

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

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Efeitos diferenciais do retinol e do ácido retinóico na proliferação, morte e diferenciação celular: o papel da mitocôndria e da xantina oxidase nos efeitos pró-oxidantes da vitamina A.

Alfeu Zanotto Filho

Porto Alegre, 2009.

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

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Efeitos diferenciais do retinol e do ácido retinóico na proliferação, morte e diferenciação celular: o papel da mitocôndria e da xantina oxidase nos efeitos pró-oxidantes da vitamina A.

Mestrando: Alfeu Zanotto Filho

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

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

Porto Alegre, 2009.

Este 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 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os professores e profissionais que tiveram influência em minha formação e, em especial, aos meus maiores mestres, Alfeu Zanotto e Marli Zanotto, meus pais, não pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas sim pelo exemplo de vida, de perseverança, de moral, e por todo o apoio e amor que me dedicaram. Não haverá trabalho científico ou conquista profissional que se compare ao amor e à união que construímos durante a nossa vida.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de muito esforço, e da companhia de muitas pessoas de grande valor ao meu lado. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha família, Alfeu, Marli e Mateus Zanotto, pelo exemplo, apoio e, principalmente, por acreditarem na minha capacidade. Desde o dia em que resolvi sair do interior do estado para vir estudar Farmácia em Porto Alegre, desviei de todas as expectativas de futuro de meus pais. Mesmo assim, em momento algum, eles deixaram de me incentivar nesta busca pela realização dos meus sonhos. Obrigado pela força, amizade e companheirismo. Obrigado pelo carinho, e pelo amor.

Agradeço ao meu orientador, José Cláudio Fonseca Moreira, pelo exemplo de pesquisador, de amigo, e principalmente por acreditar na minha capacidade. Agradeço pelos conselhos, orientações, sugestões, e pelos direcionamentos dados durante os momentos em que a dúvida de “o que fazer agora” pairou em meu pensamento. Agradeço, também, pelo estímulo ao raciocínio, à objetividade, pelo apoio financeiro ao meu projeto, e por ser um dos maiores exemplos profissionais que tive neste curso acadêmico.

Agradeço também a minha namorada, Jussara Pisoni, por esses anos que estive do meu lado, me apoiando, incentivando, regando e valorizando o meu trabalho e a minha maneira de ver a vida. Agradeço também pela paciência e pela tolerância. Uma grande companheira, uma grande confidente, enfim, uma grande namorada. Orgulho-me de estar compartilhando minha vida com a sua.

Não poderia de deixar agradecer os colegas do laboratório 32, Marcos Roberto, Guilherme Behr, Rafael Schröder (Cabecinha), Rodrigo Lorenzi, Fábio Klamt, Michael Andrades, Mari Hoff, Mari Escobar, Matheus Pasquali (Cabeça), Leonardo Motta (juvenil), Max Will, Evandro Gomes (Roli), Mário Frota Jr (Marinho) e, em especial,

aos colegas Daniel Gelain (Geléia) e Ramatis Birnfeld pelo apoio dado durante boa parte destes anos de pesquisa, pelos ensinamentos, pelos anos de convívio e pelo ambiente de trabalho que proporcionaram.

“ Mesmo que seja pouco, dê sempre o melhor de si”

ÍNDICE:

Parte I

RESUMO _____	1
ABSTRACT _____	2
LISTA DE ABREVIATURAS _____	3
INTRODUÇÃO	
1.1 – Os retinóides _____	4
1.2 – Síntese e Obtenção _____	4
1.3 – Metabolismo _____	5
1.3.1 – Absorção _____	5
1.3.2 - Distribuição tecidual _____	6
1.4- Mecanismos de Ação	
1.4.1 – Ação Clássica – Genômica _____	8
1.4.2 – Ações Não-Clássicas – Não genômicas _____	10
1.5 – Possíveis diferenças entre as propriedades redox ativas dos retinóides__	11
1.6 - O retinol e ácido retinóico na modulação da proliferação, morte e diferenciação celular _____	14
1.7 - As espécies reativas e a modulação da proliferação e morte celular.____	16
1.8 - Os retinóides e a célula de Sertoli _____	18
1.9 – Experimentos iniciais _____	20
2.0 – Objetivos gerais	
2.1 – Objetivos específicos do artigo 1 _____	22
2.2 – Objetivos específicos do artigo 2 _____	22

Parte II

3. MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS

Capítulo I – Artigo 1 _____ 24

Capítulo II – Artigo 2 _____ 36

Parte III

4. DISCUSSÃO _____ 46

5. CONCLUSÕES _____ 56

Referências bibliográficas _____ 58

Parte I

RESUMO:

A vitamina A (retinol) e seus derivados, os retinóides, são importantes reguladores do ciclo celular, exercendo um papel central na proliferação, apoptose e diferenciação de diversos tipos celulares. Atualmente, o papel dos retinóides na proliferação e diferenciação celular tem sido bastante investigado. Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado que formas ativas de retinóides como o ácido retinóico inibem a proliferação em modelos de células tumorais e não-tumorais, caracterizando-os como potenciais agentes quimioterápicos. Entretanto, um crescente número de estudos tem sugerido que os retinóides apresentam propriedades pró-oxidantes em sistemas biológicos, as quais podem induzir dano celular, ativação de proto-oncogenes e, até mesmo, transformação neoplásica. Essas contradições estimularam-nos a investigar as propriedades proliferativas/antiproliferativas e antioxidantes/pró-oxidantes dos principais retinóides presentes no meio intracelular - retinol e ácido retinóico- e os mecanismos envolvidos nesses efeitos em células de Sertoli, um dos principais alvos fisiológicos da vitamina A em mamíferos. Nossos dados demonstram que concentrações supra-fisiológicas de retinol, mas não de ácido retinóico, induzem aumento na produção de espécies reativas em células de Sertoli. Dependendo das concentrações de retinol utilizadas, o efeito pró-oxidante desta molécula pode desencadear diferentes eventos celulares. Em concentrações geradoras de baixos níveis de estresse (7 μM), o tratamento com retinol induziu proliferação celular em um mecanismo mediado pela ativação rápida, não-genômica e redox-dependente das rotas de JNK1/2, p38 e ERK1/2. Essa sinalização redox do retinol foi mediada pelas espécies reativas produzidas no compartimento mitocondrial. O tratamento com 7 μM de retinol causou disfunção no transporte de elétrons mitocondrial levando ao aumento na taxa de produção de ânion superóxido nesta organela. A inibição do transporte de elétrons na mitocôndria inibiu tanto a da produção de espécies reativas mitocondriais quanto a ativação redox das MAPKs, caracterizando um novo mecanismo de ação não-genômica da vitamina A. Em concentrações elevadas de retinol (10-20 μM), o dano oxidativo foi elevado o suficiente para induzir um significativo decréscimo na viabilidade celular. A diminuição na viabilidade foi mediada pela ativação da xantina oxidase, uma vez que concentrações elevadas de retinol induziram ativação desta enzima e aumentaram a produção de espécies reativas, e a inibição da xantina oxidase com alopurinol atenuou tanto a produção de espécies reativas quanto o dano oxidativo a proteínas e a citotoxicidade induzida pelo retinol. Além disso, demonstramos que a incubação da xantina oxidase com retinol promove a produção de superóxido *in vitro*, e investigamos alguns fatores envolvidos nesse evento. Por outro lado, o principal derivado ativo do retinol, o ácido retinóico, não apresentou qualquer efeito pró-oxidante ou proliferativo, nem ativou MAPKs. Ao contrário do retinol, o ácido retinóico apresentou efeitos antiproliferativos, diminuindo os níveis do inibidor de CDKs p21 e induzindo parada no ciclo celular. Os dados apresentados nesse trabalho podem contribuir para a elucidação dos efeitos pró-oxidantes, proliferativos/antiproliferativos e citotóxicos da vitamina A e seus derivados em sistemas biológicos.

ABSTRACT:

Vitamin A (Retinol) and its derivatives, retinoids, are important regulators of the cell cycle, playing a role on proliferation, apoptosis and differentiation of diverse cell types. In recent years, the influence of retinoids on cell growth and differentiation has been investigated. There is a growing body of in vitro data demonstrating that active retinoids as retinoic acid antagonize cell growth in a variety of normal and tumour cells, characterizing them as potential chemotherapeutic agents. On the other hand, a growing body of evidence has suggested that retinoids present pro-oxidant properties in biological systems, which might induce cell damage, proto-oncogene activation and neoplastic transformation. These discordances stimulated us to investigate the proliferative/antiproliferative properties of two major intracellular retinoids, retinol and retinoic acid, and its mechanisms in a model of Sertoli cells, a major vitamin A physiological target. Our data showed that supra-physiological concentrations of retinol, but not retinoic acid, are able to increase reactive species production in Sertoli cells. These pro-oxidant effects may induce different cellular fates depending on of retinol concentrations. At low pro-oxidant levels (7 μM), retinol induced an oxidant-dependent proliferation, which was mediated by a rapid, nonclassic and redox-sensitive activation of the MAPKs JNK1/2, p38 and ERK1/2. The investigation of potential sites of reactive species production indicated that mitochondria act as a primary source of reactive species involved in retinol redox signaling. Retinol 7 μM induces dysfunction in the mitochondrial electron transfer system leading to increases in superoxide anion production. Inhibition of the mitochondrial-dependent superoxide formation blocked both reactive species production and MAPKs activation, characterizing a new mechanism of nongenomic action of the vitamin A. MAPKs inhibition blocked retinol-induced proliferation. On the other hand, at high concentrations (10 to 20 μM) the pro-oxidant effects of retinol were significantly high to induce extensive oxidative damage and decreases in cell viability. At high concentrations, retinol-induced decreases in cell viability were mediated by stimulation of the xanthine oxidase activity in Sertoli cells, since retinol treatment increased xanthine oxidase activity and reactive species production, and inhibition of the enzyme with allopurinol attenuated retinol-induced reactive species, protein oxidative damage and cytotoxicity. In addition, we showed that incubation of xanthine oxidase with retinol promotes superoxide generation in vitro, and investigated the potential factors involved in this effect. On the other hand, the principal retinol derivative, retinoic acid, induced neither reactive species production or proliferation nor MAPKs activation. In contrast to retinol, retinoic acid presented its well documented antiproliferative effects by decreasing DNA synthesis and increasing the level of the CDK inhibitor p21 leading to cell arrest. Data presented in this work, may contribute to elucidation of the mechanisms involved in pro-oxidants, proliferatives/antiproliferatives and cytotoxic actions of vitamin A and its derivatives in biological systems.

II. LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 – Proteína ativadora 1

Cdk – quinases dependentes de ciclinas

CRBP – proteína celular ligadora de retinol

ERK1/2 – quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2

JNK1/2 – c-Jun N-terminal quinases 1 e 2

LRAT - lecitina:retinol aciltransferase

MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos

NFkB – Fator nuclear kappa B

PKB/Akt - proteína quinase B

PKC - proteína kinase C

p21 – inibidor de proteínas quinases dependentes de ciclinas

RAR – receptor de ácido retinóico

RARE – elementos responsivos ao ácido retinóico

RBP – proteína ligadora de retinol

REH - ésteres de retinol

RXR – receptor retinóide X

SNC – sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os retinóides

A vitamina A (retinol) e seus análogos, conhecidos como retinóides, exercem um papel central na modulação de diversos eventos celulares como proliferação, diferenciação e morte (Gudas et al., 1994). O termo “retinóides” compreende o retinol, considerado o precursor primário dos retinóides, bem como o ácido retinóico, que é formado no meio intracelular durante o metabolismo oxidativo do retinol, além de outros metabólitos naturais como o retinaldeído e o 11-cis-ácido retinóico, e, também, análogos sintéticos com similaridade estrutural e funcional. Apesar da grande diversidade de moléculas presentes na família retinóide, pode-se considerar o retinol como o principal composto obtido na dieta, e o ácido retinóico como o principal e mais abundante metabólito intracelular em mamíferos. Em geral, os retinóides naturais são compostos isoprenóides de 20 carbonos com um anel beta-ionilideno, uma cadeia lateral de carbonos contendo ligações duplas conjugadas que possibilitam diversas configurações isoméricas, e um grupo funcional terminal em um dos três estados de oxidação (Bollag, 1983).

1.2 Síntese e obtenção

A síntese de novo de retinol é restrita às plantas e a alguns microorganismos (Goodwin, 1963). Animais obtêm Vitamina A a partir da dieta, sob a forma de pró-vitamina A, ou como vitamina A pré-formada. Uma das formas de pró-vitamina A mais comumente encontradas na dieta são os carotenóides, ao passo que a principal forma de vitamina A pré-formada encontrada na dieta é o retinol esterificado com ácidos graxos de cadeia longa (estearato ou palmitato), o qual pode ser obtido através de uma dieta

composta de fígado, leite e derivados (Olson, 2001). Além disso, diversos alimentos industrializados são, atualmente, enriquecidos com vitamina A, além da possibilidade de obtenção desta em suplementos vitamínicos.

1.3 Metabolismo:

1.3.1 Absorção:

Quando o precursor retinóide é o beta-caroteno, a formação de retinol ocorre através de dois passos enzimáticos envolvendo a clivagem de beta-caroteno em duas moléculas de retinal pela beta caroteno monooxigenase, e a subsequente oxidação do retinol a ácido retinóico pela retinaldeído desidrogenase (figura 1). Quando o precursor de vitamina A são os ésteres de retinol, estes são hidrolisados no lúmen intestinal por enzimas pancreáticas e da mucosa intestinal a retinol e ácido graxo (estearato ou palmitato). Independente do tipo de molécula precursora, o retinol recém formado é, então, absorvido na mucosa intestinal e novamente reesterificado a ésteres de ácidos graxos de cadeia longa através da enzima lecitina:retinol aciltransferase, LRAT (McDonald & Ong, 1988). Os ésteres de retinol resultantes são incorporados aos quilomícrons e liberados no sistema linfático (Harrison & Mussain 2001).

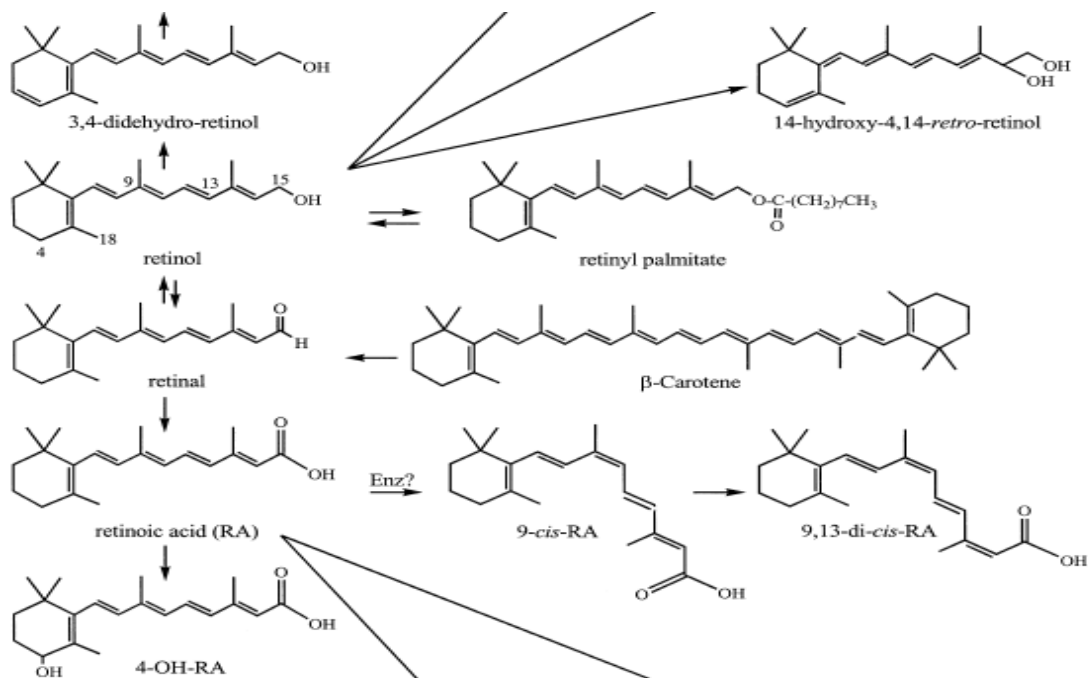


Figura 1: Vias de metabolismo dos retinóides’.

1.3.2 Distribuição tecidual:

Uma vez no sistema linfático, os ésteres de retinol nos quilomícrons tornam-se biodisponíveis a todos os tecidos. Nos tecidos extra-hepáticos, algumas células absorvem retinol pela ação da lipase lipoprotéica, que cliva os ésteres de retinol liberando o retinol no meio intracelular (Miano & Berk, 2000). Nesses tecidos, o retinol pode ser oxidado à ácido retinóico, ou estocado sob a forma de ésteres de retinol em gotas de gordura. Os quilomícrons remanescentes são captados pelo fígado. Junto com o fígado, algumas células testiculares como as células de Sertoli, também possuem alta capacidade de estocar retinol. Uma vez captados pelo fígado, o retinol presente nos quilomícrons é desesterificado pela hidrolase de ésteres de retinol (REH) presentes nos hepatócitos, e o retinol livre é rapidamente complexado a proteínas citoplasmáticas ligadoras de retinol (cellular retinol binding proteins, CRBPs - Thompson & Gal, 2003). Devido a sua

natureza hidrofóbica, o retinol possui certa dificuldade em difundir pelo ambiente aquoso do citosol, sendo que o excesso de retinol formado nesses processos tende a se acumular em membranas celulares (Napoli, 1996). Além disso, o retinol em excesso também é captado pelas células hepáticas estreladas, onde é reesterificado pela ação da acil-coa: retinol aciltransferase (ARAT) e pela LRAT, sendo armazenado em gotas lipídicas no citosol. As células estreladas hepáticas armazenam cerca de 80% do retinol presente no organismo. O retinol hepático é mobilizado através da ação de uma REH nas células estreladas hepáticas, e o retinol hidrolisado é complexado com proteínas ligadoras de retinol plasmáticas (retinol binding proteins, RBP) nos hepatócitos, e secretados na circulação (Soprano & Blaner, 1994).

As RBP são as principais proteínas envolvidas no transporte extra-hepático de retinol. Uma vez nos tecidos extra-hepáticos, o retinol é captado pelas células e pode ter diversos destinos metabólicos. Neste contexto, foram propostos dois modelos de captação de retinol pelos tecidos extra-hepáticos, embora, atualmente, o mecanismo exato ainda permaneça desconhecido. O primeiro modelo propõe que o passo-limitante da captação de retinol é a lenta dissociação do complexo retinol-RBP no ambiente extracelular (Hussain et al., 2001); o segundo sugere uma captação mediada por receptor de membrana específico para o complexo retinol-RBP, embora este receptor ainda não tenha sido descrito (Ross, 1993). Uma vez dentro das células, o retinol complexa-se novamente com as CRBPs.

O retinol citoplasmático pode ter diversos destinos metabólicos, dependendo do tipo e das funções de cada tipo celular. Em células da retina, o retinol é oxidado a 11-cis-retinal, o qual tem um papel central na transmissão do estímulo visual. No hepatócito, o

retinol pode ser metabolizado pelo complexo citocromo P450 (Noy, 2000), ao passo que, em testículos, a formação de ácido retinóico a partir do retinol através de dois passos enzimáticos envolvendo a retinol desidrogenase e a retinaldeído desidrogenase tem um papel fundamental na manutenção das funções reprodutivas masculinas (Sporn et al., 1994). O ácido retinóico (forma *all trans*) formado pode, ainda, ser isomerizado a formas *cis*, como o ácido 9-*cis* retinóico, ou ser degradado pela ação de enzimas da família 26 do complexo citocromo P450 (Noy, 2000).

