

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

*Ação extra nuclear do ácido retinóico via espécies reativas do oxigênio em células de
Sertoli*

Mestrando: Mário Luiz Conte da Frota Junior

Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Co-orientador: Dr. Fábio Klamt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica,
como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

Porto Alegre, 2005

Esse trabalho foi realizado no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me ensinaram os princípios morais e éticos para chegar até aqui;

Ao meu irmão e melhor amigo Michael Frota, o “Galo Cinza”, que sempre foi fonte inspiradora para o seu “mano” aqui;

A minha LINDA Aninha Frota, que me mostrou, ao ressurgir em minha vida, que ainda existe esperança. Tu és DEMAIS!

Aos meus amigos que indiretamente me ajudaram a “relaxar” nas horas difíceis, seja pegando umas ondas, jogando um tênis na quadrinha, ou simplesmente fazendo um “COSTELÃO” na praia...grandes momentos;

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica (Cléa, Cláudia, Bebel, Sérgio, Dona Lia, etc...);

Aos meus colegas de Departamento, sem eles não haveria graça alguma fazer desse local a minha segunda casa (Gringa, Japa, Labareda, Luis, Fabiano, Cláudia, Francine, Jean, Senger, e mais uma raça que não vou lembrar...);

Aos colegas de laboratório Amâncio, Michael, Ramatis, Fernanda, Manu, Rodrigo, Matheus, Ricardo, Marcos, Márcio, Ana, Martina, Alfeu, Evandro, Geléia, Guilherme,

Felipe e Fábio. Horas de chimarrão, infinitas discussões, inúmeras diferenças, incontáveis gargalhadas. Não conheço uma palavra que expresse o que vocês são para mim;

Um agradecimento em especial para os colegas que me ensinaram muito do que eu sei hoje no laboratório, Fábio Klamt e Felipe Dal-Pizzol. Valeu, além de amigos vocês são exemplos a serem seguidos.

Aos professores do Departamento, em especial as professoras Helena e Fátima, que, de uma maneira ou outra, fizeram parte da minha história aqui na Bioquímica;

E por último, mas não menos importante, a uma pessoa que consegue guiar um bando de malucos, “os guris do Zé”, para os melhores caminhos da vida. Um amigo, um irmão, um pai. Uma vez ele disse que o que fazemos está longe de ser ciência, no sentido nobre da palavra: “... fazemos pesquisa, e de qualidade!”. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, o Zé, me ensinou a fazer pesquisa no sentido pleno da palavra. Ensinou-me quase tudo nesse laboratório; senão tudo. Caráter, ética, profissionalismo, admitir o erro quando estivermos errados, assumir a culpa, pedir desculpas, chamar a “responso”. Se existe alguém que está muito mais perto do que qualquer outra pessoa que eu conheço nesse meio científico cheio de “egos e de dedos” de fazer ciência és tu Zé, e isso é uma honra para quem tem a oportunidade de fazer parte do laboratório 25. VALEU!!!

“Imagination is more important than knowledge.
Knowledge is limited,
imagination encircles the world.”

(Albert Einstein)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
SIGLAS E ABREVIACÕES.....	9
RESUMO.....	11
 Capítulo I – INTRODUÇÃO	
1. INTRODUÇÃO	
1. 1 História do oxigênio.....	15
1. 1. 2 Radicais livres: estrutura atômica.....	16
1. 1. 3 Espécies reativas de oxigênio.....	17
1. 1. 3. 1 Ânion superóxido.....	18
1. 1. 3. 2 Peróxido de hidrogênio.....	19
1. 1. 3. 3 Radical hidroxil.....	19
1. 1. 3. 4 Radical peroxil.....	20
1. 1. 4 Principais defesas antioxidantes.....	21
1. 1. 4. 1 Defesas enzimáticas.....	22
1. 1. 4. 1. 1 Superóxido dismutase (SOD).....	22
1. 1. 4. 1. 2 Catalase (CAT).....	22
1. 1. 4. 1. 3 Glutationa peroxidase (GPx).....	22
1. 1. 4. 2 Defesas não enzimáticas.....	23
1. 2 RETINÓIDES	
1. 2. 1 Histórico.....	23
1. 2. 2 Estrutura e propriedades químicas.....	24
1. 2. 3 Nomenclatura.....	25
1. 2. 4 Absorção, transporte e estresse oxidativo.....	26

1. 2. 5 Efeitos biológicos.....	27
1. 2. 6 Metabolismo da vitamina A: formação de ácido retinóico.....	28
1. 2. 7 Retinóides e estresse oxidativo.....	29
1. 3 CÉLULAS DE SERTOLI COMO MODELO DE ESTUDO	
1. 3. 1 Breve histórico.....	30
1. 3. 2 Sistema antioxidante em células de Sertoli.....	31
1. 3. 3 Efeitos biológicos dos retinóides em células de Sertoli.....	31
1. 3. 4 Metabolismo de retinóides em células testiculares.....	32
Capítulo II – OBJETIVOS	
2. 1 Objetivo geral.....	36
2. 2 Objetivos específicos.....	36
Capítulo III – ARTIGO	
<i>All-trans</i> Retinoic Acid Induces Free Radical Generation and Modulate Antioxidant Enzyme Activities in Rat Sertoli Cells.....	
	37
Capítulo IV – Discussão geral	
4. Discussão geral.....	64
Capítulo V – CONCLUSÕES	
5. 1 Conclusões específicas.....	72
5. 2 Conclusão geral.....	72
Capítulo VI – PERSPECTIVAS	
6. Perspectivas.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS (Carta de aceite do artigo para publicação no periódico “Molecular and Cellular Biochemistry”.....)	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I - INTRODUÇÃO

Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio <i>via</i> redução do oxigênio.....	18
Figura 2. Representação esquemática do termo estresse oxidativo.....	21
Figura 3. Estrutura de dois principais retinóides naturais.....	25
Figura 4. Algumas funções dos retinóides.....	28
Figura 5. Metabolismo do retinol em células testiculares.....	34

Capítulo III – ARTIGO

Figura 1. Determination of TBARS in cells treated with RA.....	56
Figura 2. Determination of cell viability in cells treated with RA.....	57
Figura 3. Superoxide dismutase activity in cells treated with RA.....	58
Figura 4. Glutathione peroxidase activity in cells treated with RA.....	59
Figura 5. Catalase activity in cells treated with RA.....	60
Figura 6. Effect of RA on the oxidative degradation of 2-deoxyribose.....	61
Figura 7. TRAP index.....	62

SIGLAS E ABREVIACÕES

•OH: radical hidroxil

ADH: álcool desidrogenases

ALDH: aldeído desidrogenases

AR: ácido retinóico

ATP: adenosina trifosfato

CARET: estudo da eficácia do beta-caroteno e retinol

CAT: catalase

CRABP: proteína celular de ligação de ácido retinóico

CRBP: proteína celular de ligação de retinol

CuZnSOD: superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DNA: ácido desoxirribonucéico

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

ERO: espécie reativa de oxigênio

FSH: hormônio folículo-estimulante

GPx: glutaciona peroxidase

GSH: glutaciona reduzida

GSSG: glutaciona oxidada

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

LRAT: retinol aciltransferase

MDA: malondialdeído

MnSOD: superóxido dismutase dependente de manganês

NADH: adenina nicotinamida dinucleotídeo reduzida

O₂•⁻: radical superóxido

ODC: ornitina decarboxilase

PKC: proteína quinase C

PUFA: ácidos graxos poliinsaturados

RAL: retinal

RAR: receptor de ácido retinóico

RARES: elementos de resposta ao ácido retinóico

RBP: proteína de ligação de retinol

RE: éster de retinol

RO₂•: radical peroxil

ROL: retinol

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: receptores de retinóides

SOD: superóxido dismutase

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TTR: transtirretina

RESUMO

Durante a respiração celular, cerca de 1 a 3% do oxigênio metabolizado produz espécies reativas de oxigênio (ERO). Entretanto, para defender o organismo do efeito dessas espécies, existem vários sistemas antioxidantes, dependendo do organismo, da célula ou do tecido em questão.

A Vitamina A (retinol) e seu derivados exercem uma infinidade de efeitos em diversos processos biológicos, destacando-se a embriogênese, visão, regulação de processos inflamatórios, crescimento, proliferação e diferenciação de células normais e neoplásicas.

Embora o potencial antioxidante da vitamina A e carotenóides tenha sido descrito primeiramente, sabe-se hoje que, sob diferentes condições, essas moléculas podem se comportar de uma maneira pró-oxidante. Por isso, atualmente são melhores descritas como moléculas redox ativas.

Apesar dos nossos trabalhos anteriores demonstrarem um efeito pró-oxidante do retinol em culturas de células de Sertoli, o mecanismo exato pelo qual esse efeito é verificado permanece a ser elucidado. Uma vez que o ácido retinóico (AR) é o metabólito mais ativo do retinol, foram verificados os efeitos da suplementação de AR em culturas de células de Sertoli, com o objetivo de verificar se os efeitos anteriormente observados com o retinol devem-se à metabolização do mesmo a AR.

Nossos resultados mostraram que o AR em baixas doses não aumentou os níveis de TBARS. Além disso, na concentração de 1 nM o AR foi capaz de diminuir os níveis de TBARS. Entretanto, quando as células foram tratadas com altas doses de AR foi observado um aumento destes níveis, além de uma diminuição da viabilidade celular.

Uma vez que altas doses de AR induziram um aumento na lipoperoxidação e diminuíram a viabilidade celular, nós decidimos investigar somente os efeitos de doses fisiológicas (nM) de AR. Foram dosadas as atividades da SOD, CAT e GPx em células de Sertoli tratadas com AR. A atividade da SOD encontrou-se aumentada em todas as doses testadas. A atividade da GPx mostrou-se aumentada nas células tratadas com 0,1 nM, 1 nM e 10 nM e a atividade da CAT aumentou somente com 1 nM de AR. Esses resultados sugerem que o AR em doses fisiológicas aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, protegendo, assim, as células do estresse oxidativo, como pode ser observado nos índices de lipoperoxidação e viabilidade celular. Todavia, o mecanismo pelo qual o AR induz a geração de ERO é desconhecido. Então nós decidimos verificar a ação anti ou pró-oxidante *in vitro* do AR. Na concentração suprafisiológica de 10 μ M, AR foi capaz de degradar a 2-deoxirribose, um substrato específico do radical hidroxil, sugerindo que a auto-oxidação do mesmo é capaz de gerar radicais livres. Além disso, o potencial antioxidante total do AR foi avaliado: altas concentrações de AR (1–10 μ M) aumentaram a geração de radicais livres. Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que o ácido retinóico é capaz de gerar radicais livres e sugerem, pelo menos em parte, que alguns efeitos induzidos por AR podem ser mediados por ERO geradas a partir da degradação espontânea do ácido retinóico.

Classicamente, os efeitos biológicos dos retinóides estão relacionados à sua conversão em ácido retinóico através da modulação da expressão de genes. Entretanto, recentes trabalhos têm demonstrado que os retinóides possuem ações biológicas que não envolvem sua interação com receptores nucleares. Assim, alguns autores sugerem que o

mecanismo de regulação dos retinóides também seja por modificação do estado redox celular.

As concentrações de AR utilizadas nesse trabalho variaram de faixa do fisiológico até a do farmacológico. Sabe-se que as células de Sertoli sintetizam AR a partir do retinol circulante; isso pode ser uma das explicações dos efeitos observados em células de Sertoli tratadas com altas doses de retinol, uma vez que a metabolização de grandes concentrações de retinol poderia acarretar uma grande formação de ácido retinóico.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 História do oxigênio

O elemento oxigênio existe na atmosfera como uma molécula diatômica (O_2). Exceto para alguns organismos unicelulares anaeróbios e aero-tolerantes, todos os animais, plantas e bactérias necessitam de oxigênio para produção eficiente de energia pelo uso da cadeia transportadora de elétrons. Essa necessidade de O_2 “mascara” o fato de que o oxigênio é um gás mutagênico e tóxico; organismos aeróbios sobrevivem devido às suas defesas antioxidantes, como veremos mais adiante (Halliwell e Gutteridge, 2000).

O oxigênio surgiu em quantidades significativas na atmosfera terrestre há $2,5 \times 10^9$ anos atrás; evidências geológicas sugerem que isso ocorreu devido à evolução da fotossíntese por cianobactérias. Como elas “quebram” água para obter os elétrons necessários para as reduções metabólicas, esses organismos liberaram toneladas de O_2 na atmosfera. O inexorável aumento na concentração desse “novo” gás foi vantajoso, com uma conseqüente formação da camada de ozônio (O_3) na atmosfera. A habilidade do O_3 e do O_2 em filtrar a intensa radiação solar (UV-C) ajudou os organismos a “abandonarem” os oceanos e colonizarem um novo ambiente: o terrestre. Entretanto, o O_2 por si foi um grande “stress” para os organismos.

O surgimento dos primeiros organismos na terra ocorreu em uma atmosfera com muito pouco O_2 , isto é, eles eram essencialmente anaeróbios. Na medida em que o conteúdo desse gás crescia na atmosfera, muitos devem ter morrido. Os organismos anaeróbios presentes nos dias de hoje são os descendentes daqueles organismos primitivos que seguiram a rota evolucionária adaptando-se ao aumento atmosférico de O_2 e se restringindo a ambientes em que o gás oxigênio não penetrava.

Entretanto, outros organismos iniciaram um processo evolucionário desenvolvendo sistemas de defesas antioxidantes para proteção contra a toxicidade do O₂. Assim, seres que toleravam a presença desse gás podiam utilizá-lo para as suas transformações metabólicas e para uma eficiente produção de energia, o que acabou permitindo o desenvolvimento de organismos multicelulares (Bruyninckx *et al.* 1978).

Todos os seres vivos aeróbios utilizam o oxigênio como forma de produzir ATP. Cerca de 95 a 98% do O₂ consumido pelos animais é utilizado pela mitocôndria; essa organela é a principal fonte de ATP. A essência da transdução de energia é a oxidação das moléculas de alimentos (que começa no citosol) até a formação de ATP (que ocorre na mitocôndria), sendo o oxigênio o acceptor final de elétrons dessa cadeia transportadora. No entanto, durante a respiração celular, cerca de 1 a 3% do oxigênio metabolizado produz espécies reativas de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2000).

1. 1. 2 Radicais livres: estrutura atômica

A palavra átomo origina-se do grego: “a” = “não”, “tomo” = “parte”, ou seja, sem partes, indivisível. Contudo, o modelo aceito atualmente dessa partícula mínima da matéria é: a) um núcleo contendo prótons (que são partículas com carga positiva) e nêutrons (partículas com praticamente a mesma massa dos prótons, mas que não possuem carga); e b) a eletrosfera, ou seja, a região em torno do núcleo contendo elétrons (partículas que possuem massa quase que duas mil vezes menor que os prótons e que apresentam carga negativa).

Na eletrosfera, existem regiões onde os elétrons se movimentam sem ganhar ou perder energia: são os “níveis de energia”. Dentro desses existem subníveis.

Para entendermos a distribuição de elétrons dentro dos subníveis de energia, temos que ter os conceitos de orbital e “*spin*”. Orbital é a região do átomo onde há a maior probabilidade de se encontrar um elétron, que, por sua vez, pode girar em torno do seu próprio eixo criando um campo magnético em volta de si. Esse movimento chama-se “*spin*”. Por criar esse campo magnético, cada orbital comporta, no máximo, dois elétrons de “*spins*” opostos. Quando dois elétrons ocupam o mesmo orbital, dizemos que eles estão “pareados”. Entretanto, quando o elétron está sozinho num orbital, dizemos que é “não-pareado”, e esta estrutura com elétron “não-pareado” recebe o nome de “radical livre”.

Na ocorrência de um radical livre, existe uma instabilidade molecular, fazendo com que essa estrutura procure outra para “roubar” um elétron, se estabilizando, porém criando um novo radical numa verdadeira reação em cadeia. Segundo Halliwell e Gutteridge (2000), radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente (aqui o termo “livre”) que contém um ou mais elétrons desemparelhados. É importante lembrar que o átomo de oxigênio possui somente um elétron no orbital mais externo, sendo a molécula chamada de birradical.

1. 1. 3 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas derivadas do oxigênio e não são, necessariamente, radicais livres. Nesse contexto, o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) são exemplos de espécies radicalares, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como o ácido hipocloroso (HOCl), são exemplos de espécies não-radicalares.

Uma ERO pode reagir com biomoléculas e iniciar uma reação em cadeia de formação de radicais livres. Radicais podem ser formados quando ocorre a quebra de uma ligação covalente (em um processo conhecido como fissão homolítica) ou quando ganha ou

perde um elétron em uma reação química. Devido a suas propriedades, essas espécies possuem uma meia vida curta. Em organismos aeróbios, as ERO são subprodutos naturais do metabolismo celular ou podem ser geradas em resposta a algum stress (Hensley *et al.*, 2000). Abaixo podemos ver um esquema mostrando os passos da redução do oxigênio molecular *via* transferência de um elétron:

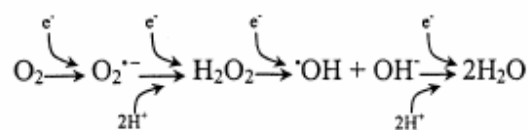


Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio *via* redução do oxigênio (adaptado de Nordberg e Årner, 2001).

1. 1. 3. 1 Ânion superóxido

Se um elétron é adicionado à molécula de oxigênio, tem-se a formação do radical mais comum e abundante na célula: o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$). Com somente um elétron desemparelhado, o radical superóxido é “menos radical” do que o O_2 por si, apesar do “super” no seu nome. Embora esse radical não seja altamente reativo, uma das principais teorias para explicar a toxicidade do O_2 propõe que a toxicidade é devido à superprodução de ânion superóxido. A formação desse radical acontece espontaneamente, especialmente em ambientes aeróbios ricos em elétrons como a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria ou em células fagocitárias (Anderson, 1996; Nordberg e Årner, 2001).

Provavelmente a fonte mais importante de produção de $\text{O}_2^{\bullet -}$ *in vivo* em muitos organismos aeróbios (talvez todos) seja a cadeia transportadora de elétrons. Ela está presente na membrana de muitas bactérias e dentro da mitocôndria e retículo endoplasmático de células eucarióticas. Em condições normais e fisiológicas, cerca de 1 a 3% do oxigênio reduzido na mitocôndria pode formar $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Na presença do íon ferroso (Fe^{2+}), durante o transporte de elétrons, há uma doação de um elétron para o oxigênio molecular. Assim, o ferro sofre uma oxidação (perda de um elétron) e do oxigênio surge o chamado ânion superóxido. Para ocorrer essa reação, o oxigênio molecular necessita descompartilhar um par de elétrons para receber o elétron doado pelo Fe^{2+} . Desta forma, um átomo fica com a última camada completa (8 elétrons) e outro fica com um elétron a menos na última camada. Por isso é que a estrutura recebe o nome de radical ânion superóxido (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Interessantemente, duas moléculas de ânion superóxido espontaneamente dismutam para peróxido de hidrogênio e oxigênio; esta reação pode ser acelerada pela enzima superóxido dismutase (SOD).

1. 1. 3. 2 Peróxido de hidrogênio

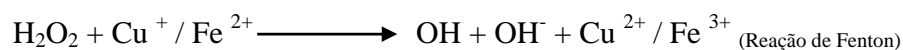
Embora o peróxido de hidrogênio não seja um radical livre, essa espécie reativa de oxigênio tem grande importância, porque, a partir dele, quando escapa aos sistemas endógenos de defesa, haverá a formação do radical livre hidroxil ($\bullet\text{OH}$), que é a espécie mais reativa dentre todos os radicais livres de oxigênio. Além disso, essa ERO possui a capacidade de penetrar membranas biológicas. H_2O_2 exerce um papel crucial na formação de moléculas mais reativas, como a formação do radical $\bullet\text{OH}$ via oxidação de metais de transição.

1. 1 .3 .3 Radical hidroxil

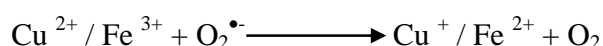
Devido à sua grande capacidade de reagir com biomoléculas, $\bullet\text{OH}$ é provavelmente a ERO capaz de causar mais danos em sistemas biológicos do que qualquer outra ERO (Betteridge, 2000; Halliwell, 1999). O radical é formado a partir do peróxido de hidrogênio

em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+) e essa reação é conhecida como

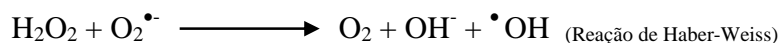
Reação de Fenton:



Além disso, o íon superóxido exerce um importante papel reciclando os íons metálicos da reação de Fenton:



A soma dessas duas reações é chamada de Reação de Haber-Weiss (Fridovich, 1997). Ou seja, o ânion superóxido cede um elétron ao peróxido de hidrogênio, tornando-se uma molécula estável (oxigênio molecular). Ao receber esse elétron, o H_2O_2 descompilha o par de elétrons da união covalente, formando o íon hidroxila (OH^-) e o outro fica com sete elétrons, formando o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), como pode ser visto na reação abaixo:



1. 1. 3. 4 Radical peroxil

O radical peroxil (RO_2^{\bullet}) é um peróxido orgânico e reage com biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA) da mesma forma que o radical $\bullet\text{OH}$, podendo ser formado pelo ataque desse último a compostos orgânicos ou pela decomposição de peróxidos orgânicos (ROOH). A reatividade desse radical está relacionada com a parte orgânica do mesmo, sendo os radicais aromáticos menos reativos (Halliwell e Guteridge, 2000).

1. 1. 4 Principais defesas antioxidantes

Para defender o organismo do efeito das ERO, existem vários sistemas antioxidantes, dependendo do próprio organismo, da célula ou do tecido em questão. Em termos gerais, podemos dividir os sistemas antioxidantes celulares em dois principais grupos: enzimático e não-enzimático. Entretanto, Halliwell e Gutteridge (2000) apresentam o sistema antioxidante dividido em duas etapas: a) interceptação das espécies reativas e b) reparo dos danos causados pelas espécies reativas. A primeira etapa ocorreria através de substâncias enzimáticas e/ou não enzimáticas, como vitaminas C e E. A segunda etapa aconteceria através de enzimas de reparo, as quais atuam em danos causados pelas ERO no DNA.

O estado de estresse oxidativo é caracterizado, então, quando a capacidade de defesa de um organismo é inferior a produção de ERO.

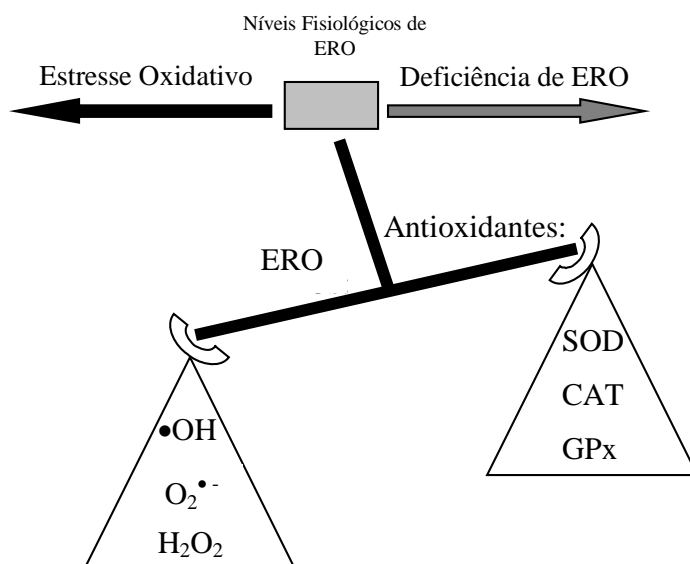


Figura 2. Representação esquemática do termo estresse oxidativo.

1. 1. 4. 1 Defesas enzimáticas

1. 1. 4. 1. 1 Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima capaz de metabolizar ERO a ser descoberta (McCord e Fridovich, 1969). Na reação catalisada pela SOD, duas moléculas de superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, sendo assim a maior fonte de peróxido de hidrogênio celular.



A metabolização do $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 é realizada por três isoenzimas, uma mitocondrial (Mn-SOD), uma citosólica (Cu, Zn-SOD) e uma extracelular.

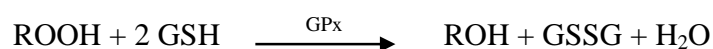
1. 1. 4. 1. 2 Catalase (CAT)

A dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ gera H_2O_2 , uma espécie reativa também gerada por outras enzimas “oxidases”, incluindo xantina, urato e D-amino ácido oxidases (Halliwell e Gutteridge, 2000). A catalase (CAT) é uma heme-enzima e se encontra localizada predominantemente em peroxissomos, onde catalisa, então, a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular:



1. 1. 4. 1. 3 Glutationa peroxidase (Gpx)

Existem pelo menos quatro tipos de Gpx nos mamíferos (Gpx1-4), todas contendo selenocisteína. Todas as Gpx podem catalisar a redução de H_2O_2 utilizando glutatona como substrato. Além disso, a Gpx também reduz outros peróxidos orgânicos (ROOH) em álcool.



1. 1. 4. 2 Defesas não enzimáticas

Além das enzimas antioxidantes, existe um conjunto de moléculas de baixa massa molecular que funciona como tampão redox do ambiente celular. Destacam-se dentro desta classe o peptídeo glutationa reduzida (GSH) e o ácido ascórbico (vitamina C). Além das defesas hidrossolúveis já citadas, 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. 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. Alguns trabalhos recentes demonstraram que, no sistema nervoso central e na epiderme, o produto da atividade da enzima ornitina decarboxilase – as poliaminas – possui uma função de apoio ao sistema antioxidante por funcionar como quelantes de metais.

1. 2 RETINÓIDES

1. 2. 1 Histórico

A cegueira noturna era uma doença característica do Egito Antigo. A cura, segundo manuscritos, era obtida com a aplicação tópica de “suco de fígado cozido”. Essa prática é utilizada até os dias de hoje por algumas sociedades e o princípio ativo desse óleo ou suco é a vitamina A.

No início do século XX, McCollum e Davis (1913) observaram que manteiga e gema de ovo continham um fator de crescimento essencial para ratos. Eles chamaram esse

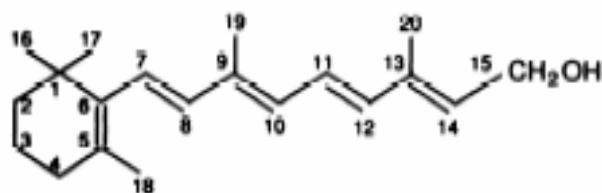
fator de “lipo-solúvel A”. Concomitantemente, Osbone e Mendel (1913) encontraram um fator de crescimento similar. Em seus estudos, eles demonstraram a importância da manteiga e/ou do leite integral no crescimento de animais. Assim, o ano de 1913 marcou o início da história da vitamina A.

Mais tarde foi demonstrada, em ratos, a relação entre a visão no escuro e a vitamina A, e, posteriormente, foi mostrado que o pigmento responsável pela visão era um complexo de proteína e vitamina A. Um outro acontecimento na história dessa vitamina foi a descoberta da sua relação com os carotenos. Moore (1957) demonstrou que o β -caroteno era convertido biologicamente em vitamina A, que era estocada no fígado. É importante salientar que essa forma de pré-vitamina A é amplamente distribuída no reino vegetal, enquanto a vitamina A é encontrada única e exclusivamente em alimentos de origem animal (Wagner e Folkers, 1966).

1. 2. 2 Estrutura e propriedades químicas

Os carotenóides em geral são solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Na presença de luz e oxigênio, esses compostos são facilmente oxidados, isomerizados e polimerizados, particularmente em altas temperaturas (Reynolds, 1993).

Os retinóides naturais (Fig. 3) são isoprenóides com vinte carbonos, com um anel β -ionilidona, uma cadeia lateral com ligas duplas conjugadas (Ross, 1993a), que permitem vários isômeros geométricos em virtude das possíveis configurações *cis-trans* em torno das ligações e um grupo terminal funcional em um dos seus três estados de oxidação (Ross, 1993b).



A. all-*trans* Retinol



B. all-*trans* Ácido Retinóico

Figura 3. Estrutura de dois principais retinóides naturais (adaptado de Ross, 1993)

1. 2. 3 Nomenclatura

A Vitamina A é considerada quimicamente como um subgrupo dos retinóides. O termo vitamina A é usado como uma descrição genérica para retinóides que exibem atividades biológicas do retinol. Outros retinóides que ocorrem naturalmente e são de interesse biológico (principalmente na forma *all-trans*) incluem o retinal (também chamado de retinaldeído), ácido retinóico, 3-dehidroretinol (vitamina A2), palmitato de retinol, além de outros igualmente importantes, porém na forma *cis*, como, por exemplo, o 11-*cis* retinal. O termo pró-vitamina A é utilizado como uma descrição genérica para todos os carotenóides que exibem atividade biológica da vitamina A.

1. 2. 4 Absorção, transporte e estoque

As principais fontes de retinóides naturais são gorduras animais e óleo de fígado de peixe (ésteres de retinol), ou vegetais coloridos (carotenóides). Os ésteres de retinol (RE) ingeridos na dieta são hidrolisados a retinol (ROL) por hidrolases no intestino. Tanto ROL como carotenóides são absorvidos pelas células da mucosa do intestino. Sabe-se que o β -caroteno é o principal carotenóide precursor de vitamina A e que essa transformação ocorre preferencialmente no fígado e intestino (Moore, 1957). Após a absorção intestinal, a produção de retinóides, a partir de carotenóides, pode ocorrer de duas maneiras: primeiro, retinal (RAL) pode ser sintetizado por clivagem oxidativa da ligação dupla central do β -caroteno seguida por uma redução até ROL por uma retinal redutase microsomal (Kakkad e Ong, 1988). Aqui, a proteína celular de ligação de retinol (II), ou *cellular retinol binding protein-II* (CRBP-II) protege o RAL da oxidação até ácido retinóico (RA). Segundo, apo-carotenóides são formados através de clivagem excêntrica seguida de transformação dos ácidos apo-carotenóides em RA (Wang *et al.*, 1991).

Nas células intestinais, o ROL proveniente da hidrólise de ésteres de retinol também forma um complexo com a CRBP-II. Esse complexo ROL-CRBP-II serve como um substrato para a esterificação de ROL em RE por uma lecitina retinol aciltransferase (LRAT) (MacDonald and Ong, 1988). Esses ésteres serão incorporados, junto com ácidos graxos de cadeia longa, em quilomícrons (Bloomhoff *et al.*, 1990), sendo secretados pelo sistema linfático. Nos hepatócitos, os complexos quilomícron-RE são hidrolizados e as moléculas de retinol livres se ligam a uma proteína de ligação de retinol, ou *retinol binding protein* (RBP), a proteína transportadora de retinol no plasma. O excesso de retinol sofre

uma transferência parácrina dos hepatócitos para as células estreladas hepáticas, também chamadas de células de estoque de vitamina A (Hirosawa e Yamada, 1973).

O complexo ROL-RBP liberado do fígado para o transporte de retinol no plasma é favorecido pela transtirretina (Green *et al.*, 1993).

RA, o metabólito mais ativo do retinol, é transportado pela proteína celular de ligação de ácido retinóico ou *cellular retinoic acid bindin protein* (CRABP) do citoplasma até o núcleo (Aström *et al.*, 1991).

O exato mecanismo pelo qual ocorre a captação de ROL pelas células alvo ainda não é completamente entendido, porém várias possibilidades têm sido propostas (Heller, 1975; Rask e Peterson, 1976; Bavic *et al.*, 1991; Dew e Ong, 1995).

1. 2. 5 Efeitos biológicos

Os retinóides exercem os seus efeitos biológicos mediante receptores nucleares. Esses receptores pertencem a uma superfamília de reguladores transcricionais induzidos por ligantes que incluem os receptores de hormônios esteróides, receptores de hormônio tireóide e receptores de vitamina D3 (revisado por Giguère, 1994; Mangelsdorf *et al.*, 1994; Chambon, 1996), e incluem duas famílias principais: *retinóic acid receptors* (RAR), que liga os isômeros all-*trans* e 9-*cis* ácido retinóico, e *retinoic X receptors* (RXR), que preferencialmente liga o isômero 9-*cis* (Revisado por Giguère, 1994). Cada família compreende três classes, α , β e γ , codificada por diferentes genes. RAR pode heterodimerizar com RXR ou com outro receptor nuclear para agir especificamente em elementos de resposta ao ácido retinóico (RARE) e ativar a transcrição de genes alvos. RXR pode homodimerizar ou heterodimerizar com outros fatores transcricionais para se ligar em elementos responsáveis específicos no DNA (RXRE).

Vitamina A (retinol) e seus derivados exercem uma infinidade de efeitos em diversos processos biológicos (Fig. 4), destacando-se a embriogênese, visão, regulação de processos inflamatórios, crescimento, proliferação e diferenciação de células normais e neoplásicas (Sporn *et al.*, 1994; Blomhoff, 1994; Becherel *et al.*, 1994; Napoli, 1996).

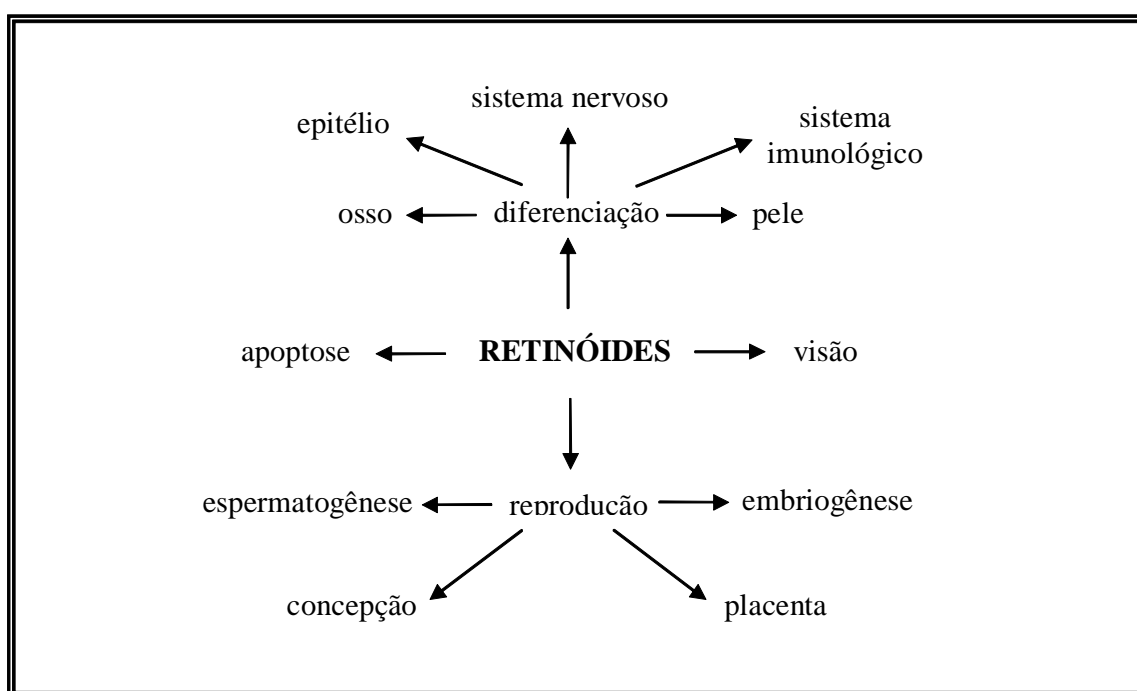


Figura 4. Algumas funções dos retinóides (adaptado de Napoli, 1996)

1. 2. 6 Metabolismo da vitamina A: formação de ácido retinóico

Teoricamente, o β -caroteno sofre uma clivagem oxidativa central produzindo 02 (duas) moléculas de retinal, seguido de uma redução para formação do retinol. Outro caminho possível é uma clivagem oxidativa excêntrica, em que, primeiramente, são formados β -apocarotenos e depois retinal, seguido de uma redução a retinol (Blaner e Olson, 1994). Sabe-se do envolvimento da enzima β -carotenóide-15, 15'-dioxigenase na clivagem central do β -caroteno, porém não se sabe qual a enzima envolvida na clivagem

excêntrica dos β -carotenos (Blaner e Olson, 1994). Interessantemente, Hebuterne *et al.* (1996) demonstraram que a clivagem excêntrica também é um importante caminho para a conversão de β -carotenos em ácido retinóico, sem a molécula de retinal como intermediária.

O retinol, a forma álcool da vitamina A, pode ser convertido enzimaticamente em retinal de forma reversível. O retinal então pode ser convertido em ácido retinóico, porém essa reação é irreversível. Algumas evidências sugerem que o retinol pode dar origem diretamente a ácido retinóico sem a presença de retinal como intermediário (Napoli *et al.*, 1988). Além da formação de ácido retinóico a partir de retinal, esse potente fator de transcrição e uma das formas mais ativas de retinóide pode ser extraído pela maioria das células a partir do plasma, onde ele é transportado ligado à albumina.

É importante salientar que a vitamina A não pode ser sintetizada e deve ser obtida da dieta. Fontes primárias incluem os carotenóides encontrados nos vegetais e os ésteres de retinol a partir de fontes animais. A recomendação diária atual de vitamina A é de 1000 equivalentes de retinol para adultos e de 375 a 700 equivalentes de retinol para recém-nascidos e crianças, respectivamente (de acordo com a National Academy of Sciences, US Food and Nutrition Board). Um equivalente de retinol é igual a 1 μg de retinol e 6 μg de β -caroteno.

1. 2. 7 Retinóides e estresse oxidativo

Embora o potencial antioxidante da vitamina A e carotenóides tenha sido descrito primeiramente por Monaghan e Schmitt (1932), sabe-se hoje que, sob diferentes condições (tipo celular, concentrações, estados patológicos, dentre outros), essas moléculas podem se comportar de uma maneira pró-oxidante, caracterizando o seu papel dualístico. Por isso,

essas moléculas são hoje melhores descritas como moléculas redox-ativas. A atividade antioxidante da vitamina A pode se dar pelo fato de ela atuar como um agente de quebra da cadeia oxidativa por combinar radical peroxil, antes que esse radical possa propagar a peroxidação lipídica e gerar lipoperóxidos (revisado por Palace *et al.*, 1999).

Contudo, em condições suprafisiológicas, diversos retinóides podem propagar a produção de ERO (Murata e Kawanish, 2000; Dal-Pizzol *et al.*, 2001; Omen *et al.*, 1996). É importante ressaltar que todo antioxidante, incluindo as vitaminas, não é mais do que um agente redox, protegendo contra os radicais livres em algumas circunstâncias e promovendo a geração de radicais livres em outras (Halliwell e Gutteridge, 2000). Em condições de estresse oxidativo, os carotenóides em geral também podem atuar como propagadores de radicais livres, levando a um aumento na incidência de vários tipos de câncer (Hartmann e Speit, 1997).

1. 3 CÉLULA DE SERTOLI COMO MODELO DE ESTUDO

1. 3. 1 Breve histórico

Células de Sertoli são células somáticas testiculares, essenciais para a formação dos testículos e para a espermatogênese. No entanto, a possibilidade de uma relação funcional entre as até então chamadas “branched cells” e a espermatogênese foi primeiro descrita por Enrico Sertoli quando ele tinha apenas 23 anos, em 1865.

Célula de Sertoli é um ótimo modelo para estudos com retinóides e ERO. Nesse contexto, cultura primária de células de Sertoli é o método mais representativo desse tipo celular a partir do tecido de onde foram originadas, além de não possuir a desvantagem de linhagens celulares (como grande instabilidade cromossomal). Essas células são células de origem epitelial, como outras células epiteliais (pele e trato respiratório), e são responsivas

a retinóides (Moreira *et al.* 1997). Esse tipo celular é bem caracterizado morfológicamente e bioquimicamente, o que facilita a identificação dos efeitos celulares mediados por retinóides e ERO.

1. 3. 2 Sistema antioxidante em células de Sertoli

O sistema antioxidante em células de Sertoli é caracterizado por altos níveis de SOD, GPX e glutathiona intracelular. Dessa maneira, a célula de Sertoli é capaz de converter O_2^{\bullet} em H_2O_2 , bem como metabolizar este peróxido e outros em moléculas não reativas (Fraga *et al.*, 1991; Bauché *et al.*, 1994). Assim, essa célula somática testicular em condições normais é capaz de se defender eficientemente contra o stress oxidativo. Ainda, o processo de fagocitose também está associado com a produção de altos níveis de ERO. Isso é de fundamental importância, uma vez que a célula de Sertoli fagocita "debris" celulares (ex.: células germinativas) durante a espermatogênese. Dessa maneira, a proteção contra ERO é essencial para esse tipo celular em condições normais e patológicas (Bauché *et al.*, 1994).

1. 3. 3 Efeitos biológicos dos retinóides em células de Sertoli

Conforme visto no anteriormente, os retinóides exercem os seus efeitos biológicos mediante receptores nucleares. Nesse contexto, as 06 (seis) classes de receptores têm sido localizadas em ratos e camundongos por técnicas de imunohistoquímica ou hibridização *in situ* nos diversos tipos celulares presentes nos testículos, em diferentes idades (fetal, imaturo e adulto) (Huang *et al.*, 1994; Kastner *et al.*, 1996; Akmal *et al.*, 1997; Gaemers *et al.*, 1998; Boulogne *et al.*, 1999; Cupp *et al.*, 1999; Dufour e Kim, 1999). Células de Sertoli imaturas, as quais são diferentes de células adultas, pois ainda são mitoticamente ativas,

expressam somente RAR- α e γ e RXR- α (Boulogne *et al.*, 1999). Entretanto, Dufour e Kim (1999) mostraram que células de Sertoli imaturas expressam RXR- α e β , mas não RAR- γ . Essas diferenças podem ter ocorrido devido ao uso de distintas técnicas e anticorpos. Células de Sertoli adultas expressam todos os seis tipos de receptores de ácido retinóico (Akmal *et al.*, 1997). Assim, a distribuição de receptores de ácido retinóico em células de Sertoli, bem como nas demais células testiculares, é muito complexa e às vezes redundante, e depende não somente do tipo celular, mas também do estágio de diferenciação.

Células de Sertoli são alvo de retinóides, FSH e testosterona, os quais são essenciais para o processo de espermatogênese. Já foi demonstrado que o retinol modula diversas funções das células de Sertoli (Shubhada e Tsai, 1990; Russel e Griswold, 1993). Em particular, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento com retinol (7 μ M / 24h) aumenta os níveis de fosforilação de histonas e diminui os níveis de fosforilação de HMG (high mobility group proteins) (Moreira *et al.*, 1994), aumenta a incorporação de [H-3]-timidina no DNA (Moreira *et al.*, 1996), sugerindo o seu envolvimento na síntese de DNA e na expressão de genes em células de Sertoli. Além disso, nosso grupo também demonstrou que o tratamento com 7 μ M de retinol aumenta a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) (Klamt *et al.*, 2000), modula a atividade de enzimas antioxidantes, além de induzir estresse oxidativo em células de Sertoli (Dal-Pizzol *et al.*, 2001). Todos os efeitos verificados foram atenuados por antioxidantes ou quelantes de ferro, sugerindo o envolvimento de ERO e a participação da reação de Fenton.

1. 3. 4 Metabolismo de retinóides em células testiculares

Thompson *et al.* (1964) acreditavam que somente o retinol exercia alguma ação nas células testiculares e que o ácido retinóico não podia exercer efeito algum. Entretanto, Van

Pelt e de Rooij (1991) demonstraram que o processo de espermatogênese podia ser reiniciado em ratos deficientes de vitamina A com repetidas injeções de ácido retinóico.

Hoje em dia, sabe-se que os estágios do metabolismo testicular dos retinóides são complexos e envolvem diferentes tipos de células (Fig. 5). O primeiro passo desse metabolismo ocorre nas células peritubulares, onde grande quantidade de CRBP (uma proteína intracelular que liga retinol com alta afinidade) é encontrada (Blaner *et al.*, 1987). As células peritubulares captam o retinol circulante ligado a outras proteínas transportadoras, como a proteína de ligação de retinol ou *retinol binding protein* (RBP) e transtirretina (TTR), e secretam o mesmo em um complexo formado com uma nova RBP, em direção às células de Sertoli (Davis e Ong, 1995).

A CRBP também está presente nas células de Sertoli e a sua expressão varia de acordo com o estágio do ciclo do epitélio seminífero, indicando que a necessidade por retinol depende do tipo de célula germinativa presente (Blaner *et al.*, 1987; Schmitt e Ong, 1993). A célula de Sertoli é o principal sítio de síntese de ácido retinóico no testículo (Cavazzini *et al.*, 1996). Assim, as enzimas que permitem a oxidação do retinol em ácido retinóico (álcool desidrogenase e retinal desidrogenase) são essencialmente localizadas nas células de Sertoli (Deltour *et al.*, 1997; Zhai *et al.*, 2001). Essas células podem então distribuir o ácido retinóico para as células vizinhas. Além disso, a produção de ácido retinóico aumenta durante o desenvolvimento testicular. Entre as células testiculares, a célula de Sertoli é o principal sítio de estoque de retinol. Elas expressam uma lecitina retinol aciltransferase (LRAT), permitindo, assim, a esterificação do retinol (Cavazzini *et al.*, 1996). Interessantemente, FSH e ácido retinóico aumentam os estoques de retinol na forma de ésteres de retinol em células de Sertoli, mas a oxidação de retinol até ácido retinóico é reduzida por ácido retinóico e aumentada por FSH (Guo *et al.*, 2001).

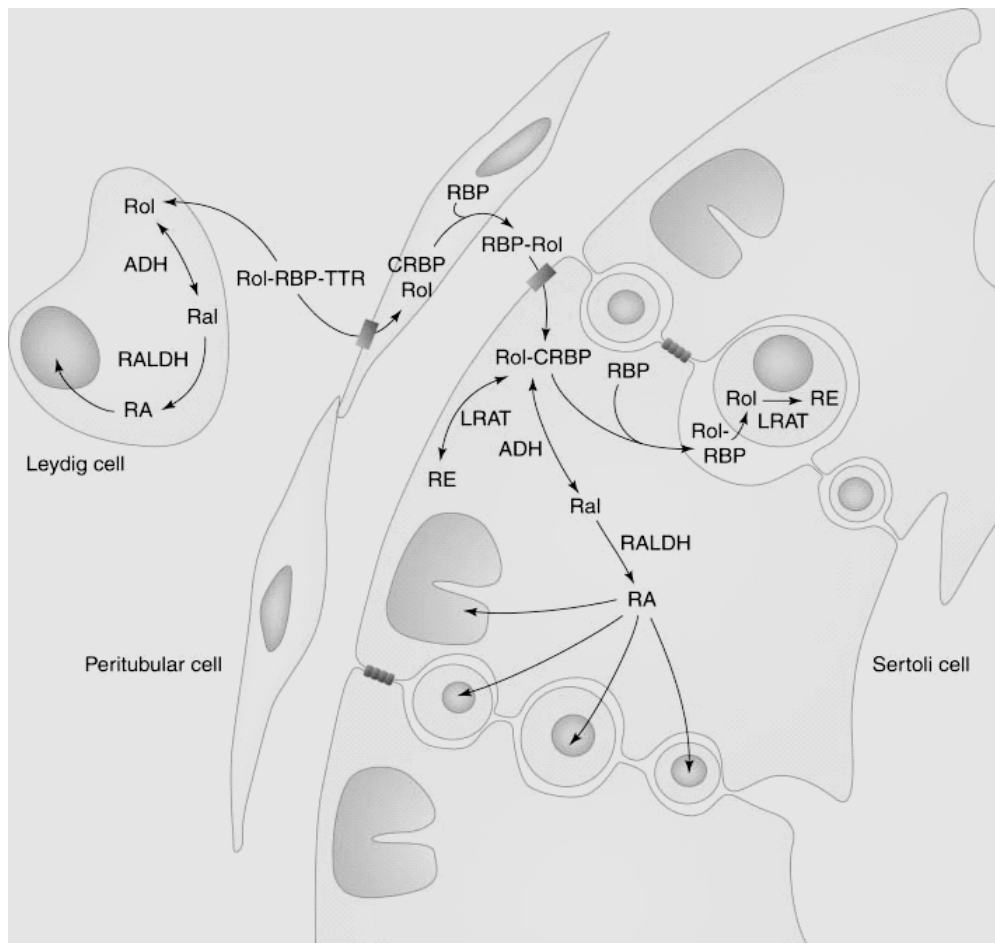


Figura 5. Metabolismo do retinol em células testiculares. (fonte: Livera et al., 2004)

Também presentes nas células testiculares são as proteínas de ligação do ácido retinóico ou *cellular retinoic acid binding protein* tipos I e II (CRABP I e II), que se ligam ao ácido retinóico para facilitar o transporte até o núcleo ou o seu catabolismo nos diferentes tipos de células testiculares, exceto para as células peritubulares (Blaner et al., 1987; Faraonio et al., 1993; Zheng et al., 1996).

Capítulo II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS


2.1 Objetivo geral

Apesar dos nossos trabalhos demonstrarem um efeito pró-oxidante do retinol em culturas de células de Sertoli, o mecanismo exato pelo qual esse efeito é verificado ainda não é completamente compreendido. Uma vez que o ácido retinóico é descrito como a principal molécula ativa derivada do retinol, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de ácido retinóico em culturas de células de Sertoli e elucidar se a produção de ERO anteriormente observadas com o retinol deve-se ao fato da metabolização do mesmo a ácido retinóico. Nesse sentido, foram determinados alguns parâmetros oxidativos em culturas de células de Sertoli tratadas com ácido retinóico. Os resultados obtidos estão apresentados nessa Dissertação de Mestrado no capítulo III, na forma de artigo.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Investigar o efeito do ácido retinóico sobre a lipoperoxidação e sobre a viabilidade celular;
- 2) Investigar o efeito do ácido retinóico sobre a atividade das defesas antioxidantes enzimáticas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona peroxidase (GPx);
- 3) Verificar o efeito anti ou pró-oxidante do ácido retinóico em um sistema gerador de radical hidroxil, bem como o potencial antioxidante total pela técnica de TRAP.

Capítulo III

 *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005.
DOI: 10.1007/s11010-005-9077-3

© Springer 2005

1 **All-*trans* retinoic acid induces free radical**
2 **generation and modulate antioxidant enzyme**
3 **activities in rat sertoli cells**

4 Mario Luiz Conte da Frota Jr.,¹ Evandro Gomes da Silva,¹ Guilherme
5 Antônio Behr,¹ Marcos Roberto de Oliveira,¹ Felipe Dal-Pizzol,^{1,3}
6 Fábio Klamt^{1,2} and José Cláudio Fonseca Moreira¹

7 ¹Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (CEEEO), ICBS – UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ²CINCAN – ULBRA, Canoas,
8 Brazil; ³Laboratório de Fisiopatologia Experimental – UNESC, Criciúma, Brazil

9 Received 29 September 2005; accepted 9 November 2005

Trabalho aceito para publicação no periódico *Molecular and Cellular Biochemistry*

**ALL-*trans* RETINOIC ACID INDUCES FREE RADICAL
GENERATION AND MODULATE ANTIOXIDANT ENZYME
ACTIVITIES IN RAT SERTOLI CELLS**

Shortened title: Retinoic Acid and ROS production

MSc Mario Luiz Conte da Frota Jr ^a, MSc Evandro Gomes da Silva ^a, BSc
Guilherme Antônio Behr ^a, BSc Marcos Roberto de Oliveira ^a, PhD Felipe Dal-
Pizzol ^{a, c}, PhD Fábio Klamt ^{a, b}, PhD José Cláudio Fonseca Moreira ^a

^a *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (CEEEO), ICBS – UFRGS, Porto Alegre, Brazil;*

^b *CINCAN – ULBRA, Canoas, Brazil;* ^c *Laboratório de Fisiopatologia Experimental -
UNESC, Criciúma, Brazil*

Address for correspondence: Mario Luiz Conte da Frota Jr, Departamento de
Bioquímica, ICBS – UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo, Porto
Alegre, 90035-003, RS, Brazil. Phone: +55 51 3316-5549; Fax: +55 51
3316-5535 (*E-mail address:* mfrotajr@yahoo.com.br).

ABSTRACT

In this work we investigated the effects of retinoic acid (RA) in Sertoli cells. Sertoli cells isolated from 15-day-old Wistar rats were previously cultured for 48 h and then treated with RA for 24 h. RA at high doses (1-10 μM) increased TBARS levels and induced a decrease in cell viability. At low doses (0.1-100 nM) RA did not increase TBARS level. RA also did not increase cell death at these doses. In order to investigate changes in antioxidant defenses we measured the CAT, SOD and GPx activities in Sertoli cells treated with RA. Compared to control, RA increased around 200 % SOD activity in all doses tested (0.1 - 100 nM); GPx activity was increased 407.49, 208.98 and 243.88 % (0.1, 1 and 10 nM, respectively); CAT activity was increased 127 % with RA 1 nM. To clarify if RA induces ROS production *per se*, we performed experiments *in vitro* using 2-deoxyribose as specific substrate of oxidative degradation by $\bullet\text{OH}$ radical as well as TRAP assay. RA at 10 μM increased 2-deoxyribose degradation, suggesting that some of the RA-induced effects are mediated via $\bullet\text{OH}$ formation. Furthermore, the total reactive antioxidant potential (TRAP) of the RA was determined. At low concentrations RA has induced no redox activity. Conversely, higher concentration of RA (1 - 10 μM) increased chemiluminescence. The chemiluminescence produced was directly proportional to radical generation. We provide, for the first time, evidence for a free radical generation by RA. Our results demonstrated that RA plays an important role in Sertoli cells and these effects appear to be mediated by ROS.

INTRODUCTION

Over the last decades retinoids have been the subject of intense investigation. Vitamin A and carotenoids have been considered as physiologically important antioxidants. Within the body, vitamin A can be found as retinol, retinal and RA and the metabolism of these compound is closely regulated through a series of enzymes, binding proteins and storage vectors, probably because of their toxicity in higher concentrations.

Despite the important physiological functions of retinoids [1], the effects of retinoids supra-physiological doses supplementation as well as their physiological action are not well defined.

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 [2]. However, the wide spectrum of physiological and pharmacological retinoids effects are attributed to both receptor-dependent and receptor-independent mechanisms [3].

Diverse biological processes are modulated by free radicals. The production of reactive oxygen species (ROS) is recognized as a cause of immediate cellular injury leading to cell death or apoptosis. ROS can also lead to progressive accumulation of biomolecular damage and, consequently, are involved in many physiological (i.e. aging) and pathological (i.e. cancer) processes [4]. The hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) radical is probably the most potent of the ROS, and the probable initiator of the chain reactions which form lipid peroxides and organic radicals. To overcome these problems organisms have developed strategies and are also equipped with a complete oxidative defense system. The Sertoli cell system is characterized by relatively high levels of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), glutathione-S-

transferase (GST, EC 2.5.1.18), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activity and intracellular glutathione (GSH). Sertoli cells should, therefore, be able to convert ROS to unreactive molecules. This feature is particularly important in Sertoli cells because of their phagocytic function [5].

Many studies have addressed the role of antioxidant retinoids in the protection against cancers and cardiovascular diseases [6]. It has been suggested that the antioxidant potency of vitamin A and β -carotene may scavenge oxygen radicals and protect against cancer occurrence [7,8]. On the other hand, two reports suggest a positive association of vitamin A intake and increased incidence in prostate cancer [9,10]. Also, one randomized, controlled clinical trial demonstrated that supplementation with a combination of β -carotene and retinol increases the incidence and mortality from lung cancer in smokers [11].

A growing body of evidence has demonstrated that retinoids have pro-oxidant properties, which might lead to cell oxidative damage and carcinogenesis [12,13]. Our previous studies demonstrated an increase in chromatin sensitivity to DNase I [14], an increase in methyl [³H]- thymidine incorporation into DNA [15], changes in nuclear protein phosphorylation [16], an increase in ornithine decarboxylase (ODC) and catalase activity and an increase in lipid peroxidation in Sertoli cells treated with retinol (7 μ M, 24 h) [17]. Furthermore, retinol supplementation (7 μ M, 24h) induces oxidative stress and modulates the activities of antioxidant enzymes in rat Sertoli cells [18]. These effects were not observed with lower concentrations of retinol (0.1, 1 and 5 μ M), and were attenuated by both mannitol 1mM (a hydroxyl \bullet OH scavenger) and metal ions chelators, suggesting the involvement of ROS. These data suggested that the effects of retinol supplementation could

be mediated by Fe(II) ions and probably involve a Fenton reaction. Moreover, our previous results showed that retinol increases superoxide production and inhibits *mdr1* and *mdr3* gene expression in cultured rat Sertoli cells. This inhibition of *mdr* by retinol was attenuated by ROS scavengers, suggesting that, at least in part, some of the effects observed are mediated by ROS [19].

Together these observations prompted us to determine whether retinoic acid (RA), the more active metabolite of retinol, induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. We report here that RA, at concentrations greater than the physiological limit, induces lipid peroxidation and decreases cell viability. However, at physiological doses RA does not increase lipid peroxidation as well as cell death, and this was accompanied by an activation of antioxidant enzymes activities. To clarify if RA induces ROS production *per se*, we performed experiments *in vitro* using 2-deoxyribose as specific substrate of oxidative degradation by hydroxyl radical as well as TRAP assay. We provide, for the first time, evidence for a free radical generation by RA, suggesting that at last in part some of the RA-induced effects are mediated via ROS.

MATERIALS AND METHODS

Materials and animals

All drugs and enzymes were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Pregnant Wistar rats were housed individually in plexiglass cages. Litters were restricted to eight pups each. The animals were maintained on a 12 h light/dark cycle at a constant temperature of 23 °C, with free access to commercial food and water. Male immature rats (15 days old) were killed by ether inhalation.

Cell culture

Sertoli cells from 15-day-old Wistar rats were prepared and cultured essentially as previously described [15]. In brief, the animals were killed by ether 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 staining of alkaline phosphatase, was present in the Sertoli cell preparations. After isolation, Sertoli cells were counted in a Neubauer chamber and cultivated in a plating density of 3.2×10^5 cells/cm² in Petri dishes containing Medium 199 pH 7.4 supplemented with 1% fetal bovine serum (v / v). 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 germinal cells. Experiments were performed on cells treated with all-*trans* RA (0.1 nM to 10 μM) for 24 h. Controls cultures received only the all-*trans* RA solvent (0.1% ethanol, v / v). To control the effect of ethanol, in all experimental procedures a group without the addition of ethanol was analyzed, and no significant differences between this and control were found on all the parameters measured (data not shown). The formation of oxidized retinol metabolites was monitored by spectroscopic scan of all retinol solutions before use.

Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

As an index of lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described [20]. Briefly, the samples were mixed with 1ml of trichloroacetic acid 10% (TCA) and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67% (TBA), then heated in a boiling water bath for 15 min. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were

determined by the absorbance at 535 nm and were expressed as malondialdehyde equivalents (nmol / mg protein).

Antioxidant Enzymes Activities

Enzyme assays were performed in cells extracts obtained as follows. Cells were harvested and washed three times with saline. To determine CAT and GPx activities cells were sonicated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and the resulting suspension was centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was used for enzyme assays. CAT activity was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance at 240 nm [21]. For GPx activity NADPH oxidation was followed at 340 nm in the presence of reduced glutathione, *tert*-butyl hydroperoxide, and glutathione reductase [22]. SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described [23].

Cell death/viability

Cell death/viability was measured by Trypan Blue exclusion as previously described [24]. Briefly, it relies on the alteration in membrane integrity as determined by the uptake of dye by dead cells (trypan blue positive), thereby giving a direct measure of cell viability.

To determine cell death, after indicated treatments, cells were stained with 50 μ L of 0.4 % Trypan Blue. After centrifugation (329 x g for 15 min) cells were lysed with 1 N NaOH. The Trypan Blue/cell suspension mixture was used to determine cell death by the absorbance at 590 nm.

In the viability assay, unstained cells (viable and Trypan Blue negative) were fixed with methanol/acetone (1:1) and then stained with 50 μ L of 0.4 % Trypan Blue. After fixation, viable cells were trypan blue positive. Cells were lysed with 1 N NaOH. Cell

viability was determined by the absorbance at 590 nm. Untreated cultured cells were used as the 100 % viability value. The percent viability was calculated by the ratio Absorbance (sample)/Absorbance (control) X 100.

The Assay of 2-deoxyribose degradation

The formation of $\bullet\text{OH}$ radicals from Fenton reagents was quantified using 2-deoxyribose oxidative degradation. The principle of the assay is the quantification of the 2-deoxyribose degradation product, malondialdehyde, by its condensation with TBA [25]. Briefly, typical reactions were started by the addition of Fe(II) (6 μM final concentration) to solutions containing 5 mM 2-deoxyribose, 100 μM H_2O_2 and 20 mM phosphate buffer (pH 7.2). As antioxidant standard we used trolox (0.1 mM). To measure RA redox activity, different concentrations of RA (0.1 nM – 10 μM) were added to the system before Fe (II) addition. Reactions were carried out for 15 min at room temperature and were stopped by the addition of 4% phosphoric acid (v/v) followed by 1% TBA (w/v, in 50 mM NaOH). After boiling for 15 min, the absorbance of solutions was measured at 532 nm. The formation of $\bullet\text{OH}$ radicals from RA was performed as described above. The samples containing 20 mM phosphate buffer (pH 7.2), 5 mM 2-deoxyribose and RA (0.1 nM – 10 μM) were incubated for 15 min at room temperature and were stopped as described above. Products of 2-deoxyribose degradation were measured at 532 nm.

Total reactive antioxidant potential (TRAP)

The antioxidant potential of the RA was estimated by the total reactive antioxidant potential parameter (TRAP). The principle of TRAP measurement has been previously described [26]. Briefly, the reaction was initiated by adding luminol (4mM) – as a external probe to monitoring radical production - and AAPH (10 mM) – a free radical source that

produces peroxy radical at a constant rate – in glycine buffer (0.1 M) pH 8.6 at room temperature that resulted in steady luminescence emission. The addition of RA decreases the luminescence proportionally to its antioxidant potential. The luminescence emission was followed for 30 min after the addition of the different RA doses. Chemiluminescence was read in a liquid scintillation counter (Wallace 1409) as counts per minutes (CPM).

Protein determination

All the results were normalized by the protein content using the Lowry technique [27].

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. Data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA), using a Newman-Keuls test to compare mean values across groups. When appropriate, Student's t-test was performed. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Sertoli cells were treated with RA and the lipid peroxidation was estimated by TBARS concentration as described in Materials and Methods. RA (0.1, 10 and 100 nM, 24 h) did not increase TBARS content in cultured Sertoli cells. Furthermore, RA at 1 nM decreased TBARS content, while RA doses higher than 100 nM increased lipid peroxidation levels (Fig. 1). In agreement with this, RA at higher doses (μ M doses) induced a decrease in cell viability (Fig. 2).

Since higher doses induced lipid peroxidation and decreased cell viability, we decided to investigate only the effects of physiological RA treatment (nM doses) in Sertoli

cells. In order to investigate changes in antioxidant defenses we measured the SOD, GPx and CAT activities in RA treated and non-treated Sertoli cells. Fig. 3 shows that SOD activity increased with all RA doses. GPx activity increased with 0.1, 1 and 10 nM (Fig. 4). CAT activity had an increase with RA 1 nM (Fig. 5). In order to clarify if RA induces ROS production *per se*, we performed experiments *in vitro* using 2-deoxyribose as specific substrate of oxidative degradation by hydroxyl radical. RA (0.1 nM – 10 μ M) in the incubation media has induced no inhibitory effect in the 2-deoxyribose degradation induced by \bullet OH radicals which were produced by the Fenton reagents Fe(II) and H₂O₂ (inset to Fig. 6). However, RA *per se* at 10 μ M increased 2-deoxyribose degradation when added to the medium without Fenton reagents (Fig. 6). Furthermore, the total reactive antioxidant potential (TRAP) of the RA was determined. At low concentrations RA has induced no redox activity (Fig. 7A). Conversely, higher concentration of RA (1 - 10 μ M) increased chemiluminescence (Fig. 7B). The chemiluminescence produced was directly proportional to radical generation.

DISCUSSION

Despite of retinol effects in ROS production, the role of RA, the more active metabolic of retinol, has been poorly studied. In this context, the mechanism of the antioxidant effect of RA remains unclear.

We report here that supplementation with RA caused lipid peroxidation. This damage seems to be induced only by supra-physiological doses, since physiological doses did not induce TBARS (Fig. 1). In response, it was observed a decrease in cell viability in the same doses where TBARS was found to be enhanced (Fig. 2). Since higher doses (μ M)

induced lipid peroxidation and cell death, we decided to investigate only the effects of physiological RA treatment (nM doses) in Sertoli cells.

In order to investigate changes in antioxidant defenses we measured the SOD, GPx and CAT activities in RA treated and non-treated Sertoli cells. In Fig. 3, it may be seen that SOD activity increased with all RA doses. It has been recently shown that RA increased the peroxisome proliferator-activity binding to the peroxisome proliferator-response element that participates in the induction of the rat SOD-1 gene [28]. In addition, RA increased the activity of CAT, SOD, and GR, but decreased the intracellular glutathione content in chondrocytes [29].

GPx activity increased under 0.1, 1 and 10 nM (Fig. 4). Moreover, RA treatment increase CAT activity at 1 nM (Fig. 5). Interestingly, at these same doses RA decreased lipid peroxidation, as well as increased cell viability. These findings suggest that RA increased the activity of antioxidant enzymes under physiological doses, thereby preventing oxidative cell damage as may be seen in TBARS content (Fig. 1) and cell viability (Fig. 2).

In order to clarify if RA induces ROS production *per se*, we performed *in vitro* experiments using 2-deoxyribose as specific substrate of oxidative degradation by hydroxyl radical as well as TRAP assay. The presence of RA (0.1 nM – 10 μ M) in the incubation media has induced no inhibitory effect in the 2-deoxyribose degradation induced by \bullet OH radicals which were produced by the Fenton reagents Fe(II) and H₂O₂ (inset to Fig. 6). However, RA *per se* at 10 μ M increased 2-deoxyribose degradation when added to the medium without Fenton reagents (Fig. 6), suggesting that some of the RA-induced effects are mediated via \bullet OH formation. Interestingly, Murata *et al.* (2000) demonstrated that retinol auto-oxidation into retinal can generate superoxide radical, which is dismuted to

H₂O₂, and this process was related to DNA adducts formation in the presence of endogenous metals [30]. Furthermore, the total reactive antioxidant potential of the RA was determined. At low concentrations RA has induced no redox activity (Fig. 7A). Conversely, higher concentrations of RA increased chemiluminescence (Fig. 7B). The chemiluminescence produced was directly proportional to radical generation. It is noteworthy that RA (1, 5 and 7 μM) was pro-oxidant after the first 10 minutes, when the radical production by the AAPH is still elevated. However, when the free radical source decline, the pro-oxidant effects of RA diminished. Interestingly, RA at 10 μM was pro-oxidant only after the first 15 minutes and remain this effect all the time.

We provide, for the first time, evidence for a free radical generation by RA, suggesting that at last in part some of the RA-induced effects are mediated via ROS. The mechanism by which retinoids induce ROS generation is unknown. However, it is known that β-carotene can act as a pro oxidant agent by propagating radical chain reactions [8, 13]. Retinoids are conjugated polyene molecules that share the same structural characteristics as β-carotene, and so may operate in a similar manner. In this context, it is known that some retinoids induce the generation of reactive oxygen species (ROS) [31].

In an interesting work, Hurnanen *et al.* showed that low RA concentrations stimulated growth proliferation but higher concentrations inhibited cell proliferation [32]. Moreover, elevated RA concentrations increased lipid peroxidation. There was a significant negative correlation between lipid peroxidation and cell proliferation, which suggests that RA may generate free radicals.

The mechanism of RA-mediated lipid peroxidation is not fully understood. However, there are at least two possible mechanisms. RA can stimulate the activity of Δ-6-

desaturase resulting in an increase of polyunsaturated fatty acid (PUFA), which are most easily oxidized [33]. Δ -6-desaturase is the enzyme responsible for inserting a double bond during PUFA synthesis. A loss or decreased activity of this enzyme has been found in some malignant tumors. RA can also directly increase free radicals which could result in increased lipid peroxidation [34]. Moreover, 13-cis-RA was shown to directly increase levels of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl anions in isolated chick neural crest cells [34]. It is noteworthy that every antioxidant is in fact a redox agent, protecting against free radicals in some circumstances and promoting free radical generation in others [35].

Our results suggest the importance of keeping vitamin status within the normal range, as a deficit or administration greater than the upper limits could explain in part the adverse effects found in the literature. The concentrations of RA used in this study range from physiological plasma concentrations to pharmacological concentrations. RA is present constitutively in the plasma at a concentration of 4-14 nM [36]. Pharmacological RA doses result in transient plasma concentration in the range of μ M, the same doses at which we observed TBARs formation and decreased cell viability. Retinol is constitutively present in the Sertoli cells, and it is estimated that concentration is around 5 μ M [1]. It is known that Sertoli cells synthesize retinoic acid from circulating retinol. This may be an explanation of the previous effects observed in Sertoli cells treated with retinol at higher doses [12, 14-19].

Sertoli cells cultures seem to be a good model to study retinoids effects on oxidative parameters. Sertoli cells are responsive to retinoids treatments and are well characterized morphologically and biochemically, and these could facilitate the identification of cellular

effects mediated by retinoids and ROS. In addition, their phagocyte function implies in the development of a complete oxidative defense system.

Additional studies are required to understand the exact mechanism by which RA works to regulate ROS production and antioxidants enzymes activities in Sertoli cells, as well as its significance in neoplastic transformation of normal and previously injured cells. The understanding how retinoids work is important for defining how retinoids may be used as chemopreventive agents and in combination with chemotherapeutic agents.

Acknowledgements - This work was supported by FAPERGS, CNPq, CAPES and PROPESQ-UFRGS. The authors wish to thank MSc Daniel Pens Gelain for critical English review.

REFERENCES

1. Livrea MA, Packer L: In: Retinoids- Progress in research and clinical applications. Marcel Dekker Inc, New York, USA, 1993.
2. Giguere, V: Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: Complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15: 61-79, 1994.
3. Radomska-Pandya A, Chen G, Czernik PJ, Little JM, Samokyszyn VM, Carter CA, Nowak G: Direct interaction of All-*trans*-retinoic acid with protein kinase C (PKC): Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem* 275: 22324-30, 2000.
4. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922, 1993.
5. Bauche F, Fouchard MH, Jegou B: Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letters* 349:392-396, 1994.
6. Slaga TJ. Nutrition and Bio/Technology in heart disease and cancer (Longenecker, J. B.; Kritchevsky, D.; Drezner, M. K. eds) 167-174, Plenum Publishing Corp., New York, 1995.
7. Willet WC, MacMahon B: Diet and cancer--an overview. *N Engl J Med* 310: 633-638, 1984.
8. Burton GW, Ingold KU: beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569-573, 1984.
9. Graham S, Haugey J, Marshall R *et al.*: Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland. *J Natl Cancer Inst* 70: 687-692, 1983.
10. Heshmat MY, Kaul L, Kovi J *et al.*: Nutrition and prostate cancer: a case-control study. *Prostate*. 6: 7-17, 1985.
11. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J *et al.*: Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1150-1155, 1996.
12. Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota MLC, Moraes LF, Moreira JCF, Benfato MS: Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* 33: 677-687, 2000.
13. Palozza P, Calviello G, Serini S, Maggiano N, Lanza P, Ranelletti FO, Bartoli GM: beta-carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 30: 1000-1007, 2001.

14. Moreira JCF, Dal-Pizzol F, Von Endt D, Bernard EA: Effect of retinol on chromatin structure in Sertoli cells: 1,10-phenanthroline inhibit the increased DNase I sensitivity induced by retinol. *Med Sci Res* 25: 635-638, 1997.
15. Moreira JCF, Dal-Pizzol F, Guma FCR, Bernard EA: Effects of pretreatment with hydroxyurea on the increase in [methyl-³H] thymidine incorporation induced by retinol treatment in Sertoli cells. *Med Sci Res* 24: 383-384, 1996.
16. Moreira JCF, Junqueira LAV, Von Endt D, Bernard EA: The effect of retinol pre-incubation on the phosphorylation of histones and HMGs from cultured Sertoli cells. *Med Sci Res* 22: 783-784, 1994.
17. Klamt F, Dal-Pizzol F, Ribeiro NC, Bernard EA, Benfato MS, Moreira JCF: Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger by iron chelator. *Mol. Cell. Biochem* 208: 71-76, 2000.
18. Dal-Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, Bernard EA, Moreira JCF: Retinol supplementation induces oxidative stress and modulate antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Rad Res* 34: 395-404, 2001.
19. Frota ML Jr, Klamt F, Dal-Pizzol F, Schiengold M, Moreira JCF: Retinol-induced mdr1 and mdr3 modulation in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavengers. *Redox Rep* 9: 161-165, 2004.
20. Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-421, 1990.
21. Aebi H: Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984.
22. Flohé L, Günzler WA: Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121, 1984.
23. Bannister JV, Calabrese L: Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* 32: 279-312, 1987.
24. Uliasz TF, Hewett SJ: A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture. *J Neurosci Methods* 100: 157-163, 2000.
25. Hermes-Lima M, Wang EM, Schulman HM, Storey KB, Ponka P: Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)EDTA: kinetics aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Mol Cell Biochem* 137: 65-73, 1994.
26. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S: Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett* 187: 33-37, 1985.

27. Lowry OH, Rosebrough AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
28. Yoo HY, Chang MS, Rho HM: Induction of Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene* 234: 87-91, 1999.
29. Teixeira CC, Shapiro M, Rajpurohit R, Koch C: Retinoic acid modulation of glutathione and cysteine metabolism in chondrocytes. *Biochem J* 314: 21-26, 1996.
30. Murata M, Kawanishi S: Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 275: 2003-2008, 2000.
31. Chen Y, Buck J, Derguini F: Anhydroretinol induces oxidative stress and cell death. *Cancer Res* 59: 3985-3990, 1999.
32. Hurnanen D, Chan M, Kubow S: The protective effect of metallothionein against lipid peroxidation caused by retinoic acid in human breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1520-1528, 1997.
33. Alam SQ, Alam BS, Chen TW: Activities of fatty acid desaturases and fatty acid composition of liver microsomes in rats fed β -carotene and 13-cis retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 792: 110-117, 1984.
34. Davis WL, Crawford LA, Cooper OJ *et al.*: Generation of radical oxygen species by neural crest cells treated *in vitro* with isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin. *J Craniofac Genet Dev Biol* 10: 295-310, 1990.
35. Herbert V: Pro-oxidants effects of antioxidants vitamins. *J Nutr* 126: 1197-1200, 1996.
36. De Leen Heer AP, Lambert WE, Claeys I: All-trans retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 23: 1362-1367, 1982.

Figure legends

Figure 1. Determination of TBARS in cells treated with RA for 24 h. Cultured Sertoli cells were treated with the indicated concentrations of retinol dissolved with ethanol (0.1%); controls also contained 0.1% ethanol. Data are expressed as means \pm S.E.M for three individual experiments. * Statistically different from control, $p < 0.05$ (one-way ANOVA); ** Statistically different from control and 0.1 - 100 nM, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Figure 2. Determination of cell viability in cells treated with RA for 24 h by trypan blue exclusion probe. Cells were treated as described in the legend to Fig. 1. Data are expressed as means (%) \pm S.E.M for three individual experiments. * Statistically different from control, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Figure 3. Superoxide dismutase activity in cells treated with RA for 24 h. Cells were treated with the indicated concentrations of retinol dissolved with ethanol (0.1%); controls also contained 0.1% ethanol. Data are expressed as means \pm S.E.M for three individual experiments. * Statistically different from control, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Figure 4. Glutathione peroxidase activity in cells treated with RA for 24 h. Cells were treated as described in the legend to Fig. 3. Data are expressed as means \pm S.E.M for three individual experiments. * Statistically different from control, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Figure 5. Catalase activity in cells treated with RA for 24 h. Cells were treated as described in the legend to Fig. 3. Data are expressed as means (%) \pm S.E.M for three individual experiments * Statistically different from control, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Figure 6. Effect of RA on the oxidative degradation of 2-deoxyribose. Legend: Fenton reagents, 6 μ M Fe(II) plus 100 μ M H₂O₂ in 20 mM phosphate buffer (pH 7.2); 2-deoxyribose, 2-deoxyribose in 20 mM phosphate buffer (pH 7.2); 2-deoxyribose + RA, 2-deoxyribose plus RA (10 μ M) in 20 mM phosphate buffer (pH 7.2). As antioxidant standard we used trolox (0.1 mM). Inset: effect of RA concentration on 2-deoxyribose degradation by Fenton reagents in 20 mM phosphate buffer (pH 7.2). Data are expressed as means \pm S.E.M for three individual experiments. * Statistically different from control, $p < 0.05$ (one-way ANOVA); ** Statistically different from 2-deoxyribose, $p < 0.05$ (one-way ANOVA). The absorbance of RA at 532 nm is not significant ($0,001 \pm 0,0003$).

Figure 7. TRAP index was measured by luminol-enhanced chemiluminescence as described under “Materials and Methods”. The reaction medium consisted of 50 mM glycine buffer, pH 8.6, 10 mM AAPH, 4 mM luminol, and 100 μ L of increasing concentrations of RA: (A) 0.1 nM – 100 nM; (B) 1 μ M – 10 μ M. Chemiluminescence was measured at room temperature in a liquid scintillation counter. Data are expressed as means \pm S.E.M for three individual experiments. The symbol * indicates that RA (1, 5 and 7 μ M) is statistically different from system after 10 min, $p < 0.05$ (one-way ANOVA); The symbol # indicates that RA (10 μ M) is statistically different from system after 15 min, $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Figure 1

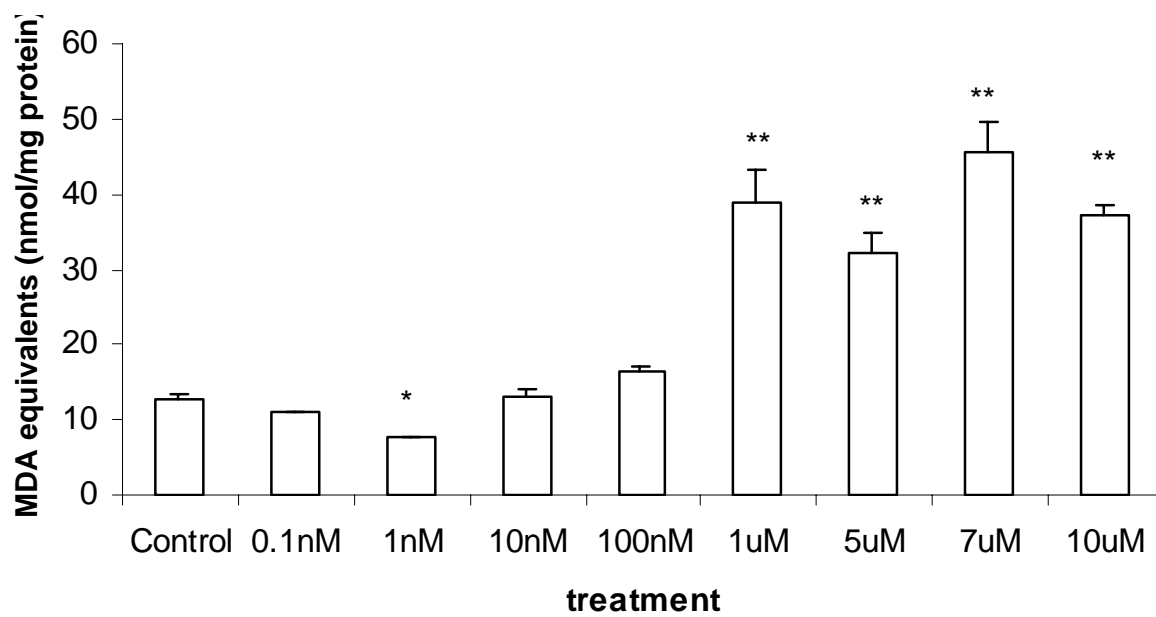


Figure 2

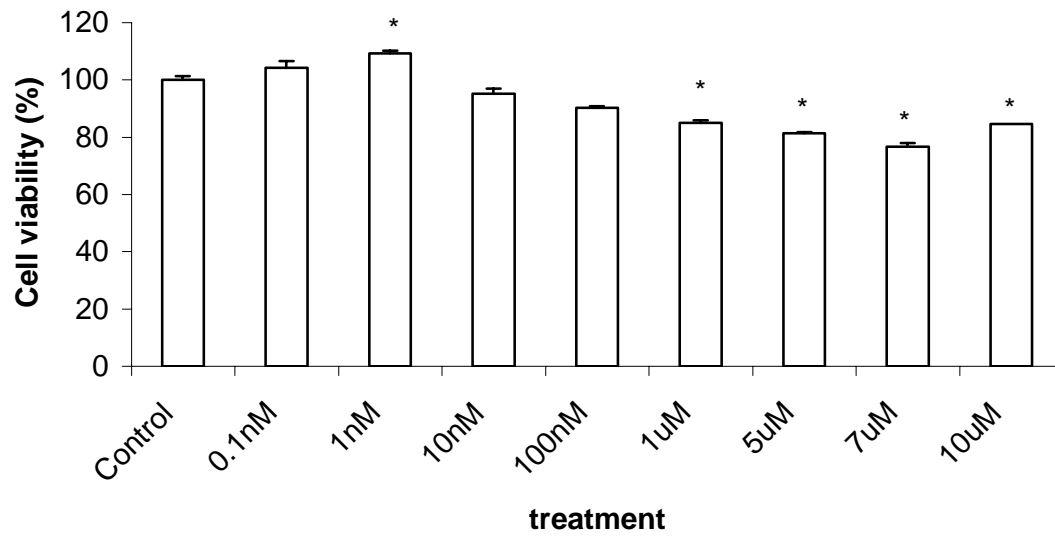


Figure 3

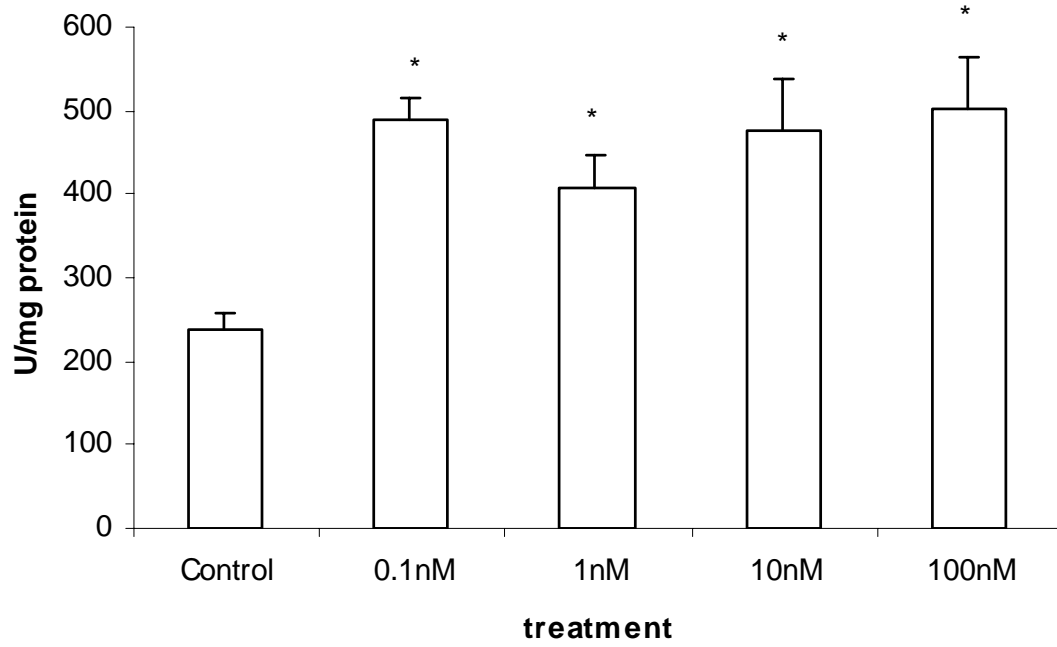


Figure 4

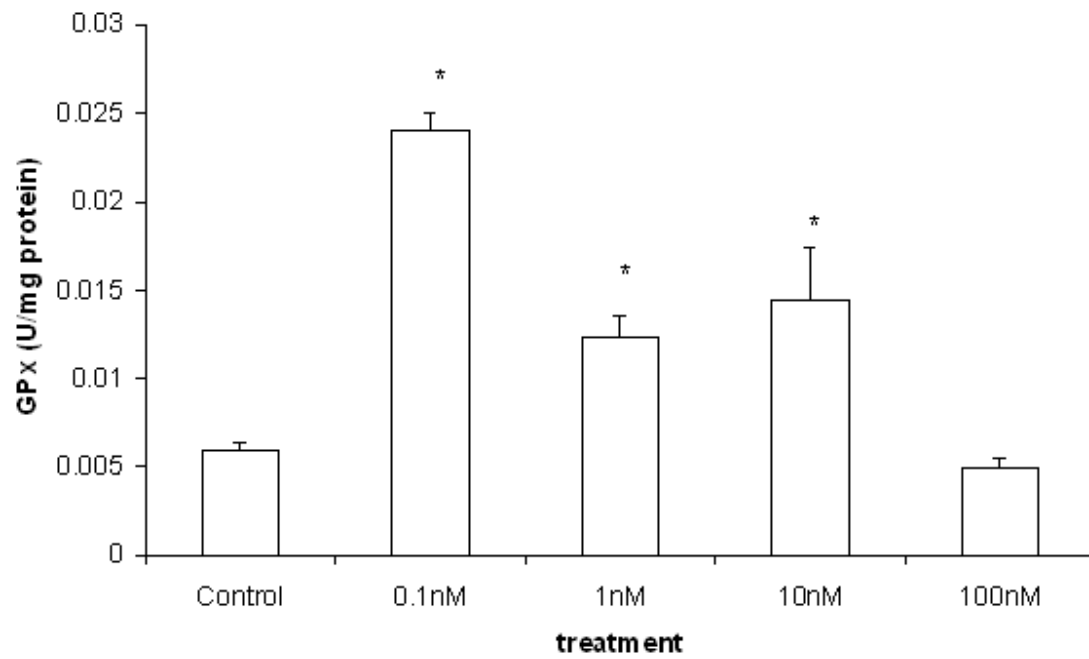


Figure 5

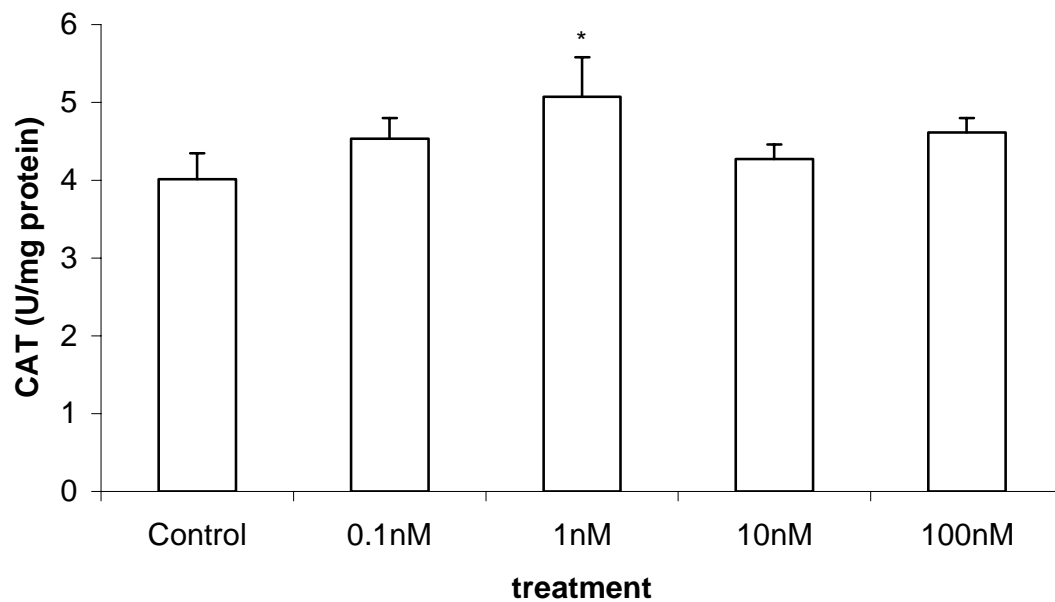


Figure 6

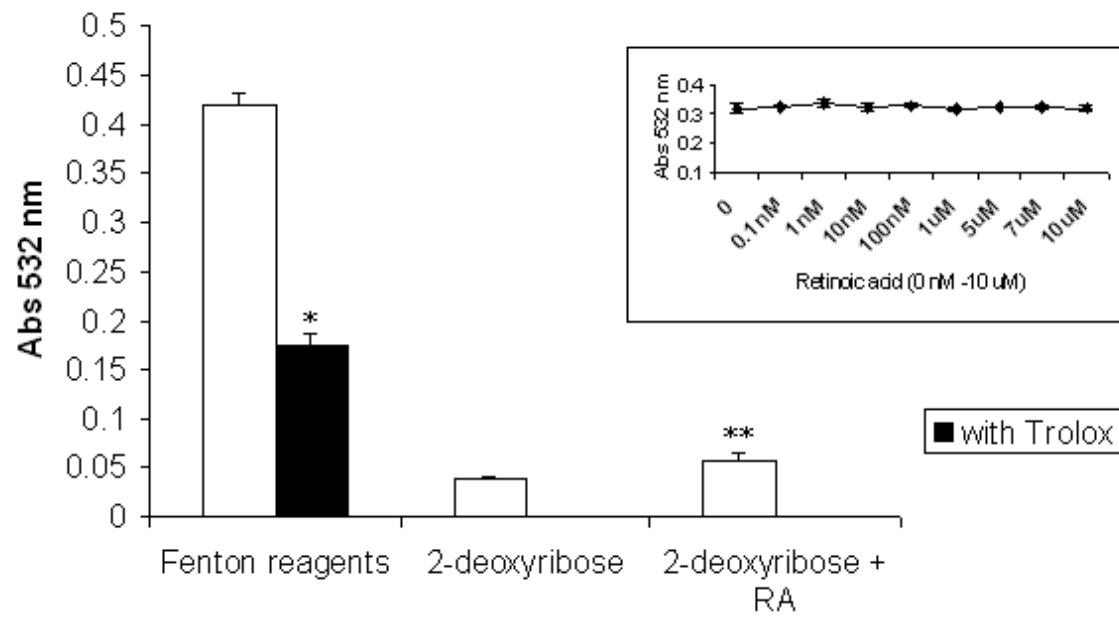
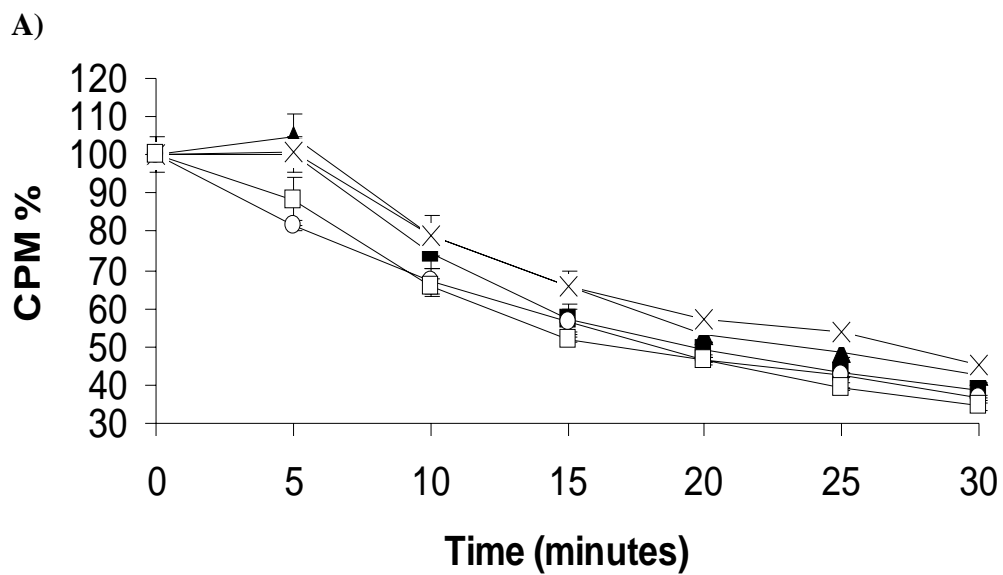
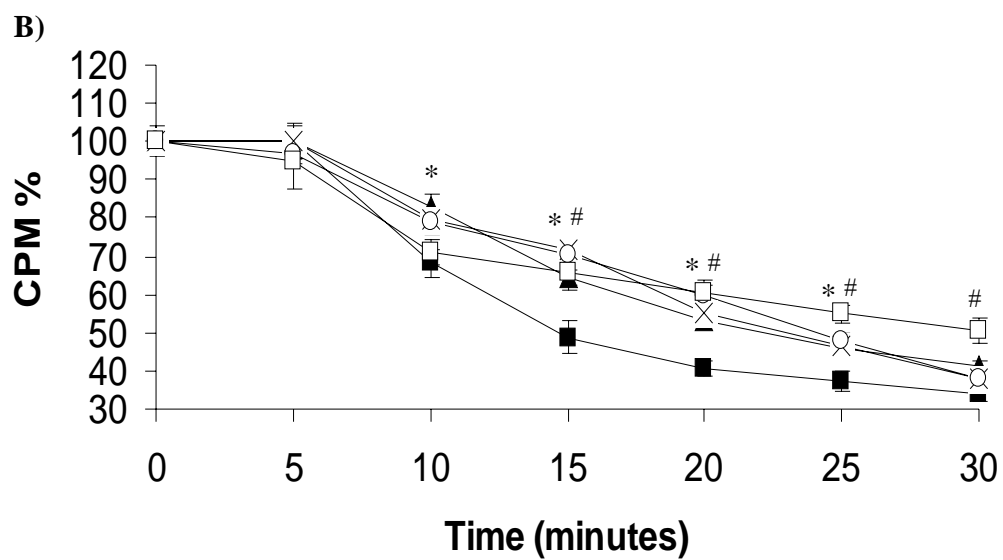


Figure 7



■ system ▲ 0.1nM × 1nM ○ 10nM □ 100nM



■ system ▲ 1uM × 5uM ○ 7uM □ 10uM

Capítulo IV

DISCUSSÃO GERAL

4. DISCUSSÃO GERAL

A vitamina A não pode ser sintetizada e deve ser obtida da dieta, sendo que uma alimentação normal é capaz de suprir as nossas necessidades. Fontes primárias incluem os carotenóides encontrados nos vegetais e os ésteres de retinol a partir de fontes animais. A recomendação diária atual de vitamina A é de 1000 equivalentes de retinol para adultos e de 375 a 700 equivalentes de retinol para recém-nascidos e crianças, respectivamente (de acordo com a National Academy of Sciences, US Food and Nutrition Board).

Vitamina A (retinol) e seus derivados exercem uma infinidade de efeitos em diversos processos biológicos, destacando-se a embriogênese, visão, regulação de processos inflamatórios, crescimento, proliferação e diferenciação de células normais e neoplásicas (Sporn *et al.*, 1994; Blomhoff, 1994; Becherel *et al.*, 1994; Napoli, 1996).

Embora o potencial antioxidante da vitamina A e carotenóides em geral tenha sido descrito primeiramente por Monaghan e Schmitt (1932), sabe-se hoje que, sob diferentes condições (tipo celular, concentrações, estados patológicos, dentre outros), essas moléculas podem se comportar de uma maneira pró-oxidante, caracterizando o papel dualístico dessa vitamina. A atividade antioxidante da vitamina A pode se dar pelo fato de ela atuar como um agente de quebra da cadeia oxidativa por combinar radical peroxil, antes que esse radical possa propagar a peroxidação lipídica e gerar lipoperóxidos (revisado por Palace *et al.*, 1999). Entretanto, em condições suprafisiológicas diversos retinóides podem propagar a produção de ERO (Murata e Kawanish, 2000; Dal-Pizzol *et al.*, 2001; Omen *et al.*, 1996).

Ao longo dos últimos anos, diversos trabalhos buscaram uma correlação entre o consumo de suplementos vitamínicos na dieta com uma diminuição na incidência de diferentes tipos de tumores e doenças cardiovasculares. Contudo, o primeiro grande

trabalho 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 (Omen, 1996). Além disso, o aumento de concentração de retinol na dieta de camundongos irradiados com ultravioleta causa uma maior indução de tumores de pele (Mikkelsen, 1998).

Classicamente, os efeitos biológicos dos retinóides estão relacionados à sua conversão a ácido retinóico, este agindo como regulador metabólico da célula alvo através da modulação da expressão de genes. No entanto, recentes trabalhos têm demonstrado que os retinóides possuem ações biológicas que não envolvem sua interação com receptores nucleares (Clifford *et al.*, 1999). Assim, alguns autores sugerem que o mecanismo de regulação dos retinóides também seja por modificação do estado redox celular.

Células de Sertoli são um ótimo modelo para estudos com retinóides e ERO. Nesse contexto, cultura primária de células de Sertoli é o método mais representativo desse tipo celular a partir do tecido de onde foram originadas, além de não possuir a desvantagem de linhagens celulares (como grande instabilidade cromossomal). Células de Sertoli são células de origem epitelial, como outras células epiteliais (pele e trato respiratório), e são responsivas a retinóides (Moreira *et al.* 1997). Esse tipo celular é bem caracterizado morfológicamente e bioquimicamente, o que facilita a identificação dos efeitos celulares mediados por retinóides e ERO.

Em particular, o nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que o tratamento com retinol (7 μ M / 24h) aumenta os níveis de fosforilação de histonas e diminui os níveis de fosforilação de HMGs (high mobility group proteins) (Moreira *et al.*, 1994), aumenta a incorporação de [H-3]-timidina no DNA (Moreira *et al.*, 1996), sugerindo o seu

envolvimento na síntese de DNA e na expressão de genes em células de Sertoli. Além disso, nosso grupo também demonstrou que o tratamento com 7 μ M de retinol aumenta a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) (Klamt *et al.*, 2000), modula a atividade de enzimas antioxidantes, além de induzir estresse oxidativo em células de Sertoli (Dal-Pizzol *et al.*, 2001).

Apesar dos nossos trabalhos terem demonstrado um efeito pró-oxidante do retinol em culturas de células de Sertoli, o mecanismo exato pelo qual esse efeito é verificado não é completamente compreendido. Uma vez que o ácido retinóico (AR) é o metabólito mais ativo do retinol, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de AR em culturas de células de Sertoli e elucidar se a produção de ERO anteriormente observada com o retinol deve-se ao fato da metabolização do mesmo em AR. Nesse sentido, foram determinados alguns parâmetros oxidativos em culturas de células de Sertoli tratadas com AR.

Células de Sertoli foram tratadas por 24 h com AR e os níveis de lipoperoxidação foram medidos. Nossos resultados mostraram que o AR em baixas doses não aumentou os níveis de TBARS (Cap. III; Fig. 1). Além disso, na concentração de 1 nM, o AR foi capaz de diminuir os níveis de TBARS. Entretanto, quando as células foram tratadas com altas doses de AR, um aumento nos níveis de TBARS foi observado. De acordo com esses resultados, AR em altas doses diminuiu a viabilidade celular (Cap. III; Fig. 2).

Uma vez que altas doses de AR induziram um aumento na lipoperoxidação e diminuíram a viabilidade celular, nós decidimos investigar somente os efeitos de doses fisiológicas (nM).

No intuito de investigar a atividade das principais enzimas antioxidantes encontradas em células de Sertoli, nós decidimos dosar a atividade da SOD, CAT e GPx em células de Sertoli tratadas com AR. Interessantemente, a atividade da SOD encontrou-se aumentada em todas as doses testadas (Cap. III; Fig. 3). Recentemente Yoo *et al.* (1999) demonstraram que o AR aumenta a ligação do fator de proliferação do peroxissomo ao seu elemento responsivo; esse mecanismo está envolvido na indução do gene SOD-1 em ratos. Além disso, o AR aumenta a atividade da CAT, SOD e Glutathione redutase em condrócitos (Teixeira *et al.*, 1996).

A atividade da GPx mostrou-se aumentada nas células tratadas com 0,1 nM, 1 nM e 10 nM (Cap. III; Fig. 4) e a atividade da CAT aumentou somente com 1 nM de AR (Cap. III; Fig. 5). Esses resultados sugerem que o AR em doses fisiológicas aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, protegendo, assim, as células do estresse oxidativo, como pode ser observado nos índices de lipoperoxidação e viabilidade celular. No entanto, o mecanismo pelo qual o ácido retinóico induz a geração de ERO é desconhecido.

Nesse sentido, nós resolvemos verificar a ação anti ou pró-oxidante *in vitro* do ácido retinóico em um sistema gerador de radical livre hidroxil. Conforme pode ser visto na Fig. 6, Cap. III, o ácido retinóico não exerceu efeito algum sobre a degradação de 2-deoxiribose mediada por radical hidroxil. Entretanto, o ácido retinóico *per se* na dose de 10 μ M foi capaz de degradar a 2-deoxiribose, sugerindo que a degradação espontânea do mesmo gera radical hidroxil (Cap. III; Fig. 6 - *Inset box*). Interessantemente, Murata *et al.* (2000) demonstraram que a auto-oxidação de retinóides é capaz de gerar superóxido. Além disso, o superóxido gerado era dismutado a H₂O₂, o qual estava significativamente correlacionado com a formação de aductos de DNA na presença de metais endógenos. Além disso, o

potencial antioxidante total do AR foi avaliado. Em baixas concentrações o AR não induziu nenhuma atividade redox-ativa (Cap. III; Fig. 7A). Entretanto, altas concentrações de AR (1–10 μM) aumentaram a geração de radicais livres (Cap. III; Fig. 7B). Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que o ácido retinóico é capaz de gerar radicais livres e sugerem, pelo menos em parte, que alguns efeitos induzidos por AR podem ser mediados por ERO geradas a partir da degradação espontânea do ácido retinóico.

O mecanismo pelo qual os retinóides induzem a produção de ERO ainda não é completamente conhecido. Entretanto, sabe-se que o β -caroteno pode agir como pró-oxidante propagando reações em cadeia de radicais livres (Burton e Ingold, 1984).

Atualmente, diferentes estudos descrevem que os retinóides possuem propriedades pró-oxidantes, provavelmente pela presença, em sua estrutura, de ligações duplas conjugadas (Chen et al., 1999).

Valores fisiológicos de AR estão na faixa de nM de concentração. Em condições normais, as células não estão expostas a altas concentrações de AR livre. Entretanto, doses farmacológicas podem ser facilmente atingidas com suplementação e intervenções clínicas, perturbando processos fisiológicos chaves; se o consumo excessivo de retinóides saturar a capacidade de ligação das proteínas de ligação de retinóides, compostos livres podem exercer alguma toxicidade (Murata et al., 2000).

É importante salientar que todo antioxidante, incluindo as vitaminas, não é mais do que um agente redox, protegendo contra os radicais livres em algumas circunstâncias e promovendo a geração de radicais livres em outras (Halliwell e Gutteridge, 2000). Em condições de estresse oxidativo, os carotenóides em geral também podem atuar como

propagadores de radicais livres, levando a um aumento na incidência de vários tipos de câncer (Hartmann e Speit, 1997).

Em um interessante trabalho Hurnanen et al. (1997) demonstraram que baixas doses de AR estimulam a proliferação celular, mas altas doses inibem esse processo. Além disso, uma correlação negativa entre lipoperoxidação e proliferação também foi observada, sugerindo que AR em altas doses pode induzir a formação de ERO.

O mecanismo pelo qual o AR pode causar lipoperoxidação não é completamente conhecido. Entretanto, existem dois possíveis mecanismos: 1) AR pode estimular a atividade da enzima Δ -6-desaturase, resultando em um aumento de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), os quais podem ser mais facilmente oxidados. Nesse sentido, uma diminuição na atividade dessa enzima está associada com alguns tumores malignos, e 2) AR pode diretamente aumentar a produção de ERO, resultando em um aumento de dano oxidativo a biomoléculas.

As concentrações de AR utilizadas nesse trabalho variaram de faixa do fisiológico até a do farmacológico. O AR está presente constitutivamente no plasma entre 4-14 nM (De Leen Heer et al., 1982). Doses farmacológicas resultam em concentrações transientes na ordem de μ M, as mesmas doses nos quais foram observados aumentos nos níveis de lipoperoxidação e uma diminuição da viabilidade celular. A concentração de AR nos tecidos alvos não é totalmente conhecida, mas especula-se que da mesma maneira que o plasma, as concentrações também se encontrem na faixa de nM. O retinol está constitutivamente presente nas células de Sertoli, e estima-se que a concentração do mesmo nessas células seja de aproximadamente 5 μ M (Livrea e Packer, 1993). Nesse sentido, sabe-se que as células de Sertoli sintetizam AR a partir do retinol circulante; isso pode ser uma

das explicações dos efeitos observados em células de Sertoli tratadas com altas doses de retinol, uma vez que a metabolização de grandes concentrações de retinol poderia acarretar uma grande formação de ácido retinóico.

Tendo em vista que os retinóides são amplamente utilizados como suplementos vitamínicos e no tratamento de diversos tipos de tumores, um melhor entendimento de como os retinóides atuam na produção de ERO e na modulação da atividade de enzimas antioxidantes, bem como na caracterização de uma possível ação biológica mediada pela produção de ERO, são de extrema importância para definir como os retinóides podem ser utilizados na clínica, principalmente como agentes quimiopreventivos e/ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos.

Capítulo V

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

5.1 Conclusões específicas

- 1) O tratamento com doses farmacológicas de ácido retinóico em culturas de células de Sertoli aumentou os níveis de TBARS e diminuiu a viabilidade celular;
- 2) As atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx aumentaram quando as células de Sertoli foram submetidas a doses fisiológicas de ácido retinóico. Esses resultados sugerem que o AR nessas doses protege as células do estresse oxidativo, como pode ser observado nos índices de lipoperoxidação e viabilidade celular;
- 3) O ácido retinóico, na concentração suprafisiológica de 10 μM , é capaz de degradar a 2-deoxiribose, um substrato específico do radical hidroxil, sugerindo que a auto-oxidação do mesmo é capaz de gerar radicais livres. Além disso, altas concentrações de AR (1–10 μM) aumentaram a geração de radicais livres.

5.2 Conclusão geral

Os dados apresentados nessa Dissertação de Mestrado permitem-nos concluir que o principal metabólito ativo do retinol, o AR, gera estresse oxidativo e diminui a viabilidade celular em células de Sertoli quando administrado em doses suprafisiológicas. Além disso, em doses fisiológicas, o AR aumentou a atividade das principais enzimas antioxidantes nas células de Sertoli, prevenindo, assim, as mesmas de danos celulares e estresse oxidativo. Os resultados apresentados são os primeiros na literatura a demonstrarem que o ácido retinóico pode gerar radicais livres. Os presentes resultados sugerem que algumas ações mediadas por AR estão relacionadas, pelo menos em parte, com a produção de ERO. Uma vez que os

retinóides em geral são amplamente utilizados em intervenções clínicas, esse trabalho nos possibilita evidenciar que os mecanismos mediados por esses compostos ainda não estão completamente elucidados. A caracterização de uma possível ação biológica do AR mediada pela produção de ERO é de extrema importância para uma definição de como os retinóides podem ser utilizados em intervenções terapêuticas, principalmente como agentes quimiopreventivos e/ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos.

Capítulo VI

PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

As principais perspectivas abertas por esse trabalho estão no estudo da metabolização do retinol em células de Sertoli, utilizando a técnica de HPLC para determinarmos a taxa de formação de AR a partir do seu principal precursor. Ainda, verificar a influência da co-administração de AR e antioxidantes clássicos (ex.: Trolox, manitol, vitamina C) nos parâmetros oxidativos analisados nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akmal, K. M.; Dufour, J. M.; Kim, K. H. (1997) Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 56: 549-556.
- Anderson, D. (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mut. Res.* 350: 103-108.
- Aström, A.; Tavakkol, A.; Petterson, V.; Cromie, M.; Elder, J. T.; Voorhees, J. J. (1991) Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). *J Biol Chem.* 266: 17662-17666.
- Bauche, F.; Fouchard, M.; Jégou, B. (1994) Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* 349: 392-396.
- Bavic, C. O.; Ericsson, U.; Allen, R. A.; Peterson, P. A. (1991) Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol binding protein. *J. Biol. Chem.* 266: 14978-14985.
- Becherel, P. A.; Mossalayi, M. D.; Le Goff, L.; Frances, C.; Chosidow, O.; Debre, P.; Arock, M. (1994) Mechanism of antiinflammatory action of retinoids on keratinocytes NO-synthase activation. *Lancet.* 344: 1570-1571.
- Betteridge, D. J. (2000) What is oxidative stress? *Metabolism.* 49: 3-8.
- Blaner, W. S.; Galdieri, M.; Goodman, D. S. (1987) Distribution and levels of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein in various types of rat testis cells. *Biol. Reprod.* 36: 130-137.

- Blaner, W. S. & Olson, J. A. (1994) Retinol and retinoic acid metabolism, in *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn, M. B.; Roberts, A. B.; Goodman, D. S. eds) 2nd ed, 319-350, Raven Press, New York.
- Blomhoff, R. (1994) *Vitamin A in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York.
- Blomhoff, R.; Green, M. H.; Berg, T.; Norum, K. R. (1990) Transport and Storage of vitamin A. *Science*. 250: 399-404.
- Boulogne, B.; Levacher, C.; Durand, P.; Habert, R. (1999) Retinoic acid receptors and retinoic X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol. Reprod.* 61: 1548-1557.
- Bruyninckx, W. J.; Mason, H. S.; Morese, S. A. (1978) Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature* 274: 606-607.
- Burton, G. W.; Ingold, K. V. (1984) β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*; 224: 569-573.
- Cavazzini, D.; Galdieri, M.; Ottonello, S. (1996) Retinoic acid synthesis in the somatical cells of rat seminiferous tubules. *Biochim. Biophys. Acta.* 1313: 139-145.
- Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954.
- Chen, Y.; Buck, J.; Derguini, F. (1999) Anhydroretinol induces oxidative stress and cell death. *Cancer Res.* 59: 3985-3990.

- Clifford, J. L.; Menter, D. G.; Wang, M.; Lotan, R.; Lippman, S. M. (1999) Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 59: 14-18.
- Cupp, A.; Dufour, J.; Kim, G.; Skinner, M.; Kim, K. (1999) Action of retinoids on embryonic and early postnatal testis development. *Endocrinology.* 140: 2343-2352.
- Dal-Pizzol, F.; Klamt, F.; Benfato, M. S.; Bernard, E., Moreira, J. C. F. (2001) Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzymes in rat Sertoli cells. *Free Rad. Res.* 34: 395-404.
- Davis, J.T. & Ong, D. E. (1995) Retinol processing by peritubular cell from rat testis. *Biol. Reprod.* 52: 356-364.
- De Leen Heer, A. P.; Lambert, W. E.; Claeys, I. (1982) All-trans retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J. Lipid. Res.* 23: 1362-1367.
- Deltour, L.; Haselbeck, R. J, Ang, H. L.; Duester, G. (1997) Localization of class I and IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol. Reprod.* 56: 102-109.
- Dew, S. E. & Ong, D. E. (1995) Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry.* 321: 434-441.
- Dufour, J. M. & Kim, K. H. (1999) Cellular and subcellular localization of six retinoid receptors in rat testis during postnatal development: identification of potential heterodimeric receptors. *Biol. Reprod.* 61: 1300-1308.

- Epp, O.; Ladenstein, R.; Wendel, A. (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* 133: 51-69.
- Faraonio, R.; Galdieri, M.; Colantuoni, V. (1993) Cellular retinoic-acid-binding-protein and retinol-binding-protein mRNA expression in the cells of the rat seminiferous tubules and their regulation by retinoids. *Eur. J. Biochem.* 211: 835-842.
- Fraga, C. G.; Motchmick, P. A.; Shigenaga, M. K.; Helbock, H. J.; Jacob, R. A.; Ames, B. N. (1991) Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 11003-11006.
- Fridovich, I. superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515-18517.
- Gaemers, I. C.; van Pelt, A. M. M.; Van der Saag, P. T.; Hoogerbrugge, J. W.; Themmen, A.; Rooj, D. G. (1998) Differential expression pattern of retinoid X receptors in adult murine testicular cells implies varying roles for these receptors in spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 59: 1351-1356.
- Giguère, V. (1994) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: Complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev.* 52: 32-44.
- Green, M. H.; Green, J. B.; Berg, T.; Norum, K. R. & Blumhoff, R. (1993) Vitamin A metabolism in rat liver: a kinetic model. *Am. J. Physiol.* 264: 509-521.
- Guo, X.; Morris, P.; Gudas, L. (2001) Follicle-stimulating hormone and leukemia inhibitory factor regulate Sertoli cell retinol metabolism. *Endocrinology.* 142: 1024-1032.
- Halliwell, B & Gutteridge, J. M. C. (2000) *Free Radical in Biology and Medicine* (3rd edn). Oxford: Oxford University Press.

- Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanism: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad. Res.* 31: 261-272.
- Hartmann, A. & Speit, G. (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90: 183-188.
- Hebuterne, X.; Wang, X.; Smith, D. E. H.; Tang, G.; Russel, R. M. (1996) *In vivo* biosynthesis of retinoic acid from B-carotene involves an excentric cleavage pathway in ferret intestine. *J. Lipid Res.* 37: 482-492.
- Heller, J. (1975) Interactions of plasma retinol-binding protein with its receptor: Specific binding of bovine and human retinol-binding protein to pigment epithelium cells from bovine eyes. *J. Biol. Chem.* 250: 3613-3619.
- Hensley, K.; Robinson, K. A.; Gabbita, S. P.; Salsman, S.; Floyd, R. A. (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.* 28: 1456-1462.
- Hermes-Lima, M.; Wang, E. M.; Schulman, H. M.; Storey, K. B.; Ponka, P. (1994) Deoxyribose degradation catalized by Fe(III)EDTA: kinetics aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Mol. Cell. Biochem.* 137: 65-73.
- Hirosawa, K. & Yamada, K. (1973) The localization of the vitamin A in the mouse liver as revealed by electron microscope radioautography. *J. Electron. Microsc.* 22: 337-346.
- Huang, H. F. S.; Li, M. T.; Pogach, L. M.; Qian, L. (1994) Messenger ribonucleic acid of rat testicular retinoic acid receptors: developmental pattern, cellular distribution and testosterone effect. *Biol. Reprod.* 51: 541-550.

- Kakkad, B. & Ong, D. E. (1988) Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 263: 12916-12919.
- Kastner, P.; Mark, M.; Mark, L.; Dierich, A.; Chambon, P. (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR β mutant mice. *Genes Dev.* 10: 80-92.
- Klamt, F.; Dal-Pizzol, F.; Ribeiro, N. C.; Bernard, E. A.; Benfato, M. S.; Moreira, J. C. F. (2000) Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator. *Mol. Cel. Biochem.* 208: 71-76.
- MacDonald, P. D. & Ong, D. E. (1988) Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 263: 12478-12482.
- Mangelsdorf, D. J.; Umesono, K.; Evans, R. M. (1994) The retinoids receptors, in *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine* (Sporn, M. B.; Roberts, A. B.; Goodman, D. S. eds) 2nd ed, 319-350, Raven Press, New York.
- McCollum, E. V. & Davis, M. (1913) The necessity of certain lipins in the diet during growth. *J. Biol. Chem.* 15: 167-175.
- McCord, J. M.; Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- Mikkelsen, S.; Berne, B.; Staberg, B.; Vahlquist, A. (1998) Potentiating effect of dietary vitamin A on photocarcinogenesis in hairless mice. *Carcinogenesis* 19: 663-666.
- Monaghan, B. R. & Schmitt, F. O. (1932) The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *J. Biol. Chem.* 96: 387-395.


- Moore, T. (1957) Vitamin A. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
- Moreira, J. C. F.; Dal-Pizzol, F.; Von Endt, D; Bernard, E. A. (1997) Effect of retinol on chromatin structure in Sertoli cells: 1,10-phenanthroline inhibit the increased DNase I sensitivity induced by retinol. *Med Sci Res.* 25: 635-638.
- Moreira, J. C. F.; Dal-Pizzol, F.; Guma, F. C. R.; Bernard, E. A. (1996) Effects of pre-treatment with hydroxyurea on the increase in [methyl-3H] thymidine incorporation induced by retinol treatment in Sertoli cells. *Med. Sci. Res.* 24: 383-384.
- Moreira, J. C. F.; Junqueira, L. A. V.; von Endt, D.; Bernard, E. A. (1994) The effect of retinol pre-incubation on the phosphorylation of histones and HMGs from cultured Sertoli cells. *Med. Sci. Res.* 22:783-784
- Murata, M. & Kawanishi, S. (2000) Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J. Biol. Chem.* 275: 2003-2008.
- Napoli, J. L. & Race, K. R. (1988) Biogenesis of retinoic acid from B-carotene. Differences between metabolism of B-carotene and retinal. *J. Biol. Chem.* 263: 17372-17377.
- Napoli J. L. (1996) Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. *Clinical Immunopathology.* 80: 52-56.
- Nordberg, J. & Àrner, E. S. J. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxins system. *Free Rad. Biol. Med.* 31: 1287-1312.
- Omen, G. S.; Goodmann, G. E.; Thornquist, M. D.; Balmes, J.; Cullen, M. R.; lass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L.; Valanis, B.; Williams, J. H.; Arnhart, S.; Hammar,

- S. (1996) Effects of a combination of B-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New Engl. J. ed.* 334: 1150-1155.
- Osborne, T. B. & Mendel, L. B. (1913) The relation of growth to the chemical constituents of the diet. *J. Biol. Chem.* 15: 311-326.
- Palace, V. P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 746-761.
- Rask, L. & Peterson, P. A (1976) In vitro uptake of vitamin A from retinol-binding protein to mucosal epithelial cells of the monkey's small intestine. *J. Biol. Chem.* 251: 6360-6366.
- Reynolds, J. E. F. (Ed) (1993) *Martindale The Extra Pharmacopoeia.* 30. Ed. London: Pharmaceutical Press.
- Ross, C. (1993a) Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J.* 7: 317-327.
- Ross, A. C. (1993b) Overview of retinoid metabolism In: *Symposium: Retinoids: Cellular metabolism and activation.* *J. Nutr.* 123: 346-350.
- Russel, L. D. & Griswold, M. D. (1993) In: *The Sertoli Cell.* Cache River Press, USA.
- Schmitt, C. & Ong, D. (1993) Expression of cellular retinol-binding protein and lecithin-retinol acyltransferase in developing rat testis. *Biol. Reprod.* 49: 972-979.
- Shubhada, S. & Tsai, Y. (1990) Differential effects of FSH on the activities of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and ornithine decarboxylase in rat Sertoli cells. *J. Androl.* 11: 414-421.

- Sporn, M. B.; Rogerts, A. B.; Goodman, D. S. (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. 2nd ed, Raven Press, New York.
- Teixeira, C. C.; Shapiro, M.; Rajpurohit, R.; Koch, C. (1996) Retinoic acid modulation of glutathione and cysteine metabolism in chondrocytes. *Biochem. J.* 314: 21-26.
- Thompson, J. N.; Howell, J. M. C.; Pitt, G. A. J. (1964) Vitamin A and reproduction in rats. *Proc. R. Soc. Med.* 159: 510-535.
- Van Pelt, A. & de Rooij, D. (1991) Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology.* 128: 697-704.
- Wagner, A. F. & Folkers, K. (1966) *Vitamins and Coenzymes*. United States of America: Interscience Publishers.
- Wang, X. D.; Tang, G. D.; Fox, J. X.; Krinsky, N. I.; Russel, R. M. (1991) Enzymatic conversion of beta-carotene into beta-apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 8-16.
- Zhai, Y.; Sperkova, Z.; Napoli, J. (2001) Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. *J. Cell. Physiol.* 186: 220-232.
- Zheng, W. L.; Bucco, R. A.; Schmit, M. C.; Wardlaw, S. A.; Ong, D. E. (1996) Localisation of cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) II and CRABP in developing rat testis. *Endocrinology.* 137: 5028-5035.

ANEXO

Carta de aceite do artigo submetido à publicação no periódico *Molecular and Cellular Biochemistry*

De:	"Molecular and Cellular Biochemistry" <mcb@sbc.ca>  Ver detalhes do contato
Para:	mfrotajr@yahoo.com.br
Assunto:	Decision on your manuscript #mcbi592R1
Data:	Wed, 09 Nov 2005 15:33:11 -0500

Dear Dr. Conte da Frota Jr:

I am pleased to inform you that your manuscript, "ALL-trans RETINOIC ACID INDUCES FREE RADICAL GENERATION AND MODULATE ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN RAT SERTOLI CELLS" has been accepted for publication in Molecular and Cellular Biochemistry.

Please remember to quote the manuscript number, mcbi592R1, whenever inquiring about your manuscript.

If you haven't already sent the signed Copyright Transfer Form, we will need to receive it. You can locate the form on the journal's Welcome Page at:

<http://mcbi.edmgr.com/>

Please print the form, sign it, and return it to Springer Science + Business Media, Molecular and Cellular Biochemistry, 101 Philip Dr., Assinippi Park, Norwell, MA 02061 or fax to (781)878-0449. Thank you. Your manuscript cannot be published until we receive the signed form.

Congratulations and best regards,

Naranjan Dhalla
Editor-in-Chief
Molecular and Cellular Biochemistry