and caspase-3-like activation in Sertoli cells treated with retinol. (A.) Western blot immunoassays for cyt *c* in cells permeabilized with digitonin and treated with retinol, as described under "Materials & Methods". Similar results were obtained in three separate experiments. (B.) At the times indicated, cell lysates were prepared and assayed for caspase-3-like activity using DEVD-AFC as substrate. Cells were treated with: (■), no treatment; (O), retinol 7 μ M; (▲), retinol 7 μ M + trolox 0.1 μ M. Data represent mean \pm SEM of triplicates per experiment and four independent experiments (n = 4).** Different from control cells ($p < .01$) (one-way analysis of variance).

Figure 6: PARP status and ATP levels in Sertoli cells after exposure to retinol. Cells were treated with retinol, lysed, and (A.) analyzed for cleavage of PARP by Western blot immunoassay after 12 h (similar results were obtained in three separate experiments), and (B.) assayed for ATP content. Cells were treated with: (■), no treatment; (O), retinol 7 μ M; (Δ), retinol 7 μ M + trolox 0.1 μ M. Data represent mean \pm SEM of triplicates per

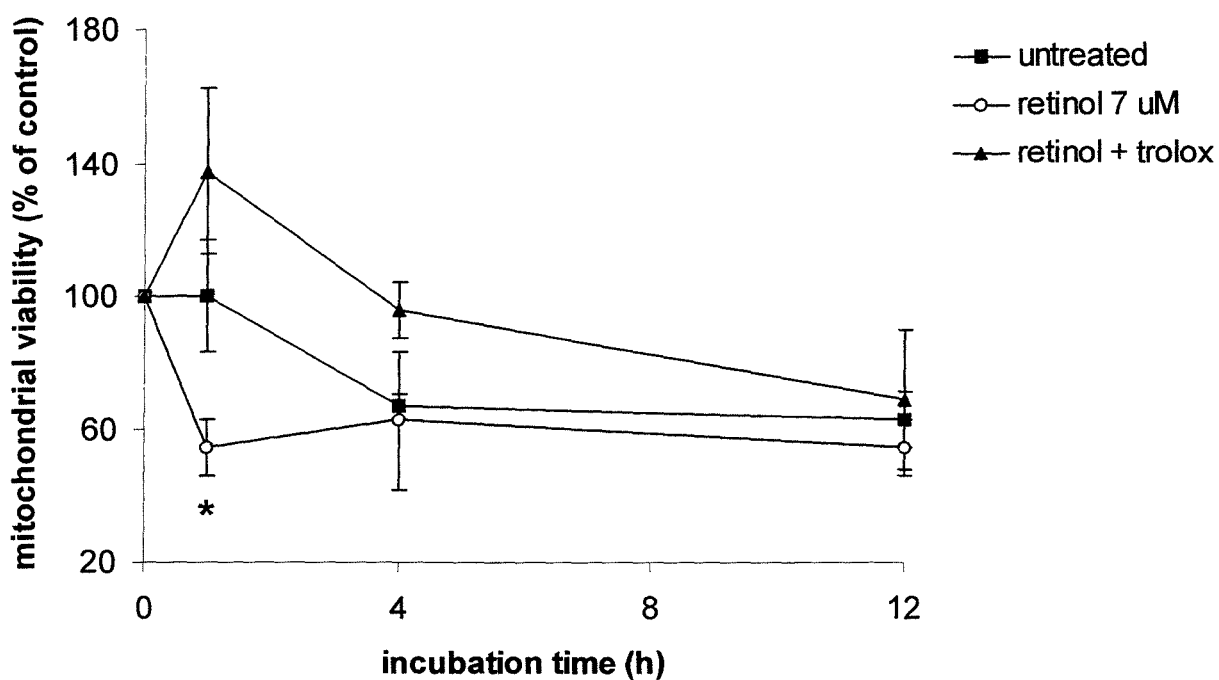
experiment and four independent experiments (n = 4).* Different from control cells ($p < .05$) (one-way analysis of variance).



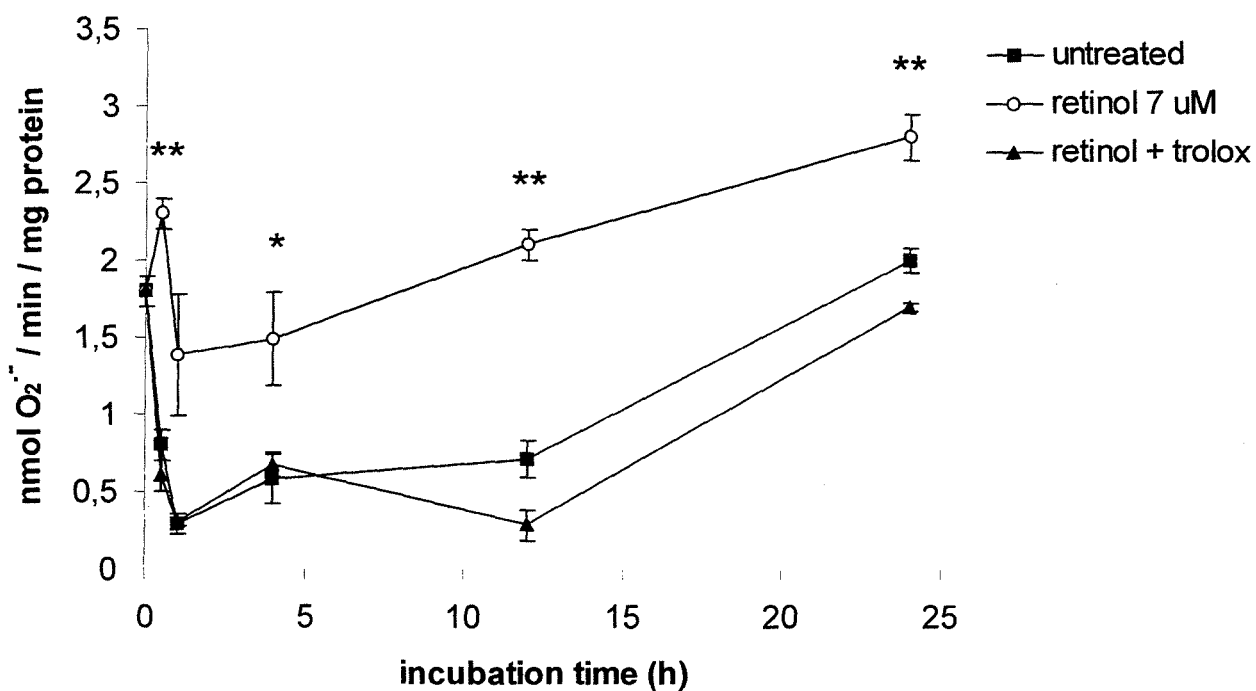




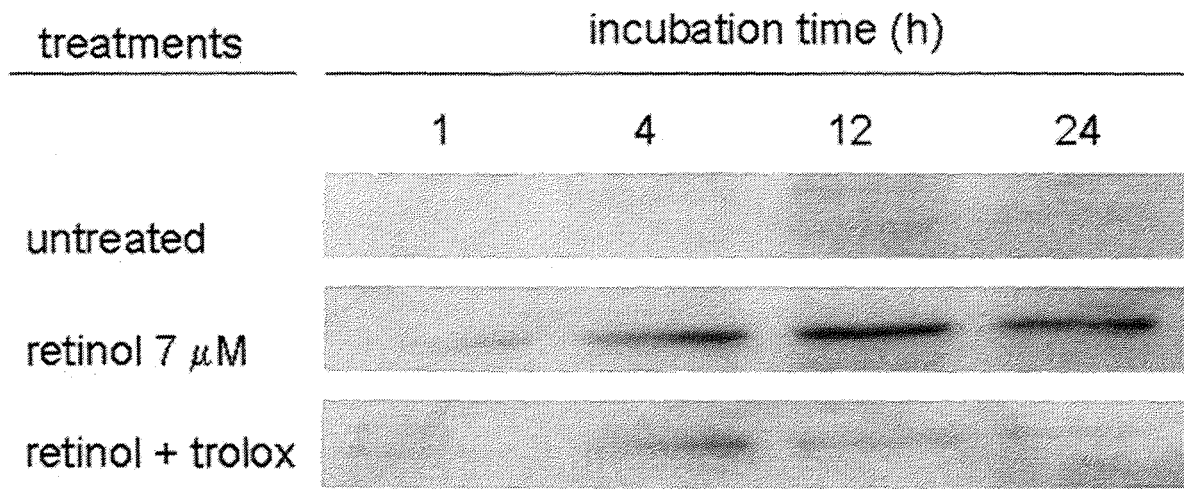
A.



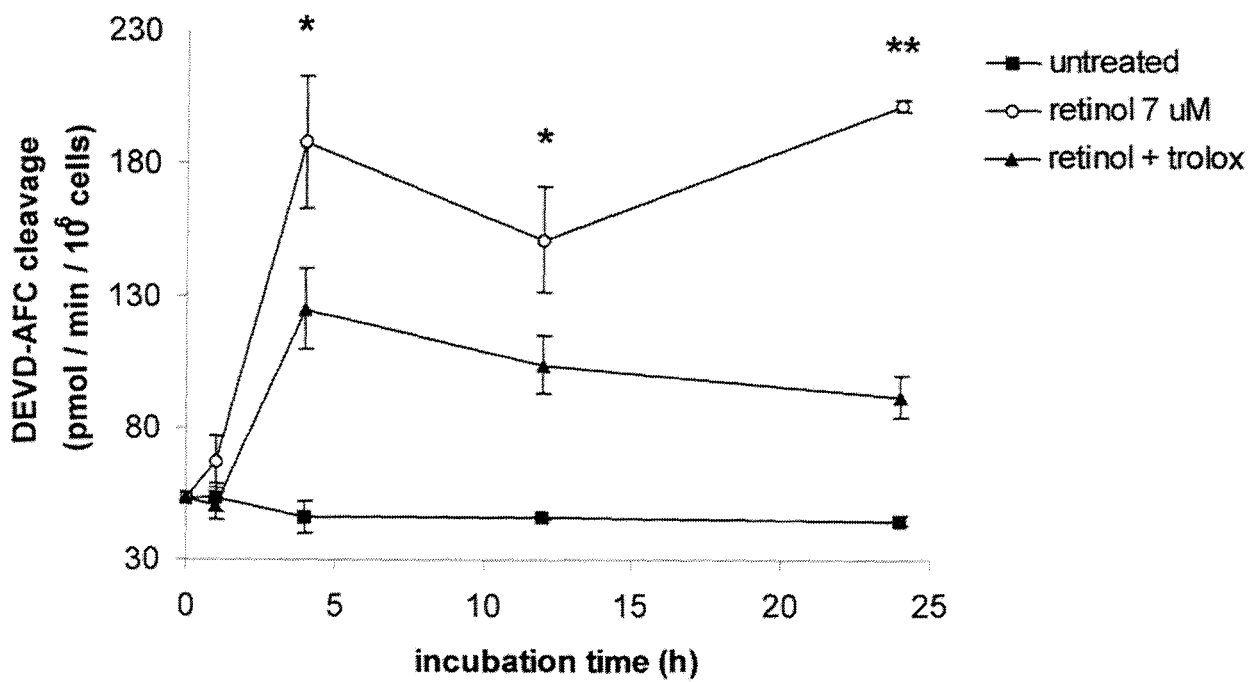
B.



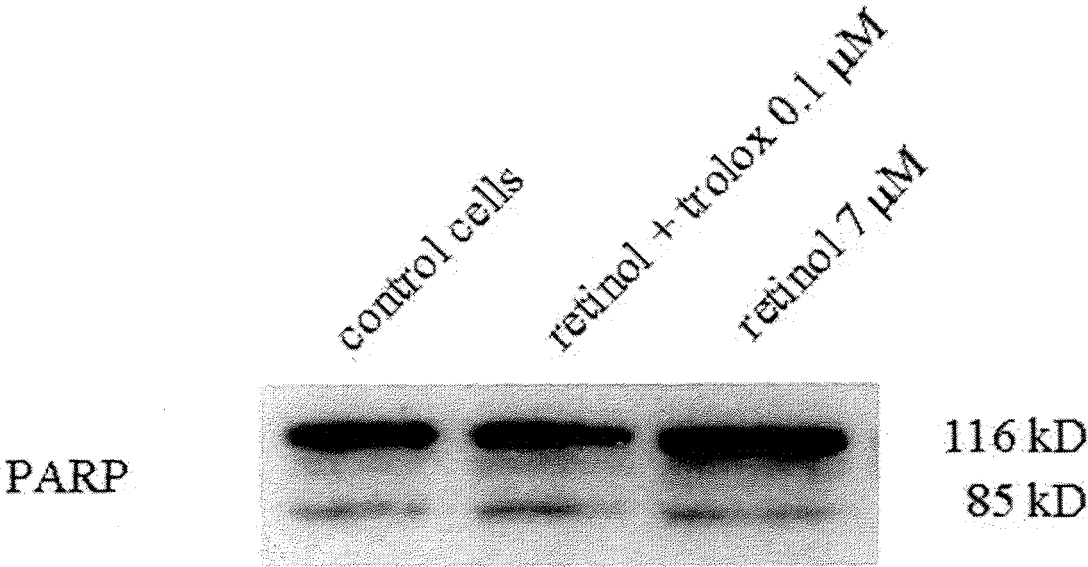
A.



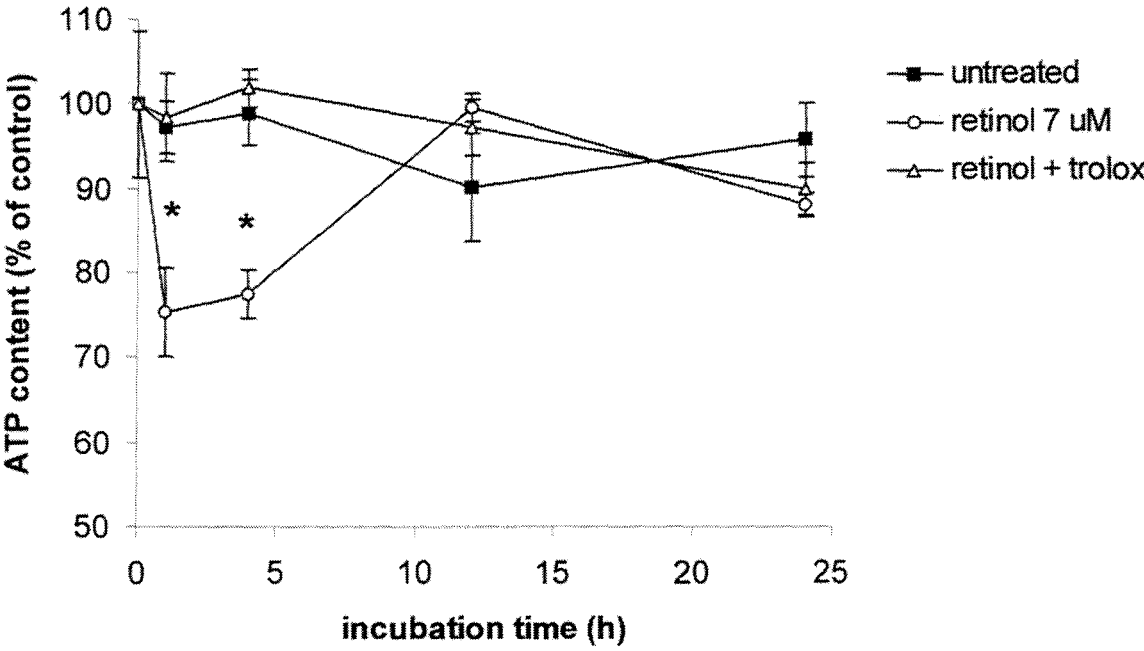
B.



A.



B.



Capítulo VIII

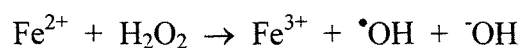
Discussão Geral

8. DISCUSSÃO

Os resultados presentes nos capítulos III, IV, V, VI e VII tiveram como objetivo principal a busca da caracterização de uma possível ação biológica da vitamina A mediada pela produção de espécies reativas do oxigênio.

Quando submetemos cultivo de células de Sertoli, células estas um dos principais alvos fisiológicos da vitamina A, ao tratamento com retinol, verificamos uma diminuição na viabilidade celular na mesma intensidade que o efeito de uma dose de irradiação ultravioleta (Cap. III, Fig. 1). Tanto em 24 h quanto 48 h de tratamento, a suplementação com retinol causou um aumento na morte celular mediada pela UV. Este mesmo efeito, de intensificar o dano causado pela irradiação com UV, foi verificado quando analisamos tanto a lipoperoxidação total e níveis de produção de radicais livres, quanto a oxidação de lipídeos da fração mitocondrial e fragmentação de DNA, danos estes provavelmente responsáveis pela diminuição da viabilidade (Cap. III; Tabela 1, Fig. 2 e 3). Todos estes efeitos da suplementação com vitamina A foram revertidos aos níveis das células não-tratadas quando foi co-administrado um “scavenger” de radicais hidroxil, o manitol, ou 1,10-fenantrolina, um quelante de ferro.

Estes resultados apresentados no capítulo III nos sugerem que a vitamina A causou um aumento nos danos oxidativos causados pela irradiação com ultravioleta em cultivo de células de Sertoli, e que este fenômeno é dependente da formação de radicais hidroxil, provavelmente pela chamada reação de Fenton [10]:





Estes resultados corroboram trabalhos prévios do nosso grupo que demonstraram uma aumentada captação e armazenamento de ferro, principalmente na fração nuclear e mitocondrial de células de Sertoli, além de que a metabolização dos retinóides pelas dehidrogenases aumenta os níveis de NADH celular (Cap. I; fig 1), permitindo assim a formação de radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) [25]. Como o dano oxidativo está relacionado com a iniciação e promoção de carcinogênese, nós sugerimos um possível mecanismo de ação do retinol, envolvendo um efeito pró-oxidante, no aumento da formação de tumores em camundongos irradiados com UV que receberam uma dieta rica em vitamina A [24].

O dano oxidativo mediado pela suplementação com retinol é dose dependente. No capítulo IV, nós demonstramos que doses de retinol entre 0,1 e 5 μM não induzem a lipoperoxidação nem aumentam a atividade da catalase, enzima esta chave na decomposição do peróxido de hidrogênio (Cap. IV; Fig. 2 e 3). Não obstante, tratamento com doses de 7 μM ou mais causaram dano oxidativo, revertido novamente pela co-administração de quelantes de metais ou scavenger de radicais $\bullet\text{OH}$. A célula de Sertoli possui em torno de 5 μM de retinol, como sua concentração fisiológica.

Um dos marcadores mais utilizados para proliferação celular e promoção tumoral é a atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC), enzima chave na síntese de poliaminas. A atividade da ODC serve como um marcador de passagem de fase do ciclo celular, da fase G1 para S e, recentemente, demonstrou-se que sua expressão é induzida por radicais livres (Cap. IV). A ativação da ODC pelo tratamento com retinol é dependente do efeito pró-oxidante do retinol em células de Sertoli (Cap. IV; Fig. 1 e 2). Estes resultados

sugerem que a suplementação com retinol causa um dano oxidativo pela produção de espécies reativas do oxigênio e que, além do dano oxidativo, diversos genes responsivos a radicais livres são ativados, entre eles o gene de promoção tumoral ODC [14].

Como os retinóides são amplamente utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças epidérmicas e diferentes tipos de tumores [5] e, levando-se em conta os resultados obtidos nos capítulos III e IV, o próximo passo foi determinar se os radicais livres produzidos pelo tratamento com retinol possuíam um papel importante em uma provável genotoxicidade e promoção tumoral. No capítulo V estão agrupados os resultados que demonstram que a suplementação com vitamina A induz a quebra de fita simples e dupla de DNA, tanto em células de Sertoli quanto em linhagem de fibroblasto de pulmão (Cap. V; tabela 2, fig.1 e 2). Em um ensaio de genotoxicidade, utilizando-se do padrão de pelagem de moscas alimentadas com vitamina A, nós verificamos que o retinol possui uma capacidade de induzir a fenômenos de recombinação gênica (Cap. V; tabela 1).

O intenso dano oxidativo ao DNA, somado ao evento de recombinação, são fortes promotores de instabilidade genômica, causando assim três processos biológicos distintos: a adaptação celular, a transformação celular e a morte celular. Previamente, nosso grupo demonstrou que o tratamento com retinol aumenta a atividade das enzimas de defesa antioxidantes, um evento claro de adaptação celular [26]. Mas estes mesmos resultados demonstram que o tratamento com retinol causa um aumento de três vezes na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e apenas 20 % na atividade da catalase (CAT), quando comparadas às células controles. Este desbalanço leva a uma grande taxa de dismutação do radical superóxido, gerando o peróxido de hidrogênio, e uma ineficaz detoxificação deste que, ao acumular dentro da célula, reage com a grande quantidade de ferro presente formando, via reação de Fenton, o radical hidroxil [10, 25, 26]. Esta produção de espécies

reativas de oxigênio, em células de Sertoli cultivadas, servem como sinal mitogênico [28], levando à ativação de enzimas de passagem de fase de ciclo celular (ODC) (Cap. IV) e à proliferação celular. As células de Sertoli tratadas com retinol, quando analisadas em citometria de fluxo, possuem uma distribuição alterada no ciclo celular, aumentando a população de células na fase S e na fase G2-M, demonstrando claramente a proliferação celular induzida por retinol. Além disso, há um aumento na população de células na fase hipodiplóide, sugerindo o processo de apoptose (Cap.V; fig. 3). Quando as células de Sertoli tratadas com retinol são mantidas em cultivo por 15 dias, evidenciamos a formação de focos proliferativos, um dos primeiros indícios de transformação celular pré-neoplásica (Cap. IV; fig 4). Estes resultados somados sugerem um mecanismo de ação pró-oxidativo da vitamina A estando relacionado com um aumento na incidência de tumores, como demonstrados em estudos prévios [23,24].

O dano oxidativo induz a morte celular, tanto via necrose quanto via apoptose, dependendo de que tipo de radical formado, de sua concentração e do tempo de exposição. No capítulo III (fig.1) nós verificamos uma diminuição na viabilidade celular mediada pelo tratamento com vitamina A e, no capítulo V, um aumento na população de células em fase hipodiplóide (fig. 3). Ambos resultados sugerem um aumento na morte celular mediada pelo retinol. Os retinóides são amplamente utilizados na clínica como agentes quimioterápicos no combate e na prevenção de tumores, principalmente pela capacidade de indução de diferenciação celular (maturação) e morte celular programada (apoptose) mas, ainda hoje, o mecanismo de ação destes compostos não é bem conhecido.

O capítulo VI descreve uma possível via de ativação de apoptose mediada pela vitamina A sobre o metabolismo mitocondrial. A mitocôndria está relacionada com a ativação da maquinaria apoptótica, isto é, caspase-9 e caspase-3, pela liberação de fatores

pró-apoptóticos, principalmente o citocromo c. Apesar de bem conhecido o papel do citocromo c na ativação caspases, o mecanismo que induz a liberação de citocromo c pela mitocôndria e os agentes que modulam este processo ainda não estão bem determinados (Cap. VI).

O tratamento com retinol causa uma lipoperoxidação mitocondrial dose dependente, em mitocôndrias isoladas de fígado (Cap. VI; fig 4). Esta oxidação está relacionada com a perda de cardiolipina, lipídio de membrana que ancora fracamente o citocromo c na membrana interna da mitocôndria, causando a liberação deste para o espaço intermembrana (Cap. I; fig 2). A liberação para o citoplasma deve-se à perda transitória da permeabilidade mitocondrial (mPT), devido à abertura do chamado poro de permeabilidade transitória (PTP), ou a formação de canais na membrana externa mediada pela oligomerização de proteínas da família Bcl, como Bak e Bax (Cap. I; fig 2). Este processo, em última análise, leva à perda do potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e ao "swelling". As figuras 1, 2 e 3 do capítulo VI demonstra um efeito dose dependente do tratamento com retinol nos processos de "swelling" e perda do potencial de membrana mitocondrial. Nós verificamos também um aumento na liberação de citocromo c (Cap. VI; tabela 1) e uma conseqüente diminuição no conteúdo total de citocromo c em mitocôndrias tratadas (Cap. VI; fig 5) e este aumento foi revertido pelo co-tratamento com trolox, um análogo sintético da vitamina E, sugerindo a participação do efeito pró-oxidante do retinol neste fenômeno. A liberação de citocromo c pelo tratamento com retinol provavelmente induz, na mitocôndria, um aumento na produção de radical superóxido pela cadeia transportadora de elétrons e diminuição da respiração celular, evidenciado pela diminuição na oxidação da sonda MTT, de uma maneira dose dependente.

Uma vez estabelecida, em mitocôndrias isoladas de fígado, uma possível via de ativação de morte celular programada pelo tratamento com retinol mitocôndria-dependente, o próximo passo foi de testar este modelo experimental em cultivo de células de Sertoli, e de determinar o possível papel do efeito pró-oxidante da suplementação com retinol neste processo.

Culturas de células de Sertoli foram tratadas com retinol 7 μ M por 24 horas e co-tratadas com trolox e a apoptose foi determinada pela análise morfológica do padrão de marcação de núcleos pela técnica de TUNEL (Cap. VII; fig 1). Os resultados demonstram que a vitamina A foi capaz de induzir a apoptose, e que este efeito foi dependente da formação de radicais livres, já que o co-tratamento com antioxidante reverteu o processo. A fragmentação internucleossomal de DNA pelas endonucleases ativadas durante a apoptose gerou um padrão de escada (ladder pattern), quando estes fragmentos foram analisados em eletroforese em gel de agarose. Em 12 horas de tratamento já foi possível observar a fragmentação apoptótica do DNA de células tratadas com retinol, fragmentação esta revertida pelo tratamento com trolox (Cap. VII; fig. 2).

Uma vez determinado que os radicais livres produzidos pelo tratamento com retinol induziam apoptose, o papel da mitocôndria neste processo foi determinado. O tratamento com retinol causa um pulso oxidante temporário na célula (Cap. VII; fig. 3), que induz a diminuição temporária da viabilidade mitocondrial e leva a uma queda nos níveis de ATP (Cap. VII; fig. 4, 6). Todos estes processos ocorrem na primeira hora de tratamento, e podem ser revertidos pelo tratamento com antioxidante. Como consequência, há um aumento na produção de radicais superóxido pela cadeia transportadora de elétrons e uma liberação de citocromo c. A liberação de citocromo c, que ocorre em torno da quarta hora

de tratamento, leva a uma ativação da caspase-3, uma das enzimas efetoras na morte celular programada (Cap. VII; fig. 5). Para que ocorra a apoptose é necessário que exista, na célula, um ambiente favorável para a atividade das caspases, como manutenção dos níveis basais de ATP e um ambiente redutor. A figura 3 demonstra que o ambiente redox celular, no momento da liberação mitocondrial de citocromo c, se encontra propício para a a atividade das caspases, além de que os níveis de ATP não apresentaram diferenças com os das células controles (Cap. VII; fig 5). Um dos principais depletadores dos níveis de ATP durante o processo de morte celular é a enzima PARP. Esta enzima é ativada durante grande dano oxidativo ao DNA, evidenciado, em nosso modelo, no capítulo V (tabela 2). Em células de Sertoli a PARP apresenta-se na forma clivada e, conseqüentemente, inativada em todos os tratamentos, como demonstra a figura 5 do capítulo VII, permitindo que os níveis de ATP não variem durante a ativação e execução da morte celular programada. Estes resultados descrevem um mecanismo espacial e temporal na ativação e indução da maquinaria apoptótica pelos radicais livres produzidos pela suplementação com vitamina A.

Capítulo IX

Conclusão

9. CONCLUSÃO

9.1 Conclusões Específicas

- O tratamento com retinol (7 μ M, 24 h) amplificou os danos oxidativos causados pela irradiação ultravioleta em cultivos de células de Sertoli, provavelmente pela formação, via reação de Fenton, do radical hidroxil;
- O tratamento com retinol aumentou a atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC), e este aumento é mediado pela produção de espécies reativas de oxigênio;
- O tratamento com retinol causou quebra de fita simples e dupla de DNA, e recombinação mitótica. Este efeito genotóxico está relacionado com a progressão no ciclo celular e transformação pré-neoplásica, em diferentes modelos experimentais;
- O tratamento com retinol alterou o metabolismo de mitocôndrias isoladas de fígado, levando a um aumento na lipoperoxidação, produção de radical superóxido e liberação de citocromo c, induzindo a permeabilidade transitória mitocondrial e perda do potencial de membrana, de uma forma dose dependente;

- Em cultivo de células de Sertoli, o tratamento com retinol causou ativação da maquinaria apoptótica pela liberação mitocondrial de citocromo c e ativação de caspase-3, em um processo dependente da produção de radicais livres.

9.2 Conclusão Geral

Os presentes resultados, tomados em conjunto, sugerem que alguns fenômenos biológicos modulados pelo retinol, como o aumento na citotoxicidade da irradiação UV, a ativação de expressão gênica (ODC), a proliferação celular, a transformação pré-neoplásica, bem como a morte celular, são relacionados ao menos parcialmente à produção de espécies reativas de oxigênio.

Dada a ampla utilização dos retinóides em formulações, suplementações dietéticas e como co-adjuvante em intervenções terapêuticas, este trabalho nos possibilita evidenciar que, ainda nos dias de hoje, a comunidade médica e científica ainda não possui a real dimensão do amplo espectro de fenômenos influenciados pelo tratamento com vitamina A, além do papel dos radicais livres na modulação destes processos. A grande necessidade da busca e caracterização dos processos mediados pelos radicais livres produzidos pelo retinol serve de base para o futuro desenvolvimento de protocolos de utilização dos retinóides, permitindo assim uma maior eficácia e segurança, e, ao mesmo tempo, minimizando possíveis efeitos colaterais mediados pelo seu uso para a saúde pública.

Capítulo X

Referências Bibliográficas

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M A Livrea and L Packer. Retinoids – Progress in research and clinical application. Marcel Dekker Inc, New York, 1993.
- [2] T C Roos, FK Jugert, HF Merk, and DR Bickers. Retinoid metabolism in the skin. *Pharmacol Ver* 50(2): 315-333, 1998.
- [3] G Duester. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase-reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35: 12221-12227, 1996.
- [4] L Altucci, and H Gronemeyer. Nuclear receptors in cell life and death. *TRENDS Endocrinol Metab* 12(10): 460-468, 2001.
- [5] LA Hansen, CC Sigman, F Andreola, AS Ross, GJ Kellof, and LM De Luca. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 21(7): 1271-1279, 2000.
- [6] JL Clifford, DG Menter, M Wang, R Lotan, and SM Lippman. Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 59: 14-18, 1999.
- [7] A Radomska-Pandya, G Ghen, PJ Czernik, JM Little, VM Samokyszyn, CA Carter, and G Nowak. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). *J Biol Chem*, 275(29): 22324-22330, 2000.
- [8] B Hoyos, A Imam, R Chua, C Swenson, G-X Tong, E Levi, N Noy, U Hämmerling. The cysteine-rich regions of the regulatory domains of Raf and Protein Kinase C as Retinoid Receptor, *J Exp Med* 192: 835-845, 2000.

- [9] G Powis, and WR Montofort. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 421-455, 2001.
- [10] B Halliwell, and JMC Gutterdge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc. New York, 3th ed, 1999.
- [11] A Boveris. Biochemistry of Free Radicals: From eletrons to tissue. *Medicina (Buenos Aires)* 59: 350-356, 1998.
- [12] JS Beckman, and WH Koppenol. NO, O₂⁻ and ONOO⁻: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424, 1996.
- [13] C Giulivi, A Boveris, and E Cadenas. The steady-state concentration of oxygen radicals in mitochondria. *Reactive oxygen species in biological systems*. Kluwer Academic / Plenium Publisher, 77-102, New York.
- [14] RG Allen, and M Tresini, Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* 28(3): 463-499, 2000.
- [15] L Montagnier, R Oliver, and C Pasquier. *Oxidative stress in cancer, aids and neurodegenerative diseases*. Marcell Dekker Inc, New York, 1998.
- [16] K Hensley, KA Robinson, S Prasad-Gabbita, S Salsman, and RA Floyd. Reactive oxigen species, cell signaling, and cel injury. *Free Rad Biol Med* 28(10): 1456-1462, 2000.
- [17] K Saito, S Packianathan, and LD Longo. Free radical-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in developing rat brain slices. *Brain Res* 763: 232-238, 1997.
- [18] E Lovaas. Hypothesis: Spermine may be an important epidermal antioxidant. *Med Hypothesys* 45: 59-67, 1995.
- [19] RH Burton. Superoxide and hidrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad Biol Med* 4: 775-794, 1995.

- [20] J Bustamante, A Tovar-B, G Montero, and A Boveris. Early redox changes during rat thymocyte apoptosis. *Archives Biochem Biophys* 337(1): 121-128, 1997.
- [21] B Del-Bello, A Paolicchi, M Comporti, A Pompella, and E Maellaro. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* 13: 69-79, 1999.
- [22] T Finkel. Oxygen radicals and signaling. *Cur Op Cell Biol* 10: 248-253, 1998.
- [23] GS Omenn, GE Goodman, MD Thornquist, J Balmes, MR Cullen, A Glass, JP Keogh, FLJr Meyskens, B Valanis, JHJr Williams, S Barnhart, S Hammar. Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 334: 1150-1155, 1996.
- [24] S Mikkelsen, B Berne, B Staberg, A Vahlquist. Potentiating effect of dietary vitamin A on photocarcinogenesis in hairless mice. *Carcinogenesis* 19: 663-666, 1998
- [25] F Dal-Pizzol, F Klamt, MLC Frota Jr, LF Moraes, JCF Moreira, MS Benfato. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells, *Free Rad Res.* 33: 677-687, 2000.
- [26] F Dal-Pizzol, F Klamt, MS Benfato, EA Bernard, JCF Moreira. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* 34: 395-404, 2000.
- [27] M Murata, and S Kawanishi. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivatives via superoxide generation. *J Biol Chem* 275(3): 2003-2008, 2000.
- [28] F Dal-Pizzol, F Klamt, RJS Dalmolin, EA Brenard, and LCF Moreira. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated Sertoli cells. *Free Rad Res* 35: 749-755, 2001.