1.4 Mecanismos de Ação

1.4.1 Ação Clássica – Nuclear ou genômica:

Durante muito tempo, a comunidade científica detinha o consenso de que todas as ações celulares da vitamina A eram mediadas pela ativação de receptores nucleares, os quais agiriam diretamente como fatores de transcrição modulando a expressão gênica e regulando processos como a diferenciação e o crescimento celular. Esse mecanismo foi elucidado a partir de 1987, com a clonagem dos receptores nucleares para retinóides, e a identificação dos elementos responsivos (A/G)G(G/T)TCA-(n)-(A/G)G(G/T)TCA contendo alta afinidade por esses receptores na região promotora de diversos genes (Chambon, 1994). Esses receptores pertencem à grande família de receptores nucleares para hormônios esteróides/tireoideos/vitamina D, e são subdivididos em dois grupos: RAR (retinoic acid receptors) and RXR (retinoid X receptors). Os receptores RAR e RXR possuem 3 isoformas, alpha, beta e gama, sendo codificadas por diferentes genes, e podendo interagir na forma de homo e heterodímeros (figura 2). Isso proporciona uma

gama de possibilidades de combinação, as quais podem regular diferentes genes e desencadear efeitos biológicos muito distintos (Kastner et al., 1997).

A modulação da expressão gênica pela vitamina A é mediada pela ativação de RARs e RXRs a qual é dependente da interação entre a molécula retinóide e seu sítio de ligação no respectivo receptor. Entre os metabólitos do retinol, o ácido retinóico é o que detém a maior importância biológica, sendo citado em muitos trabalhos com a “forma ativa da vitamina A” (Kurlandsky et al., 1994; Zile, 2001). O retinol e o retinal possuem baixa afinidade pelos receptores nucleares para retinóides, servindo basicamente como precursores diretos do ácido retinóico in vivo. A ligação do ácido retinóico formado a partir do retinol aos RAR promove a interação deste receptor com RXR, e o heterodímero formado pode, então, ligar-se a regiões do DNA responsivas ao ácido retinóico denominadas RARE (retinoic acid response elements), modulando a expressão gênica (Mangelsdorf & Evans, 1995) (figura 2). Os eventos modulados pela ação genômica da Vitamina A podem demorar horas ou, até mesmo, dias para produzir alterações biológicas significativas, uma vez que estes preconizam ativação gênica, transcrição, tradução e acumulação de novas proteínas (Aggarwal et al., 2006). Esse mecanismo de ação via receptores retinóides RAR/RXR é referido, atualmente, como mecanismo “genômico”, ou “clássico”, de ação biológica dos retinóides.

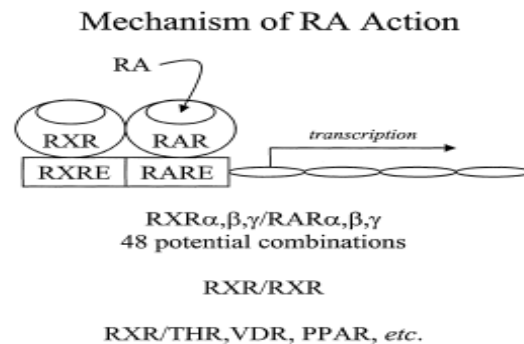


Figura 2: Interação dos heterodímeros de RAR e RXR com RARE (Ação genômica).

1.4.2 Ações não-clássicas – Não-genômicas:

Recentemente, diversos estudos têm demonstrado que o tratamento com retinóides pode induzir a ativação rápida de fatores citoplasmáticos em um mecanismo independente da ativação gênica mediada pelos receptores retinóides, e da síntese de novas proteínas. Esses efeitos são caracterizados principalmente pela sua insensibilidade a inibidores da transcrição e síntese protéica, bem como pela velocidade de ação incompatível com o tempo necessário para se observarem alterações dependentes da ativação/supressão gênica. Tais mecanismos têm sido denominados “não-genômicos”, “não-clássicos”. Em um trabalho pioneiro, Aggarwal e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com ácido retinóico 1 μ M induziu uma rápida ativação de ERK1/2 em células com RAR e RXR silenciados por siRNA, sugerindo que os receptores retinóides não são requeridos na ação do ácido retinóico sobre a ERK1/2. Hoyos e colaboradores (2000) caracterizaram sítios de ligação para retinol em PKC (proteína kinase C) e c-Raf, cuja ligação promove a ativação dessas vias de sinalização classicamente citosólicas. Estes fenômenos indicam que os retinóides são capazes de exercer funções de maneira independente da ativação dos seus receptores nucleares. Além disso, observou-se que outros agonistas de receptores nucleares como hormônios esteróides, vitamina D e hormônios da tireóide também exercem funções similares (Pedram et al., 2002).

Atualmente, tem-se sugerido que estas ações não-genômicas da vitamina A possuem uma importância fisiológica que permaneceu negligenciada durante muito tempo. Por exemplo, estudos demonstraram que o ácido retinóico pode bloquear canais

de potássio em linfócitos (Sidell & Schlichter, 1986) e ativar canais de cálcio em células de Sertoli (Wassermann et al., 1995). Estudos mais recentes têm demonstrado que o tratamento com retinóides afeta significativamente o estado de ativação de diversas vias de sinalização celular como as MAPKs, PKB/Akt e CREB (Masiá et al., 2007; Gelain et al., 2006). Masiá e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação rápida e não-genômica de PKB é requerida para a diferenciação neuronal induzida por ácido retinóico em células SHSY-5Y. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com retinol induz a ativação por fosforilação da tirosina hidroxilase, a enzima marca-passo da síntese de catecolaminas, em um mecanismo mediado por ERK e PKC em células cromafin (Gelain et al., 2008). Nesse estudo foi demonstrado o envolvimento de espécies reativas de oxigênio na ativação de ERK e PKC por retinol. O mecanismo de ação não-genômica mediado por espécies reativas de oxigênio foi também observado em modelos de células de Sertoli, nas quais a ativação não-genômica de ERK1/2 modulou fenômenos de transformação fenotípica (Gelain et al., 2006). Apesar de inovadores, esses estudos não contemplaram a possibilidade de outros retinóides como, por exemplo, o ácido retinóico também possuírem ações não-genômicas mediadas por espécies reativas. Considerando importantes eventos celulares modulados por ações não-clássicas, acreditamos que o melhor entendimento das ações não-genômicas da vitamina A pode ter um papel importante na elucidação das ações biológicas deste micronutriente.

1.5 Possíveis diferenças entre as propriedades redox-ativas dos retinóides:

Além das ações sinalizadoras acima citadas, as propriedades redox-ativas da vitamina A vêm despertando atenção de pesquisadores desde meados da década de 80,

quando começou-se a especular que alguns de seus efeitos biológicos poderiam estar ligados à propriedade de alterar o estado redox celular (Diplock, 1991; Brown & Goodman, 1998). Devido a sua capacidade de reagir com os até então temidos radicais livres, a vitamina A, junto com outros micronutrientes como as vitaminas C e E, foi considerada por muito tempo um composto antioxidante, que poderia desempenhar funções importantes na prevenção e tratamento de patologias como o câncer, doenças neurodegenerativas e, até mesmo, combater o envelhecimento (Jeandel et al., 1989). Não apenas o conceito de radicais livres como “vilões celulares”, mas também o conceito de vitamina A como antioxidante caíram por terra nas últimas décadas. Atualmente, está bem estabelecido que as espécies reativas são fisiológicas e essenciais para a manutenção e equilíbrio das funções celulares, e que a vitamina A pode agir como um composto pró-oxidante (Omenn et al., 1994; Murata & Kawanishi, 2000; De Oliveira et al., 2007). Neste contexto, estudos epidemiológicos que foram realizados visando a avaliar o efeito da suplementação com vitamina A na prevenção do câncer em fumantes tiveram de ser interrompidos devido à elevada incidência de neoplasia pulmonar (Omenn et al., 1994; Omenn, 2007). Somando-se a estes estudos, dados coletados em estudos *in vitro*, modelos animais e humanos permitiram-nos chegar à conclusão de que a vitamina A pode exercer um papel pró-oxidante, aumentando inclusive a incidência de dano oxidativo ao DNA (Murata & Kawanishi, 2000), e induzindo a ativação de proto-oncogenes (Omenn, 2007). Entretanto, é consenso entre os pesquisadores que a deficiência de vitamina A também é capaz de promover dano oxidativo a biomoléculas, o que caracterizaria-a como antioxidante. Portanto, a observação de que a vitamina A pode exercer tanto ações pró-oxidantes como antioxidantes (Chiu et al., 2008), indica que a mesma pode ser

considerada uma molécula redox-ativa, ou seja, ela apresenta atividade redutora ou oxidante dependendo do micro-ambiente em que se encontra.

Apesar de alguns estudos apontarem a classe “retinóides” como possíveis agentes pró-oxidantes, nenhum estudo comparou as propriedades redox-ativas de diferentes moléculas desta família. Além disso, a maioria dos estudos que relatam efeitos pró-oxidantes *in vivo* está centrado na administração de palmitato de retinol e beta-caroteno, não sendo possível determinar se a atividade redox-ativa está relacionada a essas moléculas *per se* ou aos produtos da metabolização desses compostos. Considerando os compostos mais comumente encontrados no meio intracelular - retinol, retinal e ácido retinóico- os estudos apontam as formas oxidáveis (retinol e retinal) como os principais candidatos a serem os protagonistas da ação pró-oxidante da vitamina A (Gimeno et al., 2003; Gelain & Moreira, 2008). Em fibroblastos, por exemplo, tanto o retinol, quanto o retinal, mas não o ácido retinóico, induzem apoptose dependente de estresse oxidativo (Gimeno et al., 2004). Um efeito semelhante ocorreu em células PC12, nas quais somente o retinol aumentou a produção de espécies reativas (Gelain & Moreira, 2008). Em um interessante trabalho, Murata & Kawanishi mostraram que a auto-oxidação do retinol e do retinal em pH fisiológico promove a geração do ânion superóxido *in vitro* e em células HeLa, além de radicais livres centrados no átomo de carbono da molécula de retinol (Murata & Kawanishi, 2000). Contextualizando a sinalização celular, foi determinado que regiões ricas em cisteína presentes nos domínios regulatórios de c-Raf e das isoformas alpha, teta, mi e zeta de PKC servem como sítios de ligação de retinol, mas não de ácido retinóico (Radomiska-Pandya et al., 2000), e que essa ligação influencia na ativação dessas enzimas por radicais livres (Hoyos et al., 2000). Em modelos animais, foi

observado que a suplementação com palmitato de retinol por 3 ou 28 dias induziu dano oxidativo a córtex, cerebelo e hipocampo, os quais foram acompanhados de déficits motores e cognitivos (De Oliveira et al., 2007; De Oliveira et al., 2008). Por outro lado, poucos estudos relatam efeitos pró-oxidantes relacionados ao ácido retinóico, devendo-se, ainda, considerar que estes trabalhos utilizaram concentrações bastante elevadas e longos períodos de incubação (Tan et al., 2008).

Não apenas as moléculas retinóides com atividade pró-oxidante, mas também os possíveis mecanismos envolvidos na produção de espécies reativas precisam ser melhor avaliados. Utilizando preparações de mitocôndrias isoladas, Klamt e colaboradores (2005) demonstraram que a incubação com retinol era capaz de aumentar a taxa de produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons, promovendo o inchamento (swelling) desta organela. Semelhante aumento na produção de superóxido foi verificado em mitocôndrias isoladas do SNC de ratos suplementados com palmitato de retinol (De Oliveira et al., 2007). Portanto, a mitocôndria parece ser uma potencial fonte de espécies reativas envolvidas nas ações pró-oxidantes do retinol. Entretanto, não foi determinado se o aumento da produção de espécies reativas na mitocôndria poderia estar envolvido nos mecanismos de sinalização redox dos retinóides. Além disso, estudos recentes demonstraram que a xantina oxidase, uma enzima produtora de superóxido, é capaz de metabolizar retinol a ácido retinóico, embora uma possível produção de radicais livres neste processo não foi avaliada (Taibi & Nicrota, 2007).

1.6 O retinol e ácido retinóico na modulação da proliferação, morte e diferenciação celular.

Diversos estudos apontam os retinóides como agentes indutores de morte e diferenciação celular, caracterizando-os como potenciais agentes quimioterápicos (Pahlman et al., 1984; Liu et al., 1996). De fato, existe uma gama de trabalhos demonstrando que doses elevadas de ácido retinóico podem promover melhoras clínicas em leucemias, tumores gástricos, nasofaríngeos, pulmonares entre outros (Leithner et al., 2000; Kuratomi et al., 1999; Windbichler et al., 1996; Pastorino et al., 1993). Além disso, o ácido retinóico já é bem reconhecido como um agente promotor de diferenciação celular (Liu et al., 1996; Altucci et al., 2007). Este potencial tem sido aplicado tanto como ferramenta para diferenciar linhagens celulares na pesquisa, quanto em protocolos de quimioterapia visando promover diferenciação de tumores caracterizados por células imaturas/blásticas como os neuroblastomas, gliomas e leucemias. Um fato importante é essa abordagem utiliza doses elevadas de ácido retinóico, e tratamentos por longos períodos de tempo. Fisiologicamente, os níveis intracelulares de ácido retinóico flutuam entre 0,1 e 10 nM, e a maioria dos estudos utiliza níveis tão altos quanto 1 a 10 µM para induzir morte e diferenciação celular (Liu et al., 1996; Cañon et al., 2004; Cemaiano et al., 2008). Por outro lado, os efeitos não-genômicos do ácido retinóico foram relatados tanto em concentrações fisiológicas quanto em doses elevadas, dependendo da via de sinalização analisada. Por exemplo, a ativação não-genômica de Akt ocorre em níveis tão baixos quanto 1 nM (Masiá et al., 2007), ao passo que a ativação de ERK1/2 ocorre em concentrações mais elevadas (0.5 - 1 µM) de ácido retinóico (Aggarwal et al., 2006).

Portanto, a extrapolação destes dados *in vitro* para situações *in vivo* tem sido bastante debatida.

Apesar da quantidade elevada de trabalhos descrevendo as propriedades antiproliferativas do ácido retinóico, poucos trabalhos descrevem os efeitos do seu precursor, retinol, na proliferação celular. Entretanto, diferentemente do ácido retinóico, os estudos com retinol citam eventos como a ativação de proto-oncogenes, proliferação, transformação celular e, até mesmo, neoplasia (Murata & Kawanishi, 2000; Klamt et al., 2003 b; Omenn, 2007). Tudo isso indica, de fato, que, embora estruturalmente semelhantes, o retinol e o ácido retinóico podem exercer diferentes ações em nível celular, e isso precisa ser melhor definido.

1.7 As espécies reativas e a modulação da proliferação e morte celular.

Durante muito tempo acreditou-se que os radicais livres e as espécies reativas agiam apenas como compostos indutores de dano oxidativo às estruturas celulares, e que isto estaria intimamente relacionado com efeitos deletérios como o envelhecimento, morte e a transformação celular. Entretanto, os trabalhos mais recentes têm demonstrado que as espécies reativas são constantemente produzidas em um nível basal no ambiente intracelular, e isso é essencial para a manutenção das funções celulares (Stone & Yang, 2006). Quando a taxa de produção de espécies reativas aumenta em relação às defesas celulares, estabelece-se um quadro de estresse oxidativo. Nesse ambiente oxidante, diversas proteínas e vias de sinalização são estimuladas/inibidas mediando respostas celulares ao estresse (Ichijo, 1999; Kefaloyianni et al., 2006) . A estimulação ou inibição de vias de sinalização pelas espécies reativas ocorre, principalmente, pela oxidação de

resíduos cisteínas em proteínas envolvidas nessas vias (Stone & Yang, 2006). A oxidação dos resíduos de cisteína causa modificações conformacionais que podem ativar ou inibir uma proteína, e isso acaba estimulando ou inibindo a via na qual ela está envolvida. Entre as vias/proteínas que atuam como sensores do estado oxidativo celular, destacam-se os fatores de transcrição como NF-kappa B, AP-1 e MAPKs como a ERK, JNK e p38 (Ichijo, 1999; Kefaloyianni et al., 2006). Devido à existência de proteínas sensíveis a alterações no estado redox celular, atualmente considera-se as espécies reativas (ER) como moléculas sinalizadoras, e a relação “ER-proteína sensor redox-resposta celular” é conceituada com o termo “sinalização redox”.

Em ambientes pró-oxidantes, a ativação de vias de sinalização redox pode modular tanto a proliferação quanto a morte celular dependendo do tipo celular e da duração do estímulo pró-oxidante. Atualmente, existe o consenso de que baixos níveis de estresse oxidativo (ou seja, baixa taxa de produção de ER e por um tempo reduzido) são capazes de induzir proliferação celular, ao passo que níveis elevados de ER, em geral, estão relacionados à indução de morte celular apoptótica ou necrótica (Stone & Yang, 2006). Na figura 3 estão ilustrados os eventos celulares desencadeados por diferentes níveis intra e extracelulares de peróxido de hidrogênio. Em presença de baixos níveis de peróxido ocorre proliferação celular, ao passo que a morte celular é o evento predominante sob altas concentrações desta espécie reativa de oxigênio. Assim como ocorre com diversos agentes farmacológicos, a relação “dose X tempo de estresse oxidativo” tem um papel fundamental nos destinos celulares. Sob essa mesma óptica sabe-se que, em situações de estresse oxidativo, as vias de MAPKs como JNK e ERK, além de serem estimuladas, podem modular tanto a morte quanto a proliferação celular

dependendo do tempo em que permanecem ativadas; isso é proporcional ao estímulo pró-oxidante (Sakon et al., 2003). Os estudos sugerem que uma ativação transitória e rápida de MAPKs está relacionada com proliferação celular, ao passo que a ativação prolongada dessas vias está diretamente relacionada com a indução de morte celular em ambientes pró-oxidantes (Chen et al., 1996; Choi et al., 2006) .

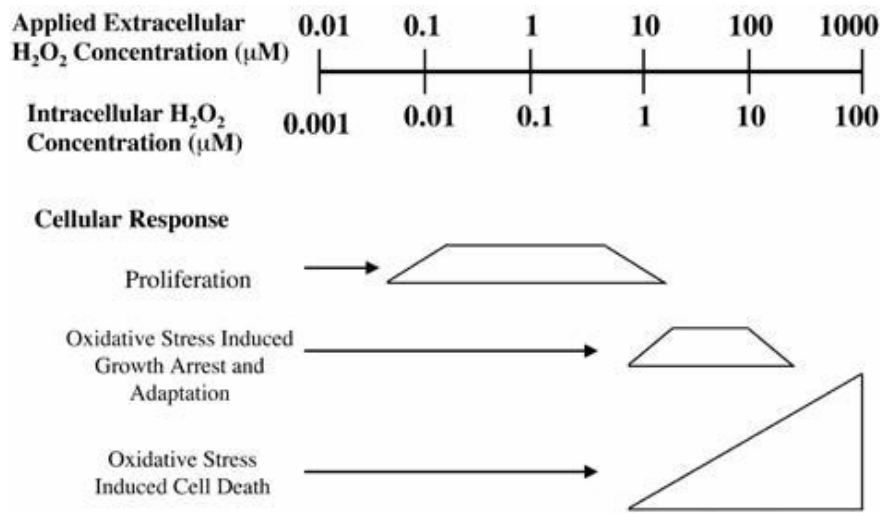


Figura 3: Modulação da morte e proliferação celular por diferentes níveis de peróxido de hidrogênio (Stone & Yang, 2006).

1.8 Os retinóides e a célula de Sertoli

Os experimentos realizados nesta dissertação utilizaram o modelo de cultura de células de Sertoli isoladas de ratos Wistar de 15 dias. Nesse período de desenvolvimento, a célula de Sertoli possui uma baixa taxa proliferativa e está indiferenciada (Jégou & Sharpe, 1999; Holsberger et al., 2005). Estas células são um dos principais alvos fisiológicos da vitamina A em mamíferos, possuindo ainda uma função de reservatório de vitamina A nos testículos (Napoli, 1996). A vitamina A armazenada na célula de Sertoli

serve com uma moduladora direta das suas funções reprodutivas relacionadas à manutenção da espermatogênese e do sistema reprodutivo masculino (Vernet et al., 2006). A célula de Sertoli é totalmente dependente de vitamina A; sabe-se que a deficiência de vitamina A, ou a ausência de receptores para ácido retinóico, causam disfunção na produção de espermatozóides e esterilidade em machos. Por outro lado, o excesso de vitamina A também induz citotoxicidade testicular e infertilidade (Livera et al., 2002). Portanto, os níveis de retinóides precisam ser finamente regulados neste tipo celular à fim de prevenir os efeitos deletérios da falta ou excesso dos mesmos. Na célula de Sertoli, os níveis fisiológicos de retinol flutuam entre 2 a 5 μM , e os de ácido retinóico são bem menores, ficando entre 1 a 10 nM (Sporn et al., 1994; Napoli, 1996). Ao longo desta última década, nosso grupo tem demonstrado que o retinol, quando em concentrações acima das fisiológicas para a célula de Sertoli ($> 5 \mu\text{M}$) induz dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA (Dal Pizzol et al., 2000; Dal Pizzol et al., 2001 a,b; Klamt et al., 2003 a,b). Além disso, a ocorrência de fenômenos relacionados a alterações do ciclo celular, como proliferação, também foram observadas. Interessantemente, poderia ser esperado que mediante um insulto oxidativo, as células fossem levadas a morte celular, entretanto, o tratamento com 7 μM de retinol induz um aumento significativo da proliferação celular (Dal Pizzol et al., 2001), mudança fenotípica (Klamt et al., 2003; de Oliveira et al., 2005), formação de focos proliferativos (Klamt et al., 2003), e produção de matriz metaloproteinases (Dalmolin et al., 2007), sugerindo que estas células foram transformadas e retornaram a um estado proliferativo após o tratamento retinol (7 a 10 μM). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que a ativação redox da via da ERK1/2 mediou a transformação fenotípica previamente

reportada (Gelain et al., 2006). Esses eventos elicitados pelo tratamento com retinol parecem envolver uma regulação muito específica, uma vez que em doses mais altas como 15 e 20 μM de retinol, o estresse oxidativo torna-se muito elevado e a morte celular é o principal evento observado. Foram estas diferenças que nortearam o desenvolvimento deste trabalho.

1.9 Experimentos iniciais:

As curvas de concentração e tempo apresentadas na figura 4 serviram de base para o desenvolvimento dos experimentos apresentados nesta dissertação. Na figura 4B, pode-se perceber que o tratamento com 7 μM retinol por 24 h não altera significativamente a viabilidade celular, ao passo que concentrações de 10 e 20 μM induzem significativo decréscimo na viabilidade ao final de 24 h de tratamento. Pode-se ainda verificar que em 7 μM de retinol ocorreu uma significativa estimulação da incorporação de timidina ao DNA (fig 4A). Este aumento foi totalmente bloqueado pela hidroxiuréia, um inibidor da síntese de DNA, sugerindo proliferação celular. Corroborando, o número de células em cultura apresentou-se 55 % maior em 48 h (72 h total) após o fim do tratamento com 7 μM retinol. Apesar da concentração de 10 μM ter causado decréscimos na viabilidade e na quantidade de células ao final de 24 h, a síntese de DNA foi estimulada nas células remanescentes (figura 4A), e o número de células apresentou-se maior que o grupo controle quando avaliado após 48 h do fim do tratamento com retinol. Levando em conta os dados prévios, podemos afirmar que o retinol causa um insulto oxidativo que, em baixos níveis (7 μM) induz proliferação, e em concentrações mais elevadas (10 a 20 μM) o dano é suficiente para induzir decréscimos significativos na viabilidade celular. As células que resistem ao

insulto oxidativo do retinol 10 μM adquirem atividade proliferativa (figura 4C). Em 20 μM de retinol, observa-se apenas um dano oxidativo extenso e morte celular (fig 4C). Dados prévios mostram que as células remanescentes do tratamento com 7 μM de retinol são fenotipicamente transformadas e formam focos proliferativos em cultura (Klamt et al., 2003; Gelain et al., 2006). Entretanto, até o presente momento pouco sabemos sobre os efeitos pró/antioxidantes e proliferativos/antiproliferativos do ácido retinóico (o principal metabólito intracelular do retinol) nesse modelo celular. Também, não podemos precisar se os efeitos previamente observados pelo tratamento com retinol poderiam estar sendo mediados não pelo retinol, e sim pelo ácido retinóico formado durante o metabolismo intracelular do mesmo.

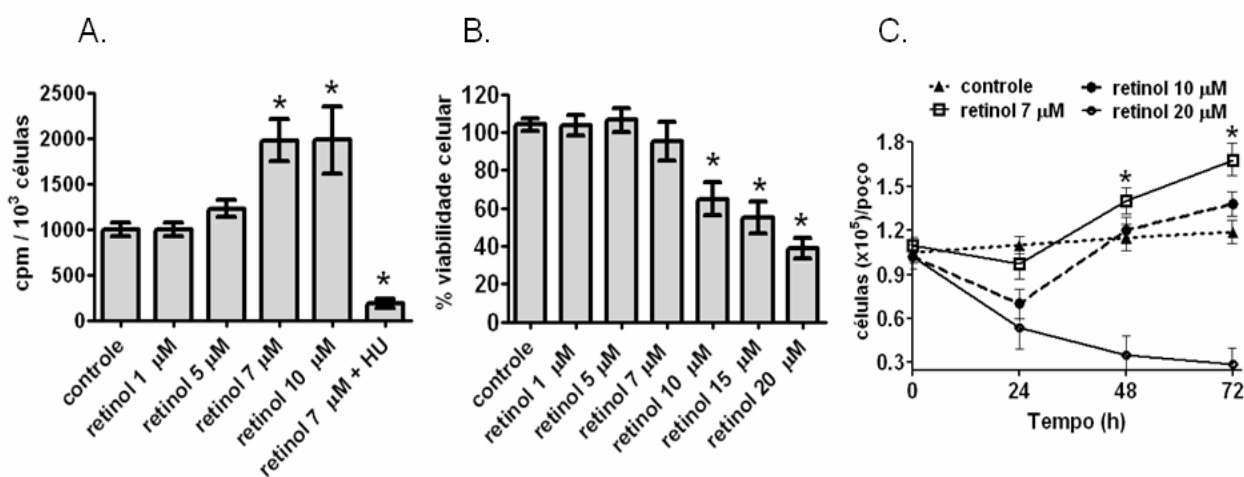


Figura 4: Efeito das diferentes concentrações de retinol na proliferação e morte celular em células de Sertoli tratadas por 24 h. (A) Incorporação de timidina. Células foram tratadas por 24 h com retinol, após timidina marcada foi adicionada ao meio de cultura por mais 12 h e a incorporação foi avaliada na presença ou ausência do inibidor da síntese de DNA, hidroxiuréia 3 mM. (B) Ensaio de MTT para determinação da viabilidade celular. Viabilidade foi determinada ao final de 24 h. (C) Número de células em cultura ao final de 24 h de tratamento com retinol, e em 24 h (48 h) e 48 h

(72 h) após a retirada do meio com retinol e adição de meio de cultura completo. Após os determinados tempos, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. *diferente do grupo controle, Oneway ANOVA, $p < 0,01$ ($n=3$).

2. OBJETIVOS

Levando em conta os dados acima citados, esse trabalho tem por objetivo investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos proliferativos e citotóxicos da suplementação com vitamina A em células de Sertoli, e determinar as possíveis fontes de espécies reativas envolvidas nas ações pró-oxidantes da mesma.

2.1 - Objetivos específicos destes estudos:

Artigo 1

- a) Avaliar o papel das rotas de MAPKs JNK e p38 no efeito proliferativo do retinol (uma vez que trabalhos anteriores sugeriram um papel da ERK nesse efeito).
- b) Elucidar o mecanismo de ativação/inibição dessas vias, considerando o possível envolvimento das espécies reativas.
- c) Determinar a fonte primária das espécies reativas envolvidas na sinalização redox proliferativa do retinol.
- d) Determinar se principal metabólito ativo do retinol, o ácido retinóico, poderia ter um efeito semelhante como indutor de proliferação.
- e) Avaliar se o ácido retinóico possui algum efeito pró-oxidante, ou esta é uma propriedade específica do retinol.

Artigo 2

a) A xantina oxidase, uma enzima produtora de espécies reativas de oxigênio recentemente descrita como capaz de metabolizar retinol, é capaz de produzir espécies reativas quando incubada com retinol *in vitro*?

b) Determinar alguns fatores envolvidos nessa reação (efeito do NADH, avaliação do sítio enzimático envolvido, comparação com substratos clássicos)

c) Avaliar o papel da xantina oxidase no estresse oxidativo causado por doses elevadas de retinol (10 a 20 μM) em células de Sertoli.

Parte II

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Capítulo I

“Differential effects of retinol and retinoic acid on cell proliferation: a role for reactive species and redox-dependent mechanisms in retinol supplementation”.

Artigo publicado no periódico Free Radical Research, p. 1-11 (2008).

Differential effects of retinol and retinoic acid on cell proliferation: A role for reactive species and redox-dependent mechanisms in retinol supplementation

ALFEU ZANOTTO-FILHO, RAFAEL SCHRÖDER, & JOSÉ CLÁUDIO F. MOREIRA

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Accepted by Professor H. Poulsen

(Received 17 June 2008; revised 7 July 2008)

Abstract

While some authors suggest that retinoids are potential anti-proliferative and antioxidant agents, evidence has suggested those present pro-oxidant properties, which might lead to malignant proliferation. These discordances stimulated one to investigate the proliferative/anti-proliferative properties of two major retinoids, retinol (ROH) and retinoic acid (RA). In Sertoli cells, ROH increased proliferation while RA was anti-proliferative. ROH increased DNA synthesis, decreased p21 levels and induced cell cycle progression. ROH increased reactive species (RS) production and stimulated p38, JNK1/2 and ERK1/2 MAPKs activation. Antioxidant treatment with Trolox blocked ROH-induced RS production, MAPKs activation and proliferation; MAPKs inhibition blocked proliferation. The potential sites of RS indicate that ROH-induced RS is promoted via mitochondria and xanthine oxidase. In contrast, RA induced neither RS production nor MAPKs activation. RA decreased DNA synthesis and increased p21 leading to cell arrest. Overall, data show that ROH, but not RA, is able to induce proliferation through non-classical and redox-dependent mechanisms.

Keywords: *Retinol, retinoic acid, proliferation, MAPKs, reactive species*

Introduction

Vitamin A (Retinol, ROH) and its derivatives, retinoids, are important regulators of the cell cycle, playing a role on proliferation, apoptosis and differentiation of diverse cell types [1]. In recent years, the influence of retinoids on cell growth and differentiation has been investigated. There is a growing body of *in vitro* data demonstrating that active retinoids as retinoic acid (RA) antagonize cell growth in a variety of normal and tumour cells, characterizing them as potential chemotherapeutic agents [2–4]. In addition, some authors suggest that retinoids act as antioxidants and could be potential agents in anti-

oxidant supplementation protocols for treatment and prevention of malignant and neurodegenerative diseases [3,4].

On the other hand, a growing body of evidence has suggested that retinoids present pro-oxidant properties in biological systems, which might induce cell damage, proto-oncogene activation, proliferation and neoplastic transformation [5–21]. Clinical trials have been carried out based on the potential antioxidant role of vitamin A, but some of them had to be discontinued due to increased mortality related to lung cancer incidence [5,6]. It was suggested that many of the deleterious effects observed in these

Correspondence: Alfeu Zanotto-Filho, Depto. Bioquímica (ICBS-UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600/Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel: (55) (51) 3316-5578. Fax: (55) (51) 3316-5535. Email: ohalceu@yahoo.com.br

clinical trials could be related to free radicals generation in vitamin A supplementation [5]. These discordances between vitamin A pro-oxidant/antioxidant and proliferative/anti-proliferative properties are especially so when it is considered that excessive intake of vitamin A supplements has been used as 'antioxidant therapies' for prevention and treatment of diseases such as cancer, Parkinson's and Alzheimer's [5,6,22–24].

Studies have suggested that ROH and its principal metabolite RA present different redox-active properties in biological systems [9,10]. Previous works reported that ROH and retinaldehyde, but not RA, induce redox-dependent cell death in human fibroblasts [10]. In PC12 cells was observed an increased RS formation following ROH treatment, which was not detected in RA treated-cells [9]. In Wistar rats, retinol palmitate supplementation increased lipoperoxidation, protein damage and mitochondrial dysfunction in the brain, which were accompanied by depression and locomotory deficiency [18–20]. However, the pro-oxidant retinoid molecules, the mechanisms underlying its pro-oxidant effects, and its consequences on cell proliferation/death remain to be better determined. This is important when it is considering that RS are important signalling molecules by regulating map kinases (MAPKs) signalling cascades and several other redox-sensitive pathways involved in cell proliferation, death and transformation [25].

Our group has long been studying ROH actions in Sertoli cells [11–17]. They are one of the principal physiological targets and stockers of vitamin A in mammalian, playing important functions in male reproductive system [26–28]. In Sertoli cells, ROH induces antioxidant enzymes activation, lipoperoxidation and DNA damage [12,15–17]. In addition, a pre-transformed and proliferative phenotype was reported in Sertoli cells following ROH treatment [11,12]. However, it was not previously established whether ROH effects are attributed to ROH *per se* or to its principal intracellular metabolite RA, its mechanisms and the contribution of RS in ROH and/or RA effects.

In particular, the apparently conflicting data regarding the pro-oxidant/antioxidant and proliferative/anti-proliferative potential of different retinoid molecules and our aforementioned data stimulated us to compare the effect of two major intracellular retinoids, ROH and RA, on cell proliferation and its mechanisms in a model of primary, undifferentiated and low-proliferative Sertoli cells [12,29]. Here, we report that ROH increased cell proliferation while RA presented an anti-proliferative effect. These differential effects were dependent on ROH, but not RA, ability to increase RS production in mitochondria leading to a redox-sensitive activation of MAPK pathways.

Materials and methods

Materials

All-*trans* retinol alcohol (ROH), all-*trans* retinoic acid (RA), 2',7'-dichloro-4-hydroxyfluorescein diacetate (DCFH-DA), phospho-JNK1/2 (Thr 183/Tyr 185), phospho-p38 (Thr 180/Tyr 182) and phospho-ERK1/2 (Thr 185/Tyr 187) specific antibodies were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). SP600125 was from Promega Corporation (Madison, USA). SB203580 were from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany) and UO126 were from Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA). ROH, RA and inhibitors were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO). Solvent controls were performed for each condition.

Sertoli cells cultures

Sertoli cells were isolated as previously described [12]. Briefly, testes of 15-day-old rats were removed, decapsulated, digested enzymatically with trypsin and centrifuged at $750 \times g$ for 5 min. The pellet was mixed with soybean trypsin inhibitor, then centrifuged and incubated with collagenase, hyaluronidase and deoxyribonuclease for 30 min at 37°C . After centrifugation (10 min at $40 \times g$), the pellet was taken to isolate Sertoli cells. Cells were plated in multi-well plates (2.1×10^5 cells/cm², 80% confluence) in Medium 199, pH 7.4, 1% FBS and maintained at 37°C for 24 h to attach. The medium was then changed to serum-free medium and cells were taken for assay after 48 h of culture.

Cell proliferation assays

[Methyl-³H] thymidine incorporation was assessed as indicative of the DNA synthesis and proliferation rate in Sertoli cells [30]. At 24 h prior treatments, cells were pre-warmed with $0.5 \mu\text{Ci/mL}$ [Methyl-³H] thymidine ($248 \text{ GBq mmol}^{-1}$; Amersham, UK) in order to stabilize the intracellular nucleotide pool. Protein kinase inhibitors and antioxidants were added 30 min prior to ROH/RA incubation. At the end of 30 min, the medium was changed and a new medium containing ROH or RA was added for an additional 24 h. After treatments, $1 \mu\text{Ci/mL}$ of [methyl-³H] thymidine diluted in medium was added for an additional 12 h. To confirm that thymidine incorporation is due to DNA synthesis and not to DNA repair mechanisms, cells were treated with hydroxyurea, a potent inhibitor of DNA synthesis [31]. At the end of treatments, 3 mM hydroxyurea was incubated for an additional 2 h. After, the $1 \mu\text{Ci/mL}$ radiolabelled thymidine solution was added. Cells were washed with PBS and $500 \mu\text{l}$ TCA 10% was added. TCA insoluble pellet was collected by centrifugation ($1000 \times g$, 10 min) and resuspended in 0.1% SDS containing 1 mg/mL

bovine albumin. After, 1 mL liquid scintillant was added and incorporated radionucleotide was measured using a Packard Tri-Carb Model 3320 scintillation counter. To assess the effect of ROH/RA on cell number/growth, cells were plated in 96-well plates (1.1×10^5 cells/well). At 24 and 48 h after ROH/RA incubation, cells were trypsinized and counted in a hemocytometer.

Cell cycle analysis

After treatments, cells were harvested with trypsin-EDTA, washed twice with PBS containing 5 mM EDTA and fixed in 70% ethanol at -20°C . After pre-treatment with 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase A, cells were stained with 50 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI; Sigma) solution for at least 30 min on ice. Stained and single cells were analysed by flow cytometry (FACScalibur system, Becton and Dickinson, San Jose, CA). Ten thousand cells were analysed per sample.

SDS-PAGE and immunoblot

Proteins (20 μg) were separated by SDS-PAGE on 10% (w/v) acrylamide, 0.275% (w/v) bisacrylamide gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were then incubated in TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 1% (w/v) non-fat milk powder for 1 h at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated for 12 h with the appropriate primary antibody (dilution 1:200–1:1000). After washing in TBS-T, blots were incubated with horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies (1:10 000), 1.5 h at room temperature. Bands were detected using chemiluminescence and densitometric analysis was performed by Image-J[®] software.

Determination of intracellular RS production

Intracellular RS production was detected using 2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA [32]. This reagent enter the cells and react predominantly with highly oxidizing species of RS such as hydroxyl radicals (OH), hydroperoxides and peroxy-nitrite, thus producing the fluorophore dichlorofluorescein (DCF). Briefly, cells were seeded in 96-well plates, and 50 μM DCFH-DA dissolved in medium containing 1% FBS was added 30 min before ROH/RA incubation to allow cellular incorporation. Then, the medium was discarded and cells were treated. The DCFH oxidation was monitored at 37°C in a 96-well plate fluorescence reader with an emission wavelength set at 535 nm and an excitation wavelength set at 485 nm.

Superoxide production in submitochondrial particles

Submitochondrial particles (SMP) were obtained as previously described by Boveris [33]. Superoxide production in SMP was determined using a spectrophotometric assay based on superoxide-dependent oxidation of epinephrine to adrenochrome at 37°C (E480 nm 4.0/mm/cm). The reaction medium consisted of 230 mM mannitol, 70 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), SMP (0.3–1.0 mg protein/mL), 0.1 mM catalase and 1 mM epinephrine. Succinate (7 mM) was used as substrate. Superoxide dismutase was used at 0.1–0.3 μM final concentration to give assay specificity.

Xanthine oxidase activity

The xanthine oxidase (XOD) activity was measured spectrophotometrically at 295 nm and 37°C using xanthine as the substrate [14]. The formation of uric acid from xanthine increases the absorbance. One unit of activity was defined as 1 μmol uric acid formed per minute at 37°C and pH 7.4 and was expressed in units/mg protein.

Protein quantification

Protein contents were measured by the Lowry et al. [34] method.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD and were analysed by one-way ANOVA followed by Duncan's post-hoc test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Proliferation, cell cycle analysis and p21 levels in ROH- and RA-treated cells

Radiolabelled thymidine incorporation into DNA was assessed to measure DNA synthesis and the proliferative activity of Sertoli cells [30]. ROH and RA concentrations were chosen based on the physiologic range for these compounds which is in micromolar to ROH and in nanomolar to RA [35,36]. Results from thymidine incorporation assay showed that, at the end of 24 h treatment, 7 and 10 μM ROH significantly increased the rate of proliferation while 1–100 ηM RA presented an opposite effect by decreasing the rate of thymidine incorporation into DNA (Figure 1A). Treatment with 3 mM hydroxyurea for 2 h before thymidine incubation drastically reduced thymidine incorporation into DNA in both untreated and 7 μM ROH groups, suggesting that, in our experiments, thymidine incorporation involved DNA synthesis (Figure 1A). At 48 h after treatments,

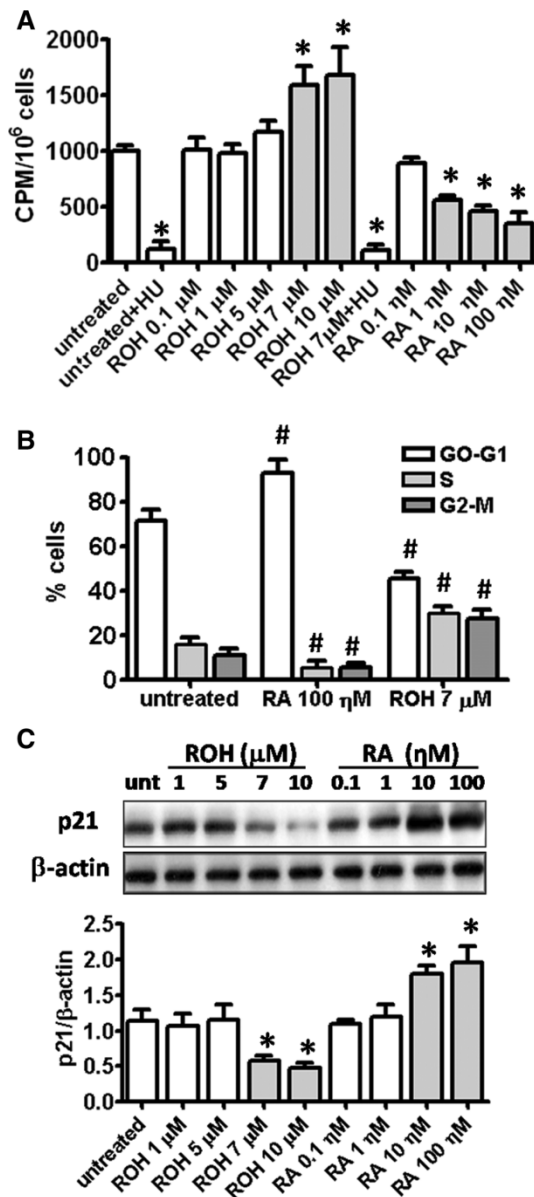


Figure 1. Cell proliferation in ROH and RA-treated Sertoli cells. Cells were treated for 24 h with different ROH and RA concentrations. (A) Radiolabelled thymidine incorporation into DNA. (B) Cells were treated with 7 μM ROH or 100 nM RA during 24 h. After, cell cycle analysis was determined by flow cytometry. (C) Representative immunoblotting with densitometry analysis of the CDK inhibitor p21 content after 24 h ROH/RA treatment. ROH, retinol; RA, retinoic acid; HU, hydroxyurea, 3 mM . Representative from three independent experiments ($n=3$). *Different from untreated cells; #different from untreated cells considering the same cell cycle phase.

cell number increased $33 \pm 5\%$ ($1.41 \pm 0.07 \times 10^5$ cells/well) in 7 μM ROH treatment compared to untreated cells ($1.05 \pm 0.06 \times 10^5$ cells/well), confirming that ROH stimulates cell growth. RA (100 nM) did not alter cell number ($1.01 \pm 0.08 \times 10^5$ cells/well). Corroborating results from cell cycle analysis showed that 7 μM ROH induced a significant increase in S phase and G2-M phase cells suggesting cell cycle progression (Figure 1B). On the other

hand, 100 nM RA increased cell number in G1-G0 phase with subsequent decrease in S and G2-M phase compared to untreated cells, suggesting suppression of proliferation (Figure 1B). No sub-G1 cells were detected in 100 nM RA. In agreement with cell proliferation assay and cell cycle analysis, immunodetection of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 showed that 7 and 10 μM ROH decreased p21 levels, while RA increased p21 after 24 h treatment (Figure 1C). These data suggest that ROH stimulated cell proliferation while RA presented an anti-proliferative effect.

ROH-induced cell proliferation is dependent on MAPKs; RA anti-proliferative effect is refractory to MAPK inhibitors

To determine whether MAPK signalling pathways are involved on ROH/RA proliferative/anti-proliferative effect, we pre-treated Sertoli cells with selective MAPK inhibitors, such as SP600125 (JNK1/2 inhibitor); SB203580 (p38 inhibitor); and UO126 (MEK1/2-ERK1/2 inhibitor) at 10 μM for 30 min prior to 7 μM ROH or 100 nM RA incubation and the rate of thymidine incorporation was assessed. After 24 h treatment, pre-treatment with JNK1/2, p38 and ERK1/2 inhibitors attenuated ROH-induced proliferation (Figure 2A). On the other hand, MAPK inhibitors did not alter RA anti-proliferative effect (Figure 2A). Besides inhibiting ROH-induced proliferation, the JNK1/2 inhibitor SP600125 also inhibited a decrease in p21 in 7 μM ROH-treated cells (Figure 2B). SB203580 (Figure 2B) and UO126 had no effect (not shown). Such as in the proliferation assay, RA effect on p21 was refractory to MAPK inhibitors.

ROH, but not RA, induces activation of MAPKs

Activation/inhibition of MAPKs is directly linked to the regulation of the cell proliferation/death [25,37,38]. Data presented in Figure 2 suggest that JNK1/2, p38 and ERK1/2 MAPKs are involved in ROH-induced proliferation, but not in RA effects. MAPK activation was assessed by Western blot with antibodies capable of recognizing phosphorylated (i.e. activated) forms of these proteins. As shown in Figure 3A, 7 μM ROH induced a rapid activation of JNK1/2, p38 and ERK1/2. The phosphorylated forms of p38 and ERK1/2 peaked between 15–30 min and decreased after 60 min incubation; JNK1/2 activation started at 15 min and continued for at least 60 min after ROH treatment (Figure 3A). In contrast, 100 nM RA did not present any effect upon JNK1/2, p38 or ERK1/2 phosphorylation (Figure 3A). Thus, a 15-min incubation period was used for subsequent experiments. We also tested the effect of different ROH concentrations on MAPKs phosphorylation (Figure 3B). JNK1/2 and ERK1/2 phosphorylation were

stimulated from 5 μM ROH in a dose-dependent manner up to 10 μM . Phosphorylation of p38 was detected from 7 μM ROH. The incubation with an antibody that recognizes total JNK1/2, p38 or ERK1/2 proteins (i.e. phosphorylated plus non-phosphorylated forms) confirmed that ROH treatment specifically increased MAPK phosphorylation but did not alter its total immunoccontent at 15 min incubation (not shown).

The rapid (few minutes) activation of MAPKs by ROH suggest a mechanism different from RAR/RXR nuclear receptor-mediated gene transactivation and subsequent new protein synthesis, which in general takes hours or even days [39]. In fact, pre-incubation with a general inhibitor of the protein synthesis

cycloheximide (CHX 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min prior to 7 μM ROH incubation did not alter the pattern of the ROH-induced JNK1/2, ERK1/2 and p38 phosphorylation, suggesting that *de novo* protein synthesis is not required for activation of these kinases (Figure 3C).

ROH, but not RA, increases RS production

Previous works from our group reported that ROH induces oxidative damage to proteins, lipids and

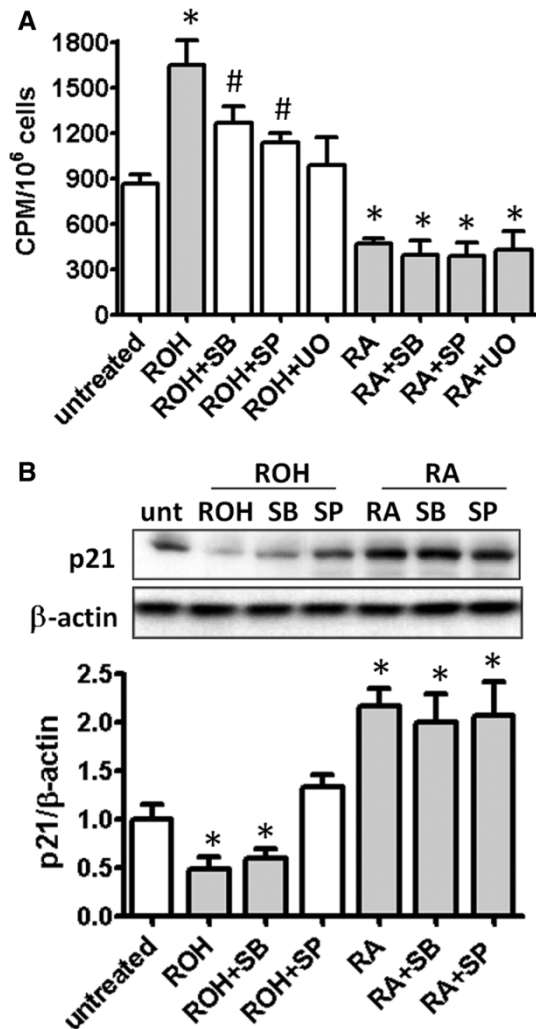


Figure 2. MAPKs mediate ROH-induced cell proliferation. (A) Radiolabelled thymidine incorporation in 7 μM ROH and 100 ηM RA-treated Sertoli cells in the presence or absence of the JNK1/2, p38 or ERK1/2 inhibitors. (B) Representative immunoblotting showing p21 protein after 24 h treatment with 7 μM ROH or 100 ηM RA in the presence of MAPKs inhibitors. Inhibitors were added 30 min prior ROH or RA. SP, SP600125, JNK1/2 inhibitor; SB, SB203580, p38 inhibitor; UO, UO126, MEK1/2-ERK1/2 inhibitor. Data from three independent experiments ($n=3$). *Different from untreated cells; #different from untreated and from ROH-treated cells.

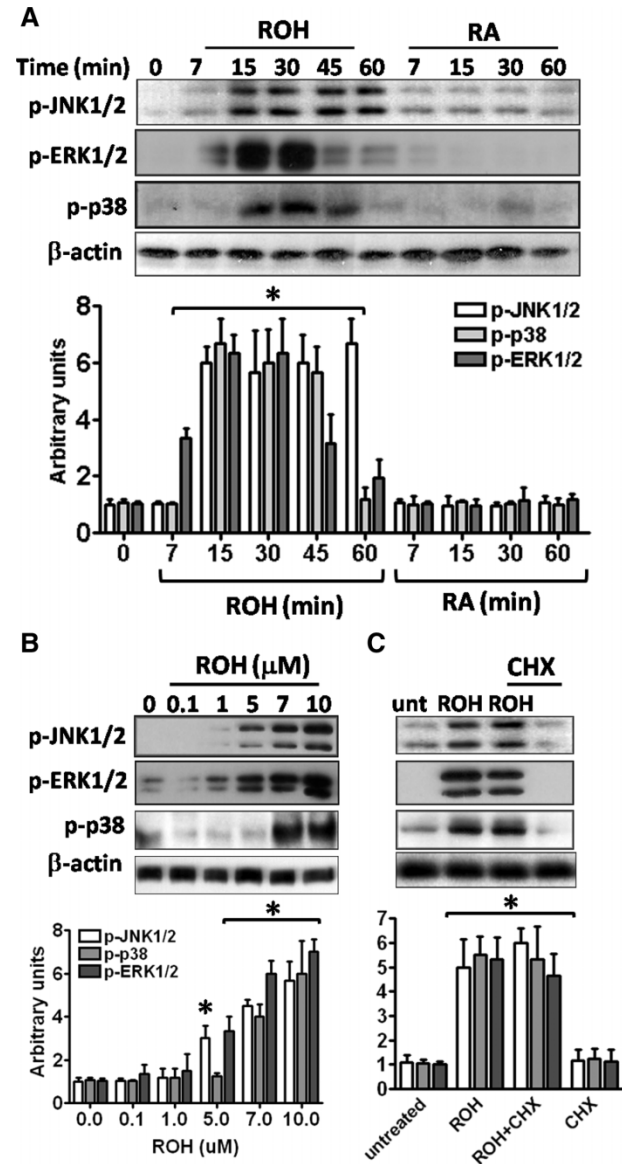


Figure 3. Phosphorylation of JNK1/2, p38 and ERK1/2 in ROH and RA-treated cells. (A) Cells were incubated for different times (min) with 7 μM ROH or 100 ηM RA and phosphorylated forms (i.e. activated forms) of JNK1/2, ERK1/2 and p38 were detected by Western blotting with specific antibodies as described in Materials and methods. (B) Effect of different ROH concentrations (μM) on MAPK phosphorylation at 15 min incubation. (C) Effect of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on 7 μM ROH-elicited MAPK activation. unt, untreated cells. Representative immunoblots from three independent experiments ($n=3$). *Different from untreated cells.

DNA [12,15–17]. Since MAPK pathways are known to be activated by pro-oxidant agents [25], we decided to evaluate the possible involvement of RS on ROH-induced JNK1/2, p38 and ERK1/2 phosphorylation. Consistent with the time-course effect of ROH upon MAPKs, the DCF assay showed that ROH induces a rapid and dose-dependent increase in RS during the first 6 h incubation (Figure 4A). The increase in RS was observed between 7–20 μM ROH (Figure 4A). In contrast, RA treatment did not increase RS production at any tested concentration (Figure 4B). Pre-treatment with a RS scavenger, the alpha-tocopherol analogue Trolox (50 μM), blocked 7 μM ROH-induced RS production (Figure 5A).

RS scavenger pre-treatment blocks ROH-induced MAPK activation, cell proliferation and p21 suppression

To assess the involvement of RS on ROH-induced MAPK activation, cells were pre-treated with 50 μM Trolox for 30 min prior to 7 μM ROH incubation and MAPKs phosphorylation was determined (Figure 5B). Besides inhibiting RS production (Figure 5A), Trolox also blocked ROH-induced JNK1/2, p38 and ERK1/2 phosphorylation (Figure 5B). In addition, Trolox inhibited ROH-induced cell proliferation as assessed by thymidine incorporation assay. However, the anti-proliferative effect of RA was refractory to

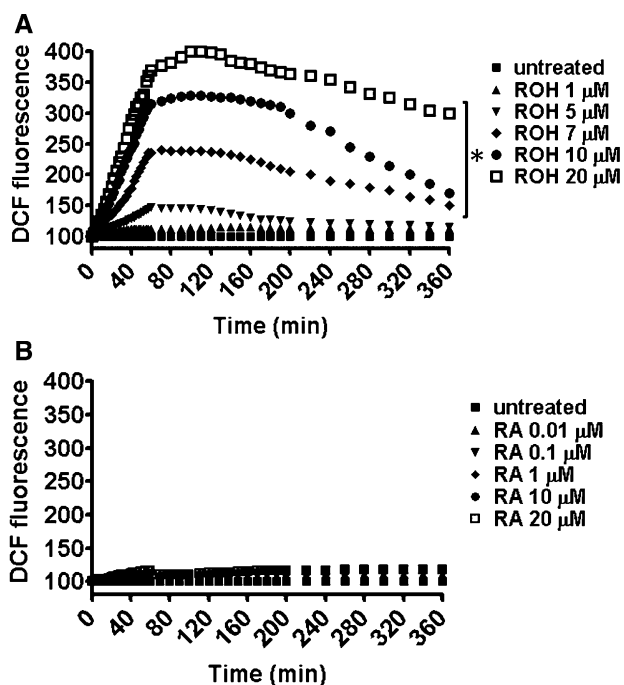


Figure 4. ROH, but not RA, induces RS production in Sertoli cells. Representative time-course effect of different concentrations of ROH (A) and RA (B) on RS production. Cells were pre-incubated for 30 min with 50 μM DCFH-DA to allow cell incorporation; after ROH or RA was added, and DCF fluorescence was monitored for 6 h in a microplate fluorescence reader. ROH lanes, different concentration of retinol, μM ; RA lanes, different concentrations of retinoic acid, μM . *Different from untreated cells.

Trolox pre-treatment (Figure 5C). Trolox also inhibited the decrease in p21 in ROH-treated cells, but did not alter RA-induced p21 protein (Figure 5D). These results altogether suggest that ROH induces redox-dependent activation of MAPKs and p21 suppression inducing cell proliferation, which were not observed in RA-treated cells.

Mitochondria and xanthine oxidase are involved on ROH-induced RS production

Next, in order to clarify the precise source of RS in ROH treated cells, the effect of some RS-generating enzyme inhibitors was investigated. Allopurinol (the inhibitor of xanthine oxidase, 100 μM) and rotenone (the inhibitor of mitochondrial electron transport chain complex I, 10 μM) significantly decreased ROH-induced RS generation. ROH-induced RS was unaffected by DPI (the inhibitor of the NADPH oxidase, 100 μM) (Figure 6A). Rotenone (Rot) inhibitory effects on RS occurred at early times of incubation (few minutes) compared to allopurinol (Allop). Inhibitory effects of allopurinol on RS production were detected only after 3 h incubation with ROH (Figure 6A). These results suggest that xanthine oxidase and mitochondrial electron transport chain may act as the primary sites for the generation of RS by ROH in Sertoli cells. In addition, submitochondrial particles (SMP) isolated after 1–6 h of 7 μM ROH treatment presented a significant increase in the rate of superoxide production compared to untreated cells, suggesting that ROH lead to impairment on electron transfer system (Figure 6B). Consistent with the time course effect of allopurinol on RS production, xanthine oxidase (XOD) activities are increased only after 3 and 6 h of 7 μM ROH incubation (Figure 6C). In addition, it was tested whether these inhibitors could prevent the ROH-induced MAPKs activation. Only the pre-treatment with 10 μM rotenone inhibited ROH-induced p38, JNK1/2 and ERK1/2 activation allopurinol presented any inhibitory effect (Figure 6D).

Discussion

Although vitamin A (ROH) is accepted as essential for various vital cellular processes, its ability to act as a pro-oxidant factor has been neglected. We and others have postulated that retinoids might induce oxidative stress in biological systems [8–21]. For example, incubation of Sertoli cells with ROH induces antioxidant enzymes activation, increases lipoperoxidation and DNA damage; besides, it induces chromatin sensitivity to DNase I, ornithine decarboxylase activation, HMG dephosphorylation and phosphorylation of the H3 histone, which are important markers of entry into the S phase of cell cycle [12,15–17,40]. In the herein presented work,

we demonstrate that ROH, through redox signalling, caused the switch of cell cycle from a low-proliferative to a proliferative condition. The proliferative effect of ROH was dependent on redox-sensitive activation of JNK1/2, p38 and ERK1/2 which was not observed in RA-treated cells. ROH mitogenic signalling was accompanied by a RS and JNK1/2-dependent decrease in the CDK inhibitor p21, which is considered a classical inhibitor of cell cycle entry into S phase by maintaining cells in G1-G0 [41,42]. ROH not only decreased p21, but also increased the cell number in S and G2-M phase and the rate of DNA synthesis in a mechanism mediated by RS. Interestingly, ROH-induced proliferation was observed with the administration of 7 and 10 μM ROH, which were able to increase RS. ROH concentrations between 1–5 μM —which are considered to be within the physiological range for Sertoli cells [36]—increased neither RS production nor proliferation. Murata and Kawanishi

[43] demonstrated that even lower ROH concentrations (2–5 μM) could induce DNA oxidative damage in HL-60 cells. Allen and Haskell [44] suggested that a serum ROH concentration of 3.5 μM is associated with vitamin A toxicity in infants. These data suggest the importance of keeping ROH status within the physiological range, since slight variations in the ROH levels may trigger important changes in the cellular redox state.

On the other hand, the ROH structurally related compound RA did not present any pro-oxidant effect in the physiological (0.1–10 ηM) or supra-physiological concentrations tested (100 ηM to 20 μM) [45]. Previous studies showed that only RA precursors as ROH and retinaldehyde presented pro-oxidant effects in fibroblasts and PC-12 cells [9,10]. Our data show cell differentiation events in RA-treated cells [29,41]. Particularly in Sertoli cells physiology, the decrease in cell proliferation coupled with an

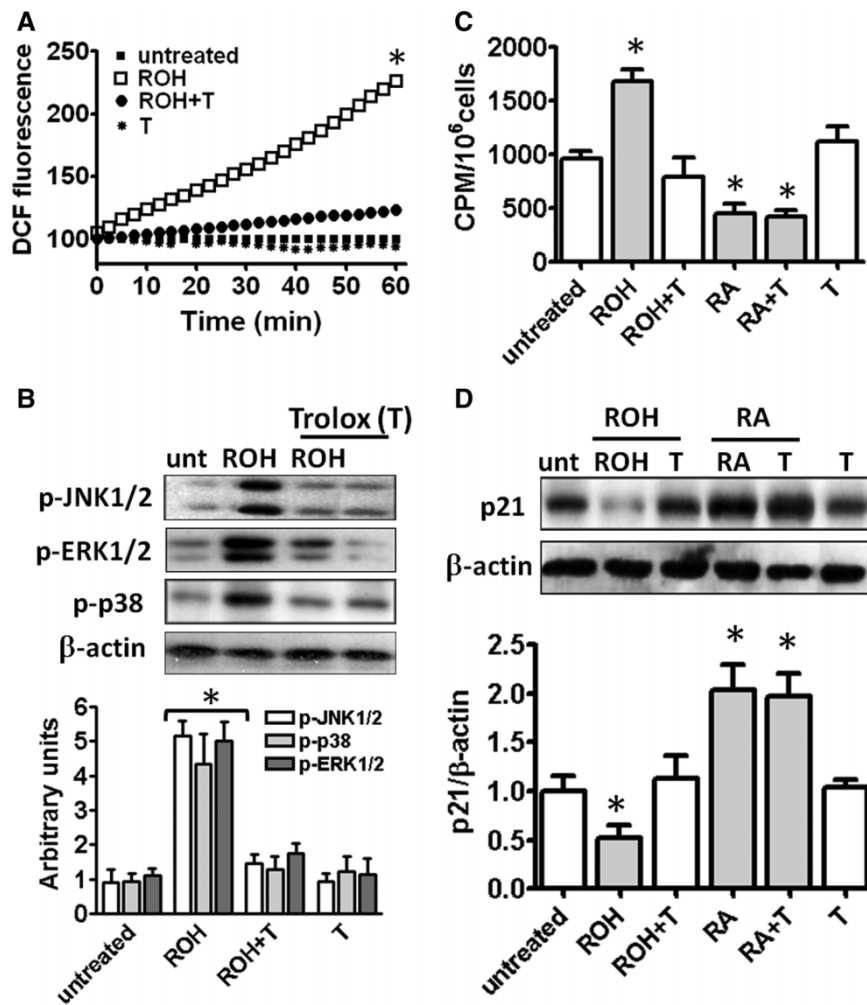


Figure 5. RS scavenger treatment inhibits ROH-induced RS production, MAPK activation, cell proliferation and p21^{WAF1/CIP1} suppression. RA effects are refractory to RS scavenger. (A) Cells were pre-treated with 50 μM Trolox 30 min prior 7 μM ROH incubation and DCFH oxidation was monitored during 1 h. (B) Trolox pre-treatment inhibited ROH-elicited MAPKs phosphorylation. (C) ROH-induced proliferation and RA anti-proliferative effect in the presence of Trolox. Cells were treated with ROH or RA for 24 h and radiolabelled thymidine incorporation into DNA was assessed. (D) Representative immunoblotting showing the effect of Trolox pre-treatment on p21 levels in 7 μM ROH or 100 ηM RA-treated cells. ROH, 7 μM retinol; RA, 100 ηM retinoic acid; T, 50 μM Trolox. Representative from four independent experiments ($n=4$). *Different from untreated cells.

increase in p21 levels—which occurred in RA-treated cells—are considered classical markers of the entry on differentiation phase [29,41]. RA positively induced p21, decreased DNA synthesis and increased cell number in G0–G1 in a way independent on RS or MAPKs. In this way, a RA genomic effect (e.g. RA binding on its nuclear receptors leading to gene transcription) leading to p21 gene induction has been accepted as a major mechanism of the RA-induced differentiation in diverse cell types [41,42,46].

Genomic actions of retinoids are mediated by two classes of nuclear receptors, RARs and RXRs [47,48]. Retinoid receptors are considered as ligand-regulated transcription factors, acting through binding to promoters of target genes and leading to changes in gene

expression. These genomic actions of Vitamin A usually take hours or even days [39,48]. Recently, extra-nuclear mechanisms of signal transduction by retinoids have been reported [39,49]. These non-classical actions are rapid and do not rely on RAR/RXR-mediated gene transcription and new protein synthesis. Aggarwal et al. reported that retinoids induce CREB phosphorylation through a rapid stimulation of PKC and ERK1/2 in cells with silenced RAR/RXR [39]. In addition, ROH may act directly on the modulation of different PKC isoforms and modulate c-Raf activities [49]. Our data support that a rapid and extra-nuclear effect of ROH upon MAPK pathways plays a role in understanding ROH and RA differential effects on cell proliferation in Sertoli cells. ROH-induced MAPKs phosphorylation occurred in

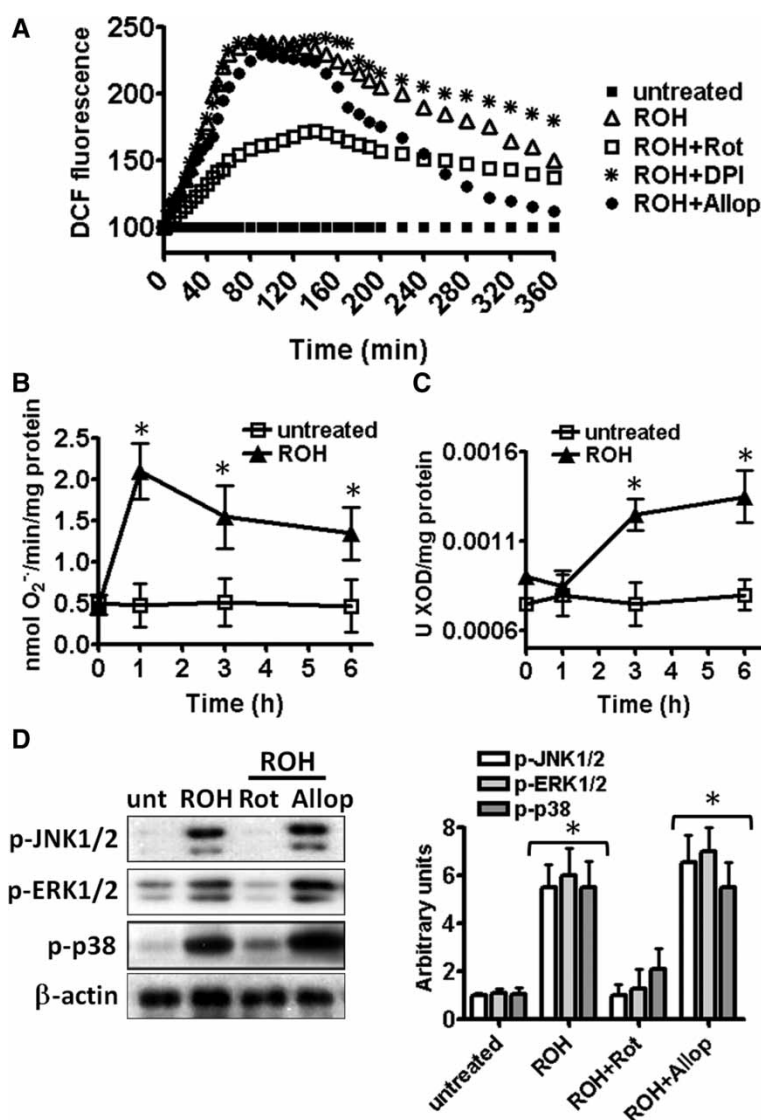


Figure 6. Mitochondria and xanthine oxidase mediate RS production in ROH-treated cells. (A) Representative DCF assay showing the effect of NADPH oxidase inhibitor (DPI), xanthine oxidase inhibitor (allopurinol), and electron chain transport inhibitor (rotenone) pre-treatment on 7 μM ROH-induced RS production. (B) Increased production of superoxide radical by submitochondrial particles isolated from cells treated with 7 μM ROH. (C) Xanthine oxidase (XOD) activity in 7 μM ROH-treated cells. (D) The effect of 10 μM rotenone or 100 μM allopurinol pre-treatment on ROH-induced MAPKs phosphorylation. DPI, diphenylene iodonium 100 μM ; allo, allopurinol 100 μM ; Rot, rotenone 10 μM . Data from three independent experiments ($n=3$). *Different from untreated cells.

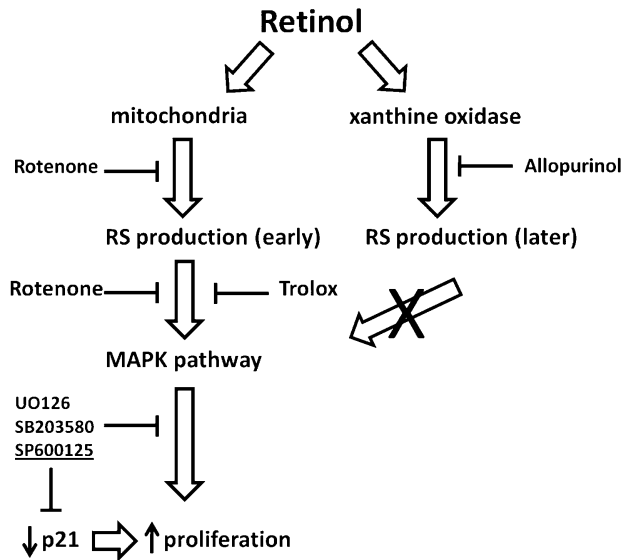


Figure 7. Proposed mechanism for the ROH-induced proliferation in Sertoli cells. ROH generates RS by modulating the mitochondrial electron transport system (early RS production, few minutes) and xanthine oxidase (later RS production, 3 h treatment). However, only the RS produced in mitochondria play a role in ROH-induced proliferation by stimulating MAPK pathways and by modulating cell cycle regulators as the CDK inhibitor p21^{WAF1/CIP1}.

as little as 15 min after ROH incubation, implying that the time frame is too short to trigger retinoid receptor-mediated genetic activation through transcription and translation. In addition, the data suggest that ROH effects upon MAPKs are dependent on its ability to increase RS, since the RS scavenger Trolox blocked both RS production and MAPKs activation. On the other hand, RA increased neither RS production nor MAPKs phosphorylation and its anti-proliferative effect was refractory to MAPK inhibitors.

Mitochondria-generated RS has been described as a major mechanism of the redox-stimulation of MAPKs [25,50]. In our model, ROH-induced RS formation and MAPKs activation were inhibited by rotenone, suggesting that a mitochondrial electron transfer system is involved in ROH redox signalling. The increased superoxide formation in isolated SMP suggests that ROH promotes dysfunctions in the electron transfer system, thus increasing the rate of superoxide formation. Corroborating, we previously reported superoxide over-production in liver isolated mitochondria incubated with ROH [21] and in SMP isolated from ROH supplemented rats [19]. Moreover, data presented here showed that xanthine oxidase plays a role in RS production, although only rotenone inhibited ROH-induced MAPKs activation. It possibly occurred since ROH-induced xanthine oxidase activation occurred at later time points (3 h) compared to the early mitochondria-mediated RS production and MAPKs activation (15 min).

In conclusion, ROH generates RS by modulating the mitochondrial electron transport system and

xanthine oxidase activity. The RS produced in mitochondria play important roles in ROH-induced proliferation and cell cycle progression by activating MAPK pathways (Figure 7). Previous data [6–26] and data presented here are concerned that pharmacological amounts of ROH may perturb physiological processes leading to RS production and modulation of redox sensitive pathways. Although the consequences of this redox-signalling may vary in different cell types, these data reinforce the necessity of a better understanding of the redox and non-classical actions of vitamin A upon biological systems.

Acknowledgements

We acknowledge the Brazilian funds CAPES, CNPq, FAPERGS and PROPESQ/UFRGS.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Blomhoff R. Vitamin A in health and disease. New York: Marcel Dekker; 1994.
- [2] Kuratomi Y, Kumamoto Y, Yamashita H, Yamamoto T, Inokuchi A, Tomita K. Comparison of survival rates of patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy, 5-fluorouracil and vitamin A ('FAR' therapy) vs FAR therapy plus adjunctive cisplatin and peplomycin chemotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;256:S60–S63.
- [3] Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi Y, Muto H, Friedman SL, Moriwaki H. Retinoids in cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4: 285–298.
- [4] Dragnev KH, Petty WJ, Dmitrovsky E. Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S150–S156.
- [5] Omenn GS. Chemoprevention of lung cancers: lessons from CARET, the beta-carotene and retinol efficiency trial, and prospects for the future. *Eur J Cancer Prev* 2007;16:184–191.
- [6] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Lund B, Metch B, Gyllys-Colwell I. The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. *Cancer Res* 1994;54:2038s–2043s.
- [7] Penniston KL, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 2006;83:191–201.
- [8] Gelain DP, Moreira JC, Bevilacqua LR, Dickson PW, Dunkley PR. Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 2007;103: 2369–2379.
- [9] Gelain DP, Moreira JCF. Evidence of increased reactive species formation by retinol, but not retinoic acid, in PC12 cells. *Toxicol in Vitro* 2008;22:553–558.
- [10] Gimeno A, Zaragoza R, Vivo-Sese I, Viña JR, Miralles VJ. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 2004;13:45–54.

- [11] Dal-Pizzol F, Klamt F, Dalmolin RJ, Bernard EA, Moreira JC. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated Sertoli cells. *Free Radic Res* 2001;35:749–755.
- [12] Klamt F, Dal-Pizzol F, Rohers R, Oliveira RB, Dalmolin RJS, Henriques JAP, Andrades HHR, Ramos ALLP, Moreira JCF. Genotoxicity, recombinogenicity and preneoplastic transformation induced by Vitamin A supplementation. *Mutat Res* 2003;539:117–125.
- [13] Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, de Oliveira RB, Dal-Pizzol F, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Moreira JC. Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. *Cell Signal* 2006;18:1685–1694.
- [14] Zanotto-Filho A, Schroder R, Moreira JC. Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells. *Free Radic Res* 2008;42:593–601.
- [15] Klamt F, Dal-Pizzol F, Bernard EA, Moreira JC. Enhanced UV-mediated free radical generation. DNA and mitochondrial damage caused by retinol supplementation. *Photochem Photobiol* 2003;2:856–860.
- [16] Dal-Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, Bernard EA, Moreira JC. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Free Radic Res* 2001;34:395–404.
- [17] Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML, Moraes LF, Moreira JC, Benfato MS. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Radic Res* 2000;33:677–687.
- [18] De Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JCF. Therapeutic vitamin A doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation. *Neurochem Res* 2008;33:378–383.
- [19] De Oliveira MR, Moreira JCF. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. *Toxicol Lett* 2007;173:145–150.
- [20] De Oliveira MR, de Bittencourt Pasquali MA, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JC. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain Res* 2007;1169:112–119.
- [21] Klamt F, Roberto de Oliveira M, Moreira JC. Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2005;1726:14–20.
- [22] Njar VC, Gediya L, Purushottamachar P, Chopra P, Vasaitis TS, Khandelwal A, Mehta J, Huynh C, Belosay A, Patel J. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg Med Chem* 2006;14:4323–4340.
- [23] Greenwald P, Anderson N, Nelson SA, Taylor PR. Clinical trials of vitamin and mineral supplements for cancer chemoprevention. *Am J Clin Nutr* 2006;85:314S–317S.
- [24] Ono K, Yamada M. Vitamin A potentially destabilizes preformed alphasynuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* 2007;25:446–454.
- [25] Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- κ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal* 2006;18:2238–2251.
- [26] Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* 2006;147:96–110.
- [27] Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 2002;124:173–180.
- [28] Jégou B, Sharpe RM. Paracrine mechanisms in testicular control. In: D Kestner, editor. *Molecular biology of the male reproductive system*. San Diego: Academic Press; 1999. p 271–310.
- [29] Holsberger DR, Buchold GM, Leal MC, Kiesewetter SE, O'Brien DA, Hess RA, França LR, Kiyokawa H, Cooke PS. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod* 2005;72:1429–1436.
- [30] Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS, Lazari MF. 17 β -estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat sertoli cells. *Biol Reprod* 2008;78:101–104.
- [31] Henley D, Isbill M, Fernando R, Foster JS, Wimalasena J. Paclitaxel induced apoptosis in breast cancer cells requires cell cycle transit but not Cdc2 activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:235–249.
- [32] Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612–616.
- [33] Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 1994;105:429–435.
- [34] Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- [35] Napoli J. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:S52–S62.
- [36] Ross AC. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J* 1993;7:317–327.
- [37] Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:211–218.
- [38] Rennefahrt U, Janakiraman M, Ollinger R, Troppmair J. Stress kinase signaling in cancer: fact or fiction? *Cancer Lett* 2005;217:1–9.
- [39] Aggarwal S, Kim SW, Cheon K, Tabassam FH, Yoon JH, Koo JS. Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:566–575.
- [40] Moreira JC, Dal-Pizzol F, Rocha AB, Klamt F, Ribeiro NC, Ferreira CJ, Bernard EA. Retinol-induced changes in the phosphorylation levels of histones and high mobility group proteins from Sertoli cells. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:287–293.
- [41] Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 2003;144:3722–3731.
- [42] Liu M, Lavarone A, Freedman LP. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* 1996;271:31723–31728.
- [43] Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 2000;275:2003–2008.
- [44] Allen LH, Haskell M. Estimating the potential for vitamin A toxicity in women and young children. *J Nutr* 2002;132:2907S–2919S.
- [45] Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. *The retinoids: Biology, chemistry and medicine*, 2nd ed. New York: Raven Press; 1994.
- [46] Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:793–810.

- [47] Kurlandsky SB, Xiao JH, Duell EA, Voorhees JJ, Fisher GJ. Biological activity of all-trans retinol requires metabolic conversion to all-trans retinoic acid and is mediated through activation of nuclear retinoid receptors in human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994;269:32821–32827.
- [48] Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:950–964.
- [49] Hoyos B, Imam A, Chua R, Swenson C, Tong G-X, Levi E, Noy N, Hämmerling U. The cysteine-rich regions of the regulatory domains of Raf and protein kinase C as retinoid receptor. *J Exp Med* 2000;192:835–845.
- [50] Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2004;15:768–784.

Capítulo II

“Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects
in cultured Sertoli cells”

Artigo publicado no periódico Free Radical Research, volume 42(6), p. 593-601 (2008).

This article was downloaded by:[Zanotto-Filho, Alfeu]
On: 13 June 2008
Access Details: [subscription number 794016159]
Publisher: Informa Healthcare
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954
Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Free Radical Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713642632>

Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells

Alfeu Zanotto-Filho^a; Rafael Schröder^a; José Cláudio F. Moreira^a

^a Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Online Publication Date: 01 January 2008

To cite this Article: Zanotto-Filho, Alfeu, Schröder, Rafael and Moreira, José Cláudio F. (2008) 'Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells', Free Radical Research, 42:6, 593 — 601

To link to this article: DOI: 10.1080/10715760802144422
URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10715760802144422>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article maybe used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells

ALFEU ZANOTTO-FILHO, RAFAEL SCHRÖDER, & JOSÉ CLÁUDIO F. MOREIRA

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Accepted by Professor H. Poulsen

(Received 10 March 2008; in revised form 16 April 2008)

Abstract

Several studies have suggested that vitamin A (retinol, ROH) presents pro-oxidant properties in biological systems. Recent studies point out that xanthine oxidase, a ROS-generating enzyme, catalyses ROH oxidation to RA *in vitro*. These works stimulated the authors to investigate whether xanthine oxidase could be involved on the ROH pro-oxidative effects reported in cultured Sertoli cells. *In vitro*, it was demonstrated that xanthine oxidase generates superoxide in the presence of ROH as assessed by superoxide mediated-NBT reduction. Superoxide production is potentiated in the presence of NADH and inhibited by allopurinol. In Sertoli cells, ROH treatment increased xanthine oxidase activity and inhibition of the enzyme with allopurinol attenuated ROH-induced ROS production, protein damage and cytotoxicity. Moreover, inhibition of ROH oxidation to RA by retinaldehyde dehydrogenase inhibitor potentiated both xanthine oxidase-dependent ROS production and cell damage in ROH-treated cells. The data show that xanthine oxidase may play a role on vitamin A pro-oxidant effects.

Keywords: *Retinol, xanthine oxidase, ROS production.*

Introduction

The recently published observation that xanthine oxidase is capable of converting ROH (retinol) to RAL (retinaldehyde) and RAL to RA (retinoic acid) [1,2] should be taken into account, not only because the enzyme catalyses the oxidation of an alcohol to the respective acid, but also because the alcohol involved is ROH and the produced acid is RA which is a major regulator of cell proliferation, differentiation and morphogenesis [3,4]. Nonetheless, it has been well established that xanthine oxidase in the presence of the substrates hypoxanthine and xanthine reduces molecular oxygen to form superoxide anion and hydrogen peroxide [5]. In biological systems, the reactive oxygen species (ROS) produced by xanthine oxidase could in turn react with proteins, cell

membranes and DNA causing cellular injury. Xanthine oxidase reaction has been shown to be a central mechanism of the oxidative cellular damage in post-ischemic tissues, playing a key role in the pathophysiology of myocardial infarct, stroke and exercise injury [5,6].

In spite of being one of the first vitamins to be discovered, the full range of biological activities mediated by vitamin A (ROH) remains to be better elucidated. A growing body of evidence has been suggesting that ROH and other retinoid derivatives have pro-oxidant properties, which might lead to cell oxidative damage, neoplastic transformation and/or cell death [7–9]. We have described that ROH treatment induces ROS production, lipoperoxidation, protein oxidative modifications and DNA damage in

Correspondence: Msc Alfeu Zanotto Filho, Depto Bioquímica (ICBS-UFRGS); Rua Ramiro Barcelos, 2600/Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Email: ohalceu@yahoo.com.br

Sertoli, chromaffin and PC12 cells [10–21]. Moreover, we recently reported that both acute (3-days) and chronic (28-days) supplementation with retinol palmitate (ROH-palmitate) increase lipid peroxidation, protein damage and mitochondrial dysfunction in cerebral cortex, striatum, hippocampus and substantia nigra which were accompanied by anxiety-like behaviour and decreased locomotion in Wistar rats [22–25]. In this view, redox-active properties of ROH and other retinoids need to be better investigated since the mechanisms underlying ROH-induced ROS production and cellular oxidative damage are still unclear and diverse vitamin A supplementation protocols are currently used as ‘antioxidant therapies’ in individuals without vitamin deficiency [7–9].

In particular, the recently reported ability of the xanthine oxidase to metabolize ROH to RA *in vitro* [1,2], the well described involvement of the enzyme as a source of superoxide and hydrogen peroxide [3,4] and our previous results showing that ROH (a xanthine oxidase substrate) induces ROS production in biological systems [10–25] stimulated us to investigate the involvement of xanthine oxidase on ROH-induced ROS production and oxidative damage in cultured Sertoli cells, a well characterized model to study both physiological as well as pro-oxidant actions of ROH [13–21]. Data presented in this work showed that *in vitro* incubation of milk purified xanthine oxidase with ROH generates superoxide anion at a rate comparable to xanthine, a classical xanthine oxidase substrate. The rate of superoxide anion production was enhanced in the presence of NADH and was inhibited by allopurinol, a well described xanthine oxidase inhibitor. In Sertoli cells, the pre-treatment with the xanthine oxidase inhibitor attenuated ROH-elicited ROS production, protein damage and cytotoxicity. Inhibition of the ROH oxidation to RA by the retinaldehyde dehydrogenase inhibitor citral increased the rate of the allopurinol-inhibited ROS production by xanthine oxidase reaction. Data presented here show evidence that xanthine oxidase-dependent ROS production may be involved in Vitamin A pro-oxidant effects observed in previous studies from our group and others.

Materials and methods

Materials

Type I collagenase, medium 199, HBSS, all trans-retinol (t-ROH), xanthine, milk xanthine oxidase (EC 1.1.3.22), allopurinol (4-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine), NBT (nitrotetrazolium blue chloride), MTT (3-(4,5-dimethyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and Tween-20, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Trypsin was purchased from Difco (Detroit, MI). NADH disodium salt was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Tissue culture reagents were from Sigma Chemical Co. and were of analytical or tissue culture grade.

Xanthine oxidase and ROH solution preparation

Milk xanthine oxidase from Sigma (22 U/mL) was 10-times diluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1 mM EDTA as described [1]. After, the sample was dialysed against the same buffer (1 L) for 6 h to remove ammonium sulphate and sodium salicylate. Xanthine oxidase activity was determined by measuring the rate of oxidation of xanthine to uric acid spectrophotometrically at 295 nm, using an absorption coefficient of $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [26]. Assays were performed at 37°C in air-saturated Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 100 μM xanthine. ROH solution was freshly prepared in DMSO, in the dark to minimize photo-oxidation, and the concentration was determined spectrophotometrically at 325 nm, using an absorption coefficient of $52.77 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. For *in vitro* superoxide production assay, ROH solutions were diluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1 mM EDTA and 0.012 mM Tween 20.

In vitro assays for xanthine oxidase-mediated superoxide production, NADH consumption and ROH effect on uric acid formation

Superoxide generation in xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation was determined spectrophotometrically by monitoring superoxide-dependent NBT reduction to the blue chromogen formazan at 560 nm in the presence of different ROH concentrations [27]. Briefly, a 180 μl mixture of 0.1 mM NBT and 0.02 units/mL xanthine oxidase in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.012 mM Tween 20 and 1 mM EDTA was warmed at 37°C. Then, 20 μl of a 10-fold concentrated ROH solution was added to a final volume of 200 μl and NBT reduction was monitored for 1 h with 2 min intervals in a 96-well microplate reader. The rate of superoxide formation was calculated assuming a NBT absorption coefficient of $12.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 560 nm [27]. In some assays, NADH or/and allopurinol were added to the incubation.

NADH consumption by xanthine oxidase reaction was monitored by the decrease of the absorption at 340 nm in the same buffer above described in the absence of NBT. The rate of NADH oxidation to NAD was calculated using an absorption coefficient of $6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm. In addition, one enzyme assay was performed for the study of the inhibitory effect of ROH on uric acid formation from xanthine. Uric acid formation was determined by

measuring the rate of 10 μM xanthine oxidation by xanthine oxidase (final concentration of 0.02 U/mL) in the presence or absence of ROH, using an absorption coefficient of 9.6 $\text{mm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 295 nm [26].

Sertoli cells isolation and cultures

Sertoli cells were isolated as previously described [13]. Briefly, testes of 15-day-old rats were removed, decapsulated and digested enzymatically with trypsin for 30 min at 37°C and centrifuged at 750 \times g for 5 min. The pellet was mixed with soybean trypsin inhibitor, then centrifuged and incubated with collagenase, hyaluronidase and deoxyribonuclease for 30 min at 37°C. After incubation, this fraction was centrifuged (10 min at 40 \times g). The pellet was taken to isolate Sertoli cells and the supernatant containing peritubular and germ cells was discarded. After counting, Sertoli cells were plated in multi-well plates (3×10^5 cells/cm²) in Medium 199 pH 7.4, 1% FBS, and maintained in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 34°C for 24 h to attach. The medium was then changed to serum-free medium and cells were taken for assay after 48 h of culture.

Determination of intracellular ROS production

Intracellular ROS production was detected using 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA [28]. This reagent is known to enter the cells and react with ROS producing the fluorophore dichlorofluorescein (DCF). This method has been used to monitoring xanthine oxidase-dependent ROS production in cell culture models [29]. Briefly, 6×10^4 cells were seeded in 96-well plates and treated with ROH or ROH plus co-treatments as described above. Before incubations, 100 μM DCFH-DA dissolved in medium containing 1% FBS was added to the cell culture and incubated for 30 min to allow cellular incorporation. After, the medium was discarded and DCF fluorescence was read at 37°C during 24 h with 6 h intervals with an emission wavelength set at 535 nm and an excitation wavelength set at 485 nm in a 96-well plate fluorescence reader (model F2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). ROS production was estimated by measuring the rate of DCF fluorescence (Δ DCF fluorescence/hour) over 24 h.

Xanthine oxidase activity

The xanthine oxidase activity was measured spectrophotometrically at 295 nm and 37°C using xanthine as the substrate [30]. The formation of uric acid from xanthine increases the absorbance. One unit of activity was defined as 1 μmol uric acid formed per minute at 37°C and pH 7.4 and was expressed in units/mg protein.

Measurement of protein carbonyl groups

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described [25]. At the end of ROH treatment, cells were scraped and proteins were precipitated by the addition of 20% TCA, redissolved in 10 mM DNPH and the absorbance was read in a spectrophotometer at 370 nm. Results were calculated using an absorption coefficient of 22 $\text{mm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 370 nm; data were expressed as nmol carbonyl/mg protein.

MTT assay

Cell viability was estimated by the quantification of the MTT reduction to a blue formazan product by cellular dehydrogenases [11]. At the end of treatments, the medium was discarded and a new medium containing 0.5 mg/mL MTT was added. The cells were incubated for an additional 30 min at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. After, medium was removed, cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and DMSO was added for 10 min. Formazan salt formation was determined at 560 nm. Hydrogen peroxide (200 μM) was used as positive control for cell death. Data were expressed as percentage of the formazan formation in the untreated cells.

Protein quantification

Protein contents of each sample were measured as described by Lowry et al. [31] for data normalization.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard error (SE) and were analysed by one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results

In vitro superoxide formation by xanthine oxidase in the presence of ROH

Purified xanthine oxidase incubated with increasing ROH concentrations was able to produce superoxide anion, which was measured by the rate of NBT reduction *in vitro*. We observed that xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation increased significantly superoxide production from 1 μM ROH and a dose-dependent effect was observed up to 100 μM (Figure 1A). Retinoic acid (RA), which was described as a final product of ROH oxidation by the enzyme [1,2], did not induce superoxide formation (Figure 1A). In Figure 1A we include a positive control showing the

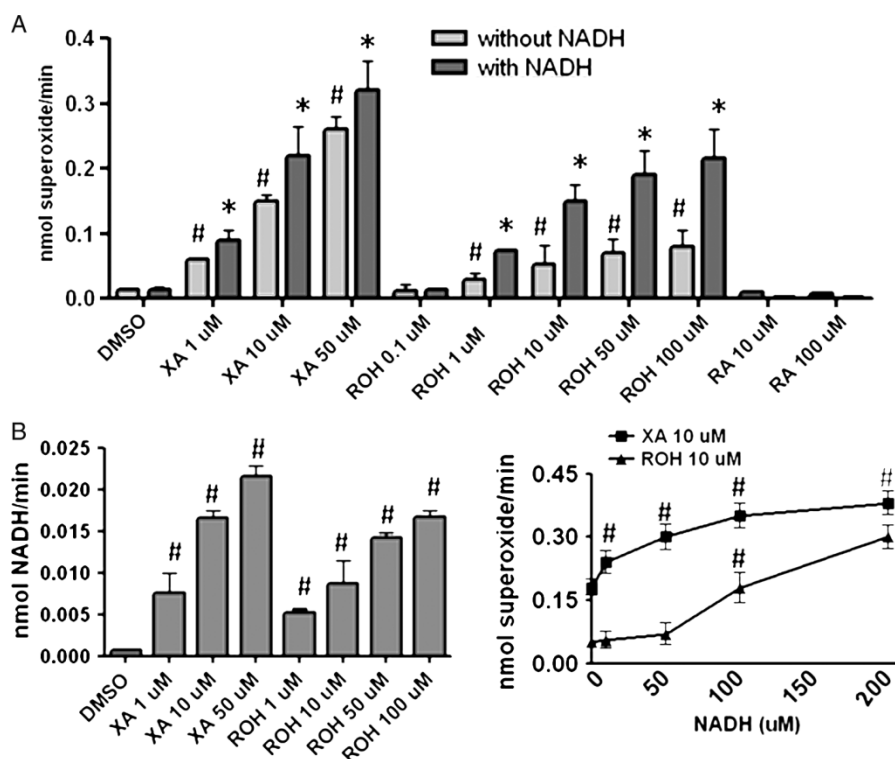


Figure 1. *In vitro* superoxide generation by xanthine oxidase in the presence of ROH. (A) Purified xanthine oxidase was incubated with different concentrations (μ M) of ROH, RA and xanthine, in the presence or absence of 100 μ M NADH. The rate of superoxide formation was estimated by superoxide-mediated NBT reduction over 1 h of incubation as described in the Materials and methods section. (B) NADH oxidation by xanthine oxidase reaction was evaluated by measuring the decrease of absorption at 340 nm. (C) Superoxide formation was determined in the presence of different NADH concentrations (μ M). ROH 10 μ M or xanthine 10 μ M-induced superoxide formation was monitored by NBT reduction. Legends: DMSO (dimethylsulphoxide, vehicle), XA (xanthine); ROH (retinol); RA (retinoic acid). Data from four independent experiments in quadruple ($n=4$). #Different from basal levels, *different from its respective incubations in the absence of NADH, $p < 0.05$, ANOVA.

rate of superoxide generation in the presence of the classical xanthine oxidase substrate, xanthine. The addition of 100 μ M NADH to these enzyme assay systems caused a 3-fold increment on superoxide formation by ROH and a 1.4-fold increase in xanthine-induced superoxide production (Figure 1A).

We confirmed the oxidation of NADH to NAD by xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation by measuring the decrease of NADH absorption at 340 nm in the presence of different ROH concentrations (Figure 1B). NADH consumption was dose-dependent in the range of 1–100 μ M ROH. Variations on NADH concentrations showed that, *in vitro*, the NADH concentration was more important to ROH-elicited than xanthine-induced superoxide formation by xanthine oxidase reaction (Figure 1C). At low NADH concentrations (i.e. 0, 1 and 50 μ M), the rate of 10 μ M xanthine-elicited superoxide formation by xanthine oxidase was 6-fold higher than that induced by 10 μ M ROH. In addition, we observed that a 4-fold increase in NADH concentration in the enzyme assay (i.e. 50 to 200 μ M) reflects only in a 1.4-fold increase in superoxide formation with 10 μ M xanthine as substrate. The same increase in NADH concentration promotes a 6-fold increase in superoxide generation by ROH incubation (Figure 1C).

Thus, further assays were performed in the presence of 100 μ M NADH.

Influence of ROH on uric acid formation from xanthine and the effect of allopurinol on superoxide formation by xanthine oxidase in the presence of ROH

The effect of ROH on xanthine oxidase-catalysed xanthine conversion to uric acid was evaluated by incubating 10 μ M xanthine, 0.02 units/mL xanthine oxidase and 10 or 20 μ M ROH in the presence of 100 μ M NADH. The rate of uric acid formation was monitored during 20 min at 295 nm. Results showed that 10 and 20 μ M ROH significantly inhibited xanthine oxidase-dependent uric acid formation from xanthine by $21 \pm 3\%$ and $45 \pm 4.2\%$, respectively (Figure 2A). In another xanthine oxidase assay system, we observed that 1 and 10 μ M allopurinol exerted a well-known effect inhibiting $51 \pm 5.1\%$ and $91 \pm 7\%$, respectively, the 10 μ M ROH-elicited superoxide-dependent NBT reduction *in vitro* (Figure 2B). These results altogether suggest that xanthine oxidase is able to generate superoxide anion in the presence of ROH. Superoxide formation is over-stimulated in the presence of NADH and is inhibited by allopurinol. In

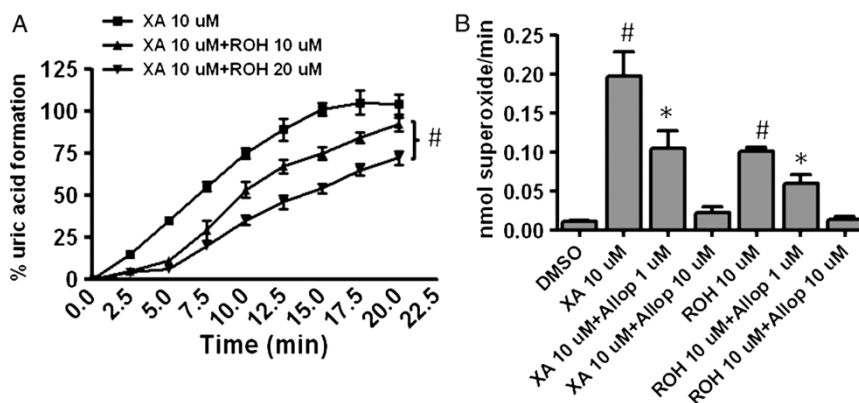


Figure 2. Influence of ROH on uric acid formation from xanthine and the effect of allopurinol on superoxide formation by xanthine oxidase in the presence of ROH. (A) Xanthine oxidase-catalysed uric acid formation from xanthine was evaluated in the presence of 10 and 20 μM ROH as described in Materials and methods. (B) Allopurinol effect on ROH-elicited superoxide formation. *In vitro* enzyme system was incubated in the presence of 1 and 10 μM of allopurinol and the rate of superoxide-mediated NBT reduction was monitored at 560 nm. Legends: DMSO (dimethylsulphoxide, vehicle), XA (xanthine), Allo (allopurinol). Data from four independent experiments in quadruple ($n=4$). #Different from basal level; *different from its respective positive control (10 μM xanthine or 10 μM ROH) and from basal levels. $p < 0.05$, ANOVA.

addition, ROH seems to compete with the classical xanthine oxidase substrate, xanthine.

Inhibition of xanthine oxidase decreases ROH-induced ROS production, protein oxidative damage and cytotoxicity in Sertoli cells

Previous works from our group and others reported that ROH presents strong pro-oxidative properties in biological systems [10–25]. Since *in vitro* experiments suggest that xanthine oxidase generates ROS in the presence of ROH and our previous data reported oxidative damage to lipids, protein and DNA in ROH-treated Sertoli cells, we decided to investigate the involvement of the xanthine oxidase on ROH-elicited ROS production in these cells. Thus, cells were treated for 24 h with different ROH concentrations in the presence or absence of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol at 50 μM . Allopurinol

treatment resulted in a reduction of over 35% on 7–20 μM ROH-induced ROS production during 24 h treatment (Figure 3A). Another set of experiments were performed by incubating Sertoli cells with RA (0.1–20 μM) for 24 h. RA treatment did not increase ROS production at any tested concentration (data not shown). As expected, 50 μM allopurinol did not inhibit 50 μM hydrogen peroxide-elicited ROS production, confirming that allopurinol did not act as ROS scavenger *per se* (Figure 3A). Moreover, we detected increased protein carbonyl damage following 10 μM ROH treatment at 24 h which was also inhibited by allopurinol (Figure 3B). The evaluation of xanthine oxidase activity showed that the enzyme is 1.6-fold more active in 10 μM ROH-treated cells when compared to untreated cells at 12 h treatment (Figure 4A). Following 10–20 μM ROH treatment, Sertoli cell viability was reduced as assessed by the MTT assay (Figure 4B). In agreement with DCF and

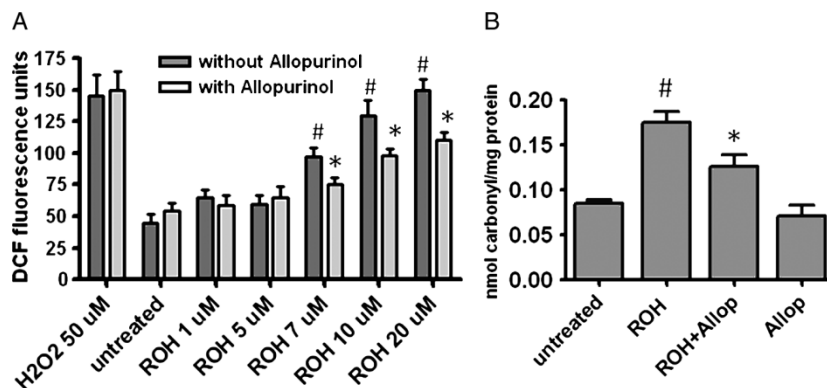


Figure 3. Xanthine oxidase mediates ROS production and oxidative damage in Sertoli cells. (A) ROS production in Sertoli cells treated with different ROH concentrations (μM) for 24 h in the presence or absence of 50 μM allopurinol. (B) Allopurinol effect on protein oxidative damage (carbonyl groups) in 10 μM ROH-treated cells. Cells were incubated with 10 μM ROH during 24 h and carbonyl groups were quantified as described in the Materials and methods section. Legends: ROH (10 μM retinol); Allo (50 μM Allopurinol), H₂O₂ (50 μM Hydrogen peroxide). Data from three independent experiments in triplicate ($n=3$). #Different from untreated cells; *different from its respective ROH-treated and from untreated cells. $p < 0.05$, ANOVA.

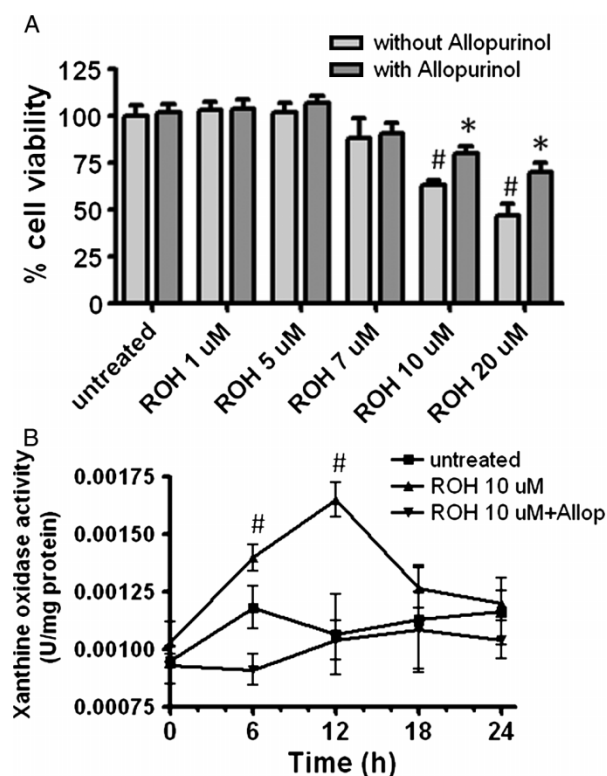


Figure 4. ROH increases xanthine oxidase activity and induces allopurinol-inhibited cytotoxicity. (A) Time course effect of ROH on xanthine oxidase activity in Sertoli cells. Cells were incubated with 10 μM ROH for different times (h), extracts were obtained by potter homogenization and xanthine oxidase activity was measured by the rate of the enzyme-catalysed uric acid formation from 100 μM xanthine at 295 nm. (B) ROH-mediated decrease in cell viability was evaluated by MTT assay after cell incubation with different ROH concentrations (μM) for 24 h in the presence or absence of allopurinol. Legends: Allop (50 μM allopurinol). Data from three independent experiments in triplicate ($n=3$). [#]Different from untreated cells; ^{*}different from its respective ROH-treated and from untreated cells. $p < 0.05$, ANOVA.

carbonyl assays, at the end of 24 h treatment, the decrease in cell viability by 10 and 20 μM ROH was $\sim 40\%$ inhibited by 50 μM allopurinol (Figure 4B).

Inhibition of retinaldehyde dehydrogenases potentiates xanthine oxidase-dependent ROS production and cytotoxicity

In order to block ROH metabolism by retinaldehyde dehydrogenases and to increase bioavailability of ROH and retinaldehyde to xanthine oxidase, we treated Sertoli cells with 200 μM citral, a classical selective competitive retinaldehyde dehydrogenase inhibitor [32,33], for 15 min prior to 10 μM ROH addition. At the end of 24 h, the pre-treatment with citral potentiated 10 μM ROH-induced ROS production as compared to 10 μM ROH alone (Figure 5A). The over-stimulation of ROS production by the retinaldehyde dehydrogenase inhibitor in the presence of ROH was blocked by 50 μM allopurinol.

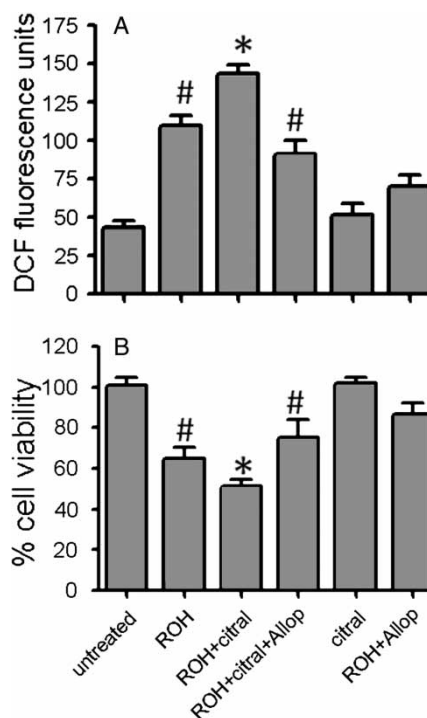


Figure 5. Retinaldehyde dehydrogenase inhibition potentiates xanthine oxidase-dependent ROS production and cytotoxicity in ROH-treated cells. (A) Effect of 200 μM citral pre-treatment on 10 μM ROH-induced ROS and cytotoxicity in the presence or absence of 50 μM allopurinol. Citral or citral plus allopurinol were added 15 min prior to 10 μM ROH incubation and ROS were monitored during 24 h by DCF fluorescence. (B) ROH-induced decrease in cell viability is potentiated in the presence of citral in an allopurinol-inhibited manner. Legends: ROH (10 μM retinol), citral (200 μM citral), Allop (50 μM allopurinol). [#]Different from untreated cells; ^{*}different from ROH-treated and from untreated cells. $p < 0.05$, ANOVA.

Citral alone had no effect on ROS production. In agreement, the 10 μM ROH-induced decrease in cell viability was also potentiated in the presence of citral; this effect was also attenuated by allopurinol (Figure 5B). These data altogether suggest that the enhancement in both ROS production and cell death induced by citral in ROH-treated cells was mediated by xanthine oxidase reaction.

Discussion

Previous studies from our group and others have reported that ROH and its derivatives, retinoids, present redox-active properties in biological systems [7–25]. Clinical trials have been carried out based on the potential antioxidant role of retinoids and carotenoids, but in some studies retinoid supplementation had to be discontinued due to increased mortality related to lung cancer and cardiovascular disease incidence [7]. It is possible that many of the deleterious side effects observed in some clinical trials with retinoids may be related to free radical and oxidants generation in vitamin A supplementation.

Recently, some works from our group reported that ROH-palmitate supplementation induces lipoperoxidation, protein carbonylation, thiol oxidation and mitochondrial damage in the cortex, cerebellum and substantia nigra of Wistar rats [22–25]. However, the mechanisms by which ROH and retinoids induce oxidative stress remain uncertain.

Testicular Sertoli cells are one of the principal physiological ROH targets in mammalian [4,34,35]. It has been well established that ROH and its derivatives regulate many reproductive related functions in these [4,16,34], although some studies reported that supplementation with high doses of vitamin A leads to testicular lesions, cytotoxicity to Sertoli cells and spermatogenesis disorders [13,36]. ROH concentrations in Sertoli cells may vary between 2–5 μM depending on plasma ROH levels [4,16,34,37]. We previously reported that slight variations in the ROH concentrations may trigger important changes in the cellular redox state [10–21]. ROH concentrations above 5 μM are able to increase intracellular ROS production and this led to DNA oxidative damage and apoptosis in primary Sertoli cells. The recently published work reporting that purified xanthine oxidase catalyses ROH oxidation to RA *in vitro* stimulated us to investigate whether the enzyme could be involved in the pro-oxidant effect of ROH in our cellular model. The work conducted by Taibi and Nicotra [1] did not contemplate the xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation as a possible source of ROS in ROH supplementation. Thus, initially, we investigated some *in vitro* parameters regarding superoxide production by xanthine oxidase in the presence of ROH. Data showed that ROH concentrations as low as 1 μM were able to increase superoxide production by milk xanthine oxidase in an allopurinol-inhibited manner. RA, the described final product of the enzyme reaction, did not induce superoxide formation. The inhibitory effect of allopurinol on superoxide production *in vitro* was also taken into account in order to indirectly deduce that the mechanism of superoxide production by xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation is probably the same as that for purine substrates. The inhibitory effect of ROH on uric acid formation from xanthine suggests that ROH and xanthine are metabolized at the same enzyme site [2]. Interestingly, superoxide formation during ROH oxidation by the enzyme was strongly enhanced (3-fold) in the presence of NADH as compared to ROH alone. In contrast, superoxide production by the enzyme when xanthine was used as substrate increased only 1.4-fold in the presence of 100 μM NADH. The importance of NADH on superoxide production by xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation is in agreement with the classical reaction mechanism in which the enzyme may to use NADH to reduce

molecular oxygen and to form superoxide anions [3,4].

In cultured Sertoli cells, ROH stimulated xanthine oxidase activity and the pre-treatment with 50 μM allopurinol attenuated ROH-induced ROS production suggesting a role for xanthine oxidase in ROH pro-oxidant effect. Not only ROS production, but also the increase in protein damage and the decrease in cell viability promoted by ROH were inhibited by allopurinol pre-treatment. Pharmacological inhibition of the ROH oxidation to RA by citral, a retinaldehyde dehydrogenase inhibitor, potentiated the ROH-induced ROS production. This effect was also inhibited by allopurinol. Retinaldehyde dehydrogenases are important enzymes involved in RA synthesis from the ROH-derived retinaldehyde in the cell [32]. Inhibition of retinaldehyde dehydrogenases accumulates retinaldehyde and ROH, two xanthine oxidase substrates [1,2]. Possibly, ROH and retinaldehyde metabolism by xanthine oxidase was stimulated in the presence of the retinaldehyde dehydrogenase inhibitor since allopurinol totally blocked the effects of citral on ROH-induced ROS production.

On the other hand, RA—the final product of xanthine oxidase-catalysed ROH oxidation—did not present any ROS-generating effect on *in vitro* enzyme assays and in cultured Sertoli cells. In fact, previous works reported that ROH and retinaldehyde, but not RA, induce ROS-dependent cell death in human fibroblasts and PC-12 cells [11,12]. Possibly, some steps of the oxidative metabolism of ROH to retinaldehyde and retinaldehyde to RA may be involved in ROH and retinaldehyde-dependent ROS generation. Our data showed direct evidence that xanthine oxidase may be involved, at least in part, in ROH-induced oxidative stress. However, the herein performed assays showed that total enzyme inhibition with allopurinol (as showed in Figure 4) presented only a partial inhibitory effect in ROH-induced ROS production, protein damage and cytotoxicity. Our previous data suggest that other free radical sources such as mitochondria also mediate free radical production in ROH-treated Sertoli cells and rat brain [13,19,24]. In addition, it was observed that ROH and retinaldehyde auto-oxidation generates superoxide *in vitro* [38]. Thus, others free radical sources different from xanthine oxidase reaction are involved in the ROS-generating properties of ROH.

In spite of being a recently described function, the studies suggest that xanthine oxidase-catalysed ROH and retinaldehyde oxidation is a feasible process *in vivo* which also may play a role in situations in which enzyme activity is stimulated such as surgical stress and hypoxia/reperfusion injury [39,40]. Xanthine oxidase-dependent decreases in retinaldehyde and increases in RA levels were observed after surgical stress in small intestine cells, suggesting a possible

role of the enzyme on RA formation [40]. In addition, the determined K_m value for retinaldehyde ($0.29 \mu\text{M}$) may indicate that the processing of retinaldehyde by xanthine oxidase possibly occurs *in vivo* [2]. In our experimental model, inhibition of the ROH metabolism by dehydrogenases inhibitor, which in turn accumulates ROH and retinaldehyde [32], have increased the xanthine oxidase-dependent ROS production, suggesting the existence of ROH/retinaldehyde metabolism by xanthine oxidase as a source of cytosolic ROS.

Overall, data presented in this work showed that xanthine oxidase *in vitro* generates superoxide anions in the presence of ROH. Superoxide formation is enhanced in NADH presence and inhibited by allopurinol, a classical xanthine oxidase inhibitor. In Sertoli cells, ROH stimulated xanthine oxidase activity and ROH oxidative-related effects were attenuated by allopurinol treatment, suggesting the involvement of the xanthine oxidase in ROH-induced ROS production in our model. This is the first study demonstrating that xanthine oxidase mediates vitamin A pro-oxidant effects in a biological system.

Acknowledgements

We acknowledge the Brazilian funds CAPES, CNPq, FAPERGS and PROPESQ/UFRGS.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Taibi G, Nicotra CMA. Xanthine oxidase catalyzes the oxidation of retinol. *J Enzyme Inhibit Med Chem* 2007; 22:471–476.
- [2] Taibi G, Paganini A, Gueli MC, Ampola F, Nicotra CMA. Xanthine oxidase catalyzes the synthesis of retinoic acid. *J Enzyme Inhibit Med Chem* 2001;16:275–285.
- [3] Napoli J. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:S52–S62.
- [4] Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. *The retinoids: Biology, chemistry and medicine*, 2nd ed. New York: Raven Press; 1994.
- [5] Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2000; 275:7757–7763.
- [6] Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of Xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem* 1990;255:6656–6663.
- [7] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Lund B, Metch B, Gylys-Colwell I. The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. *Cancer Res* 1994;54:2038s–2043s.

- [8] Palozza P, Serini S, Di Nicuolo F, Piccioni E, Calviello G. Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Molec Asp Med* 2003;24:353–362.
- [9] Penniston KL, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 2006;83:191–201.
- [10] Gelain DP, Moreira JC, Bevilaqua LR, Dickson PW, Dunkley PR. Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 2007; 103:2369–2379.
- [11] Gelain DP, Moreira JCF. Evidence of increased reactive species formation by retinol, but not retinoic acid, in PC12 cells. *Toxicol in Vitro* 2008;22:553–558.
- [12] Gimeno A, Zaragoza R, Vivo-Sese I, Viña JR, Miralles VJ. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 2004;13:45–54.
- [13] Klamt F, Dal-Pizzol F, Gelain DP, Dalmolin RS, Birnfeld de Oliveira R, Bastiani M, Horn F, Fonseca Moreira JC. Vitamin A treatment induces apoptosis through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Cell Biol Int* 2008; 32:100–116.
- [14] Klamt F, Dal-Pizzol F, Rohers R, Oliveira RB, Dalmolin RJS, Henriques JAP, Andrades HHR, Ramos ALLP, Moreira JCF. Genotoxicity, recombinogenicity and preneoplastic transformation induced by Vitamin A supplementation. *Mutat Res* 2003;539:117–125.
- [15] Dalmolin RJ, Zanotto-Filho A, De Oliveira RB, Duarte RF, Pasquali MA, Moreira JC. Retinol and retinoic acid increase MMP-2 activity by different pathways in cultured Sertoli cells. *Free Radic Res* 2007;41:1338–1347.
- [16] Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, de Oliveira RB, Dal-Pizzol F, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Moreira JC. Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. *Cell Signal* 2006;18:1685–1694.
- [17] de Oliveira RB, Klamt F, Castro MA, Polydoro M, Zanotto Filho A, Gelain DP, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Morphological and oxidative alterations on Sertoli cells cytoskeleton due to retinol-induced reactive oxygen species. *Molec Cell Biochem* 2005;271:189–196.
- [18] Frota ML Jr, Klamt F, Dal-Pizzol F, Schiengold M, Moreira JC. Retinol-induced mdr1 and mdr3 modulation in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavengers. *Redox Rep* 2004;9:161–165.
- [19] Klamt F, Dal-Pizzol F, Bernard EA, Moreira JC. Enhanced UV-mediated free radical generation; DNA and mitochondrial damage caused by retinol supplementation. *Photochem Photobiol Sci* 2003;2:856–860.
- [20] Dal-Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, Bernard EA, Moreira JC. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Free Radic Res* 2001;34:395–404.
- [21] Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML Jr, Moraes LF, Moreira JC, Benfato MS. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Radic Res* 2000;33:677–687.
- [22] De Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JCF. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 2007;28:1191–1199.
- [23] De Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JCF. Therapeutic vitamin A doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation. *Neurochem Res* 2008;33:378–383.

- [24] De Oliveira MR, Moreira JCF. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. *Toxicol Lett* 2007;173:145–150.
- [25] de Oliveira MR, de Bittencourt Pasquali MA, Silvestrin RB, Mello E, Souza T, Moreira JC. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain Res* 2007;1169:112–119.
- [26] Avis PG, Bergel F, Bray RC. Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part III. Estimations of the co-factors and the catalytic activities of enzymes fractions from cow's milk. *J Chem Soc* 1956; pp 1219–1226.
- [27] Silva EG, Behr GA, Zanotto-Filho A, Lorenzi R, Pasquali MAB, Ravazolo LG, Silva FA, Bassani VL, Henriques AT, Reginatto FH, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) Macbr. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biol Pharm Bull* 2007;30:25–30.
- [28] Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612–616.
- [29] Shin MH, Moon YJ, Seo J-E, Lee Y, Kim KH, Chung JH. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radic Biol Med* 2007;44:635–645.
- [30] Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975;59:245–249.
- [31] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- [32] Kurlandsky SB, Xiao JH, Duell EA, Voorhees JJ, Fisher GJ. Biological activity of *All-trans* retinol requires metabolic conversion to *All-trans* retinoic acid and is mediated through activation of nuclear retinoid receptors in human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994;269:32821–32827.
- [33] Siew C, Dietrich RA. Localization and characteristics of rat liver mitochondrial aldehydes dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys* 1976;176:628–649.
- [34] Jégou B, Sharpe RM. Paracrine mechanisms in testicular control. In: D Kestner, editor. *Molecular biology of the male reproductive system*. San Diego: Academic Press; 1993. p 271–310.
- [35] Blomhoff R. *Vitamin A in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 1994.
- [36] Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 2002;124:173–180.
- [37] Allen LH, Haskell M. Estimating the potential for vitamin A toxicity in women and young children. *J Nutrition* 2002;132(9 Suppl):2907S–2919S.
- [38] Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 2000;275:2003–2008.
- [39] Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006;70:181–190. Review.
- [40] Prabhu R, Thomas S, Balasubramanian KA. Surgical stress-induced alterations in retinoid metabolism in the small intestine: role of oxygen free radicals. *Arch Biochem Biophys* 2005;434:299–305.

4. DISCUSSÃO

A vitamina A (retinol) e seus derivados, os retinóides, foram por muito tempo considerados compostos antioxidantes e antiproliferativos. Devido a essas propriedades, preconizava-se a utilização de retinóides na prevenção e tratamento de diversas patologias associadas a distúrbios proliferativos e oxidativos como o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Omenn et al., 1994). Além disso, diversos estudos demonstravam que a deficiência de vitamina A estava relacionada à indução de dano oxidativo às estruturas celulares, e isso reforçava o papel desta com antioxidante (Jeandel et al., 1989). Partindo das boas perspectivas de ação dos retinóides na terapêutica, estudos se propuseram a avaliar os efeitos da suplementação com vitamina A em humanos. Estes trabalhos avaliaram os efeitos da reposição de vitamina A tanto em pessoas com sintomas de deficiência quanto em pessoas saudáveis, ou seja, sem deficiência vitamínica (Goodman et al., 1993; Omenn et al., 1994). Paralelamente, o uso de suplementações vitamínicas contendo vitamina A aumentava exponencialmente, utilizando-se de promessas de juventude e saúde. De fato, a suplementação com vitamina A proporciona uma significativa melhora clínica em pacientes com deficiência da mesma, entretanto, os efeitos não se demonstraram benéficos em pessoas sem deficiência (Goodman et al., 1993; Omenn et al., 1994; Penniston & Tanumihardjo, 2006). Em um estudo pioneiro avaliando os efeitos da suplementação com vitaminas A, C e E e beta-caroteno em fumantes, Omenn e colaboradores (1994) demonstraram que a suplementação com beta caroteno e retinol aumentava drasticamente a incidência de neoplasia pulmonar nestes pacientes, e os estudos tiveram que ser interrompidos antes dos prazos previstos. Levando em conta esses dados, especulou-se que o retinol e o beta-

caroteno poderiam estar agindo como pró-oxidantes, facilitando o desenvolvimento de neoplasia em um ambiente pré-disposto como, no caso, o pulmão de um fumante. Paralelamente, vários autores demonstravam os efeitos benéficos da terapia com ácido retinóico no tratamento de neoplasias, e a utilização de retinóides e suplementações contendo vitamina A continuou sendo estimulada (Leithner et al., 2000; Kuratomi et al., 1999; Windbichler et al., 1996; Pastorino et al., 1993).

Entre muitos estudos, o fato que parece mais óbvio é que não existe, na literatura científica, um consenso de “quem é a vitamina A”. Alguns autores citam-na como retinol, outros como palmitato de retinol, e outros como o ácido retinóico. Nessa dissertação, adotamos a relação “Vitamina A = retinol” que é o recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration). O problema disso tudo é que os resultados dos diferentes estudos utilizando esses diferentes compostos são agrupados em um todo, e isso, ao nosso ponto de vista, pode ser um problema quando estudamos os retinóides. Por exemplo, os resultados aqui apresentados mostram que moléculas retinóides distintas como o retinol e o ácido retinóico podem desencadear efeitos completamente diferentes num mesmo tipo celular, e até mesmo uma mesma molécula retinóide pode modular diferentes destinos celulares dependendo da concentração, como no caso do retinol. No estudo comparativo entre retinol e ácido retinóico demonstramos que o retinol pode agir como pró-oxidante, ao passo que o ácido retinóico não causa nenhuma alteração na produção de espécies reativas nas células de Sertoli. Além disso, enquanto o retinol apresentou efeitos proliferativos, o ácido retinóico apresentou atividade antiproliferativa. Neste estudo foram testadas diferentes concentrações de retinol e ácido retinóico variando desde os níveis fisiológicos até níveis supra-fisiológicos. Nesse contexto, as células de Sertoli se

mostraram muito mais sensíveis a pequenas variações nos níveis de retinol quando comparado com o ácido retinóico. O simples aumento das concentrações de retinol de 5 para 7 μM causou um significativo aumento da produção de espécies reativas induzindo proliferação celular, decréscimo nos níveis do inibidor de ciclinas p21 e aumento do número de células em fase S e G2/M. Corroborando, estudos prévios reportam que o retinol 7 μM induziu ativação da ornitina decarboxilase, a defosforilação de HMG e fosforilação da histona H3, ambos marcadores clássicos da entrada no ciclo celular (Moreira et al., 2000). Entretanto, concentrações mais altas como 10 e 20 μM causaram um efeito pró-oxidante suficientemente elevado para promover decréscimos na viabilidade celular. Quando consideramos os efeitos de agentes pró-oxidantes, o efeito proliferativo em certas doses e deletério em outras é perfeitamente entendível, e tem sido demonstrado em experimentos utilizando oxidantes clássicos (Stone & Yang, 2006). Por exemplo, o peróxido de hidrogênio em doses baixas (1 μM) pode induzir proliferação; 10 μM induz parada no ciclo celular; 50 μM induz apoptose; e 100 μM induz necrose em diversos tipos celulares (figura 3). Um ponto crucial dos eventos observados no tratamento com retinol é a questão das concentrações. Somente em concentrações próximas e/ou maiores que o limite fisiológico superior para a célula de Sertoli (ou seja, > 5 μM) o retinol foi hábil em aumentar a produção de espécies reativas e alterar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (Dal Pizzol et al., 2000; Dal Pizzol et al., 2001). Um efeito semelhante foi demonstrado por Murata & Kawanishi (2000) em células da linhagem HeLa, e por Gimeno e colaboradores (2004) em fibroblastos humanos nas quais 5 μM e 10 μM de retinol, respectivamente, induziram estresse oxidativo, reforçando a importância da manutenção dos níveis de retinol dentro da faixa

fisiológica (Murata & Kawanishi, 2000; Gimeno et al., 2004). Trabalhos in vivo também demonstram os efeitos pró-oxidantes da suplementação com palmitato de retinol em ratos sem deficiência. Estes estudos relataram que a administração aguda (3dias) e crônica (28 dias) de palmitato de retinol em doses idênticas àquelas recomendadas clinicamente induz dano generalizado a diversas estruturas do sistema nervoso central promovendo diminuição na capacidade motora, exploratória, e cognitiva em ratos, o que de fato, parece preocupante (De Oliveira et al., 2007; De Oliveira et al., 2008). Em humanos, estudos também demonstram hepatotoxicidade associada à suplementação com Vitamina A (Penniston & Tanumihardjo, 2006).

Embora estruturalmente relacionado ao retinol, no modelo experimental utilizado neste trabalho não verificamos qualquer atividade pró-oxidante relacionada ao ácido retinóico, tanto em níveis fisiológicos (0,1 a 10 η M) quanto em níveis muito maiores que os fisiológicos como 10 μ M. Além disso, o tratamento com ácido retinóico desencadeou um efeito totalmente oposto àquele determinado pelo retinol: o ácido retinóico diminuiu a taxa de proliferação, e aumentou os níveis de p21 e a quantidade de células em G1/G0. Particularmente na fisiologia da célula de Sertoli, o decréscimo da proliferação associado ao aumento do inibidor de ciclinas p21 são determinantes da entrada na fase de diferenciação (Holsberger et al., 2005). O mecanismo gênomico do ácido retinóico, via ativação de RAR/RXR levando a transcrição gênica, tem sido aceito como o principal mecanismo de indução de p21 e diferenciação celular em diversos modelos (Altucci et al., 2007). A propriedade do ácido retinóico de suprimir proliferação e induzir diferenciação celular tem sido considerada um potencial mecanismo para a utilização deste composto no tratamento de neoplasias de células indiferenciadas como

neuroblastomas, alguns tipos de leucemia e gliomas (Cemaianu et al., 2008; Altucci et al., 2007). Portanto, um dos principais dados deste trabalho é mostrar que o retinol e o ácido retinóico podem apresentar efeitos muito diferentes e que isso, pelo menos em parte, é determinado pela propriedade do retinol, diferentemente do ácido retinóico, atuar como um agente pró-oxidante. Suportando os dados aqui apresentados, estudos demonstraram que somente precursores de ácido retinóico, como o retinol e o retinaldeído, agem com agentes oxidantes em modelos celulares (Murata & Kawanishi, 2000; Gimeno et al., 2004; Gelain & Moreira, 2008). Numa abordagem mais dedutiva, isso poderia ser explicado em função do retinol (álcool) e do retinal (aldeído) estarem em um estado redox passível de oxidação, ao contrário do ácido retinóico, que é o produto final da oxidação do retinol.

No objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos na proliferação induzida por retinol, foi observado que a estimulação de proliferação foi mediada por uma ativação das vias de MAPKs. O tratamento com 7 μ M de retinol induziu uma ativação rápida das três MAPKs JNK1/2, p38 e ERK1/2 em um mecanismo dependente da produção de espécies reativas, uma vez que o retinol aumentou tanto a produção de espécies reativas como a ativação de MAPKs, e o tratamento com o antioxidante Trolox (análogo da Vitamina E) inibiu tanto a produção de espécies reativas, quanto a ativação das MAPKs e a proliferação. Além disso, a incubação com inibidores farmacológicos específicos das vias de JNK, p38 e ERK também bloqueou a proliferação, sugerindo a participação destas na proliferação induzida por retinol. Em estudos prévios, o papel da ERK1/2 na transformação fenotípica induzida por retinol já havia sido demonstrado (Gelain et al., 2006). Neste trabalho somamos o papel das outras vias de MAPK nas ações proliferativas

do retinol. Importante salientar que a ativação de JNK, p38 e ERK foi rápida (em torno de 10-15 min de tratamento) e o tratamento com o inibidor de síntese protéica, cicloheximida, não alterou o perfil de ativação dessas proteínas, sugerindo que a síntese de novas proteínas não foi requerida para este efeito. Portanto, esses eventos rápidos e independentes da síntese protéica não são compatíveis com o mecanismo clássico de ação nuclear dos retinóides, o qual envolve síntese de novas proteínas e geralmente necessita de horas ou dias para desencadear efeitos mensuráveis. Nossos dados sugerem que a indução de proliferação envolveu mecanismos não-genômicos, os quais foram mediados pela produção de espécies reativas induzida no tratamento com retinol. Por outro lado, o ácido retinóico, nas concentrações avaliadas, não alterou o estado de ativação das MAPKs, e seus efeitos antiproliferativos não foram alterados pelos inibidores farmacológicos dessas vias.

O mecanismo mediado por espécies reativas já havia sido sugerido na ativação de ERK1/2 pelo tratamento com retinol, embora a fonte específica das espécies reativas envolvidas nesse evento não havia sido demonstrada (Gelain et al., 2006). A fim de responder esta questão, decidimos avaliar as possíveis fontes de espécies reativas envolvidas na sinalização redox do retinol. Neste contexto, mitocôndria, xantina oxidase e NADPH oxidase têm sido consideradas as principais estruturas geradoras de espécies reativas envolvidas em eventos de sinalização redox (Nelson & Melendez, 2004). Em nosso modelo, o inibidor do transporte de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial (rotenona) foi capaz de inibir a produção de espécies reativas, sugerindo que a mitocôndria tem um papel importante nos efeitos pró-oxidantes do retinol. O papel central da mitocôndria foi reforçado pelo aumento da taxa de produção de superóxido em

mitocôndrias isoladas de células de Sertoli tratadas com retinol 7 μ M, os quais sugerem que o retinol, de alguma maneira ainda não bem esclarecida, induz disfunção na cadeia de transporte de elétrons. Em estudos prévios, Klamt e colaboradores (2005) demonstraram uma aumentada taxa de produção de superóxido em mitocôndrias hepáticas isoladas incubadas com retinol; um efeito semelhante foi também observado em mitocôndrias isoladas de ratos Wistar suplementados com palmitato de retinol (De Oliveira et al., 2007). Em nosso modelo, a incubação com rotenona inibiu tanto a produção de espécies reativas quanto a ativação de JNK1/2, p38 e ERK1/2 por retinol, sugerindo que as espécies reativas formadas na mitocôndria desempenham um papel central nas ações não-gênicas do retinol sobre as vias de MAPK. Portanto, o sinal redox que modula o estado de ativação das MAPKs e induz a proliferação celular tem origem no compartimento mitocondrial. Isso constitui, de fato, um novo mecanismo de ação da vitamina A em sistemas biológicos, embora acreditamos que os eventos celulares mediados por este possam variar dependendo do tipo celular.

Além do envolvimento da mitocôndria nos efeitos pró-oxidantes do retinol, descrevemos uma nova e potencial fonte de espécies reativas no tratamento com Vitamina A: a xantina oxidase. A xantina oxidase é uma enzima citosólica bem conhecida pelo seu papel na degradação de purinas, sendo hiper-estimulada em situações de déficit energético como hipóxia e/ou isquemia tecidual, nas quais ela tem um papel fundamental na produção de radical superóxido durante a reperfusão (Thompson-Gorman & Zweier, 1990). Dentre os efeitos mais conhecidos, essa enzima apresenta uma função importante na geração de dano tecidual em eventos como infarto do miocárdio, exercício físico e hipóxia/isquemia cerebral (Zweier & Talukder, 2006; Prabhu et al., 2005). Além

disso, diversos estudos têm demonstrado a habilidade da xantina oxidase em metabolizar uma grande variedade de substratos, sendo considerada uma enzima de espectro amplo. Em geral, esse grupo de substratos é formado por aldeídos e alcoóis como o etanol, acetaldeído, formaldeído e propanaldeído, sendo considerada uma das possíveis envolvidas nos efeitos tóxicos dessas substâncias (Godber et al., 2000; Taibi & Nicrota, 2007). Recentemente, Taibi e colaboradores demonstraram que a xantina oxidase é capaz realizar a oxidação do retinol à retinal, e de retinal à ácido retinóico *in vitro* (Taibi et al., 2001; Taibi & Nicrota, 2007). Entretanto esse estudo não avaliou a possível formação de espécies reativas durante o metabolismo do retinol pela enzima. Sendo que diversos estudos, entre eles os desenvolvidos em nosso grupo, têm demonstrado os efeitos pró-oxidantes do retinol, coube-nos testar a seguinte hipótese: a xantina oxidase poderia estar envolvida nos eventos pró-oxidantes da vitamina A?

No segundo artigo científico apresentado nessa dissertação, utilizamos um sistema de incubação *in vitro* idêntico ao preconizado no trabalho de Taibi & Nicrota (2007) e, além disso, realizamos uma abordagem celular para avaliar se os dados encontrados *in vitro* poderiam ser aplicados a um sistema celular. Todos os experimentos *in vitro* foram performados utilizando-se como controle o substrato clássico da enzima, a xantina. *In vitro*, demonstramos que a incubação de xantina oxidase purificada com retinol promoveu a geração de ânion superóxido. Incubação de ácido retinóico neste mesmo sistema não induziu efeito algum. A presença de NADH no sistema potencializou a formação de superóxido no metabolismo do retinol pela enzima. O efeito inibitório do alopurinol, um inibidor clássico da xantina oxidase, na produção de superóxido em presença de retinol sugere que o sítio enzimático envolvido na formação de superóxido

durante a oxidação do retinol pela xantina oxidase é provavelmente o mesmo daquele envolvido no metabolismo de purinas. Isso é reforçado pela habilidade do retinol em inibir a formação de ácido úrico à partir da metabolização da xantina pela xantina oxidase.

No primeiro artigo científico desta dissertação, foi introduzido o dado de que o retinol induz ativação da xantina oxidase em células de Sertoli. Entretanto, essa ativação não esteve relacionada com os eventos de ativação das MAPKs e proliferação relatados, uma vez que a ativação das MAPKs ocorreu em tempos curtos de tratamento (15 min) e apresentou-se insensível ao alopurinol, e a ativação da xantina oxidase foi tardia (a partir de 3 h de tratamento). Como citado acima, a modulação redox das MAPKs foi mediada pelas espécies reativas provenientes do compartimento mitocondrial. Além de não inibir a ativação das MAPKs, a inibição da xantina oxidase com alopurinol não apresentou efeito na proliferação celular induzida por retinol 7 μM (não mostrado). Entretanto, o inibidor de xantina oxidase inibiu a acumulação tardia de espécies reativas por retinol 7 μM (após 3 h, vide fig 6A do artigo 1) e também inibiu o decréscimo de viabilidade observado em doses altas de retinol (10 e 20 μM). Não somente o decréscimo de viabilidade, mas também o dano oxidativo celular causado pelo retinol foi inibido pelo pré-tratamento com alopurinol, sugerindo que ativação da xantina oxidase mediou os efeitos citotóxicos da vitamina A.

Nesta dissertação é possível observar que os efeitos pró-oxidantes da vitamina A podem ser bastante específicos e sensíveis a pequenas variações de concentração. No primeiro artigo, descrevemos um papel oxidante de uma dose específica de retinol (7 μM) em células incubadas por 24 h. Nesse modelo, observa-se um efeito pró-oxidante

aparentemente moderado uma vez que a viabilidade celular não foi alterada e, interessantemente, as células são induzidas a proliferar. Este trabalho pode colaborar na elucidação dos mecanismos de ação redox da vitamina A, e também aponta para as diferenças entre retinol e ácido retinóico. Não podemos afirmar que caso um protocolo experimental diferente fosse testado, como por exemplo, um tratamento diário e longo com 7 μM de retinol, os efeitos seriam os mesmos, pois talvez os efeitos pró-oxidantes fossem exacerbados e a morte celular seria o resultado mais provável. Entretanto, esse trabalho e os estudos prévios mostram que o tratamento com retinol 7 μM é capaz de induzir a proliferação e transformação fenotípica de uma célula até então normal e não-proliferativa como a célula de Sertoli. Logicamente, essa é uma abordagem *in vitro*, mas é reforçada uma vez que estudos demonstraram eventos de transformação oncogênica associadas à suplementação com vitamina A em humanos (Omenn, 2007). Quando as células foram expostas a concentrações mais altas (10 a 20 μM) observamos um significativo decréscimo de viabilidade, e inovamos ao determinar que a xantina oxidase poderia estar envolvida nesses efeitos citotóxicos. Em ratos, estudos prévios realizados em nosso grupo demonstraram que a suplementação com vitamina A induz dano oxidativo às estruturas do SNC (De Oliveira et al., 2007; De Oliveira et al., 2008), ativação de caspases e decréscimos nos níveis de BDN (manuscritos em revisão) corroborando para a afirmação que a suplementação com vitamina A pode ser citotóxica ao SNC. Sendo a xantina oxidase uma enzima envolvida em diversas situações patológicas do SNC, não podemos desconsiderar a possibilidade de esta estar envolvida nos efeitos tóxicos da vitamina A *in vivo*. Estudos posteriores serão realizados no intuito de responder a essa questão.

5. CONCLUSÕES:

No artigo 1, determinamos que a produção de espécies reativas no compartimento mitocondrial mediou a ativação redox-dependente de JNK, p38 e ERK, e esse evento se mostrou intimamente envolvido na indução de proliferação de células de Sertoli tratadas com 7 μ M de retinol. Neste trabalho também demonstramos que o ácido retinóico, o principal metabólito ativo do retinol, não apresenta qualquer atividade pró-oxidante ou proliferativa. Ao contrário, o ácido retinóico possuiu efeitos antiproliferativos e indutores de diferenciação celular, o que corrobora com boa parte da literatura sobre este retinóide. Portanto, este modelo mostra que a capacidade pró-oxidante e moduladora de sinalização redox foi restrita ao retinol.

No artigo 2, determinamos que o metabolismo do retinol pela xantina oxidase gera a produção de radical superóxido *in vitro*. Tal efeito é potencializado pela presença de NADH, e o sítio enzimático envolvido neste é provavelmente o mesmo daquele utilizado para a produção de superóxido no metabolismo do substrato clássico, a xantina. Também determinamos que a xantina oxidase está envolvida na produção de espécies reativas, no dano oxidativo, e nos efeitos citotóxicos dependentes do retinol em concentrações elevadas.

Portanto, este trabalho colabora ao demonstrar a importância da manutenção dos níveis de retinol dentro da faixa fisiológica, uma vez que pequenas flutuações nos mesmos podem acarretar profundas mudanças no estado oxidativo celular, modulação de vias de sinalização celular e mecanismos de proliferação e morte dependentes da produção de espécies reativas. Além disso, foi demonstrado que diferentes retinóides podem induzir diferentes efeitos na proliferação celular, sugerindo a necessidade de uma

conduta defensiva ao extrapolar os efeitos observados a partir do tratamento com um determinado composto retinóide, não extendendo-os a toda a família “retinóide”. Por fim, demonstramos uma nova fonte de espécies reativas de oxigênio potencialmente envolvida nos efeitos pró-oxidantes da Vitamina A. Em suma, acreditamos com estes estudos colaborar para o entendimento das ações não-clássicas e pró-oxidantes da vitamina A em sistemas biológicos.

6. REFERÊNCIAS:

1. Aggarwal S, Kim SW, Cheon K, Tabassam FH, Yoon JH, Koo S. Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell* 2006; 17:566-575.
2. Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nature Review and Drug Discovery* 2007; 6:793-810.
3. Bollag, W. Vitamin A and retinoids: from nutrition to pharmacotherapy in dermatology and oncology. *Lancet* April 1983; 16: 860-863.
4. Brown D.J. & Goodman J. A review of vitamins A, C and E and their relationship to cardiovascular disease. *Clinical Excellence for Nurse Practitioners* 1998; 2: 10-22.
5. Cañon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda. Rapid effect of retinoic acid on ERK and CREB phosphorylation in neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell* 2004; 15: 5583-5592.
6. Cerniano G, Brandmaier P, Scholz G, Ackermann OP, Alt R, Rothe K, Cross M, Witzigmann H. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *Journal of Pediatric Surgery* 2008; 43(7):1284-1294.
7. Chambon P. The retinoid signaling pathway: Molecular and genetic analyses. *Seminars in Cell Biology* 1994; 5: 115-125.

8. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 31929-31936.
9. Choi B, Hur E-M, Lee J-H, Jun D-J, Kim K-T. Protein kinase C-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *Journal of Cell Science* 2006; 119: 1329-1340
10. Chiu HJ, Fischman DA, Hammerling U. 2008. Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation. *FASEB Journal* 2008; 22(11):3878-87.
11. Dalmolin RJ, Zanotto-Filho A, De Oliveira RB, Duarte RF, Pasquali MA, Moreira JC. Retinol and retinoic acid increase MMP-2 activity by different pathways in cultured Sertoli cells. *Free Radical Research* 2007; 41:1338-1347.
12. Dal-Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, Bernard EA, Moreira JC. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Radical Research* 2001; 34:395-404.
13. Dal-Pizzol F, Klamt F, Dalmolin RJ, Bernard EA, Moreira JC. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated Sertoli cells. *Free Radical Research* 2001; 35:749-755.
14. Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML, Moraes LF, Moreira JC, Benfato MS. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Radical Research* 2000; 33:677-687.

15. de Oliveira RB, Klamt F, Castro MA, Polydoro M, Zanotto Filho A, Gelain DP, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Morphological and oxidative alterations on Sertoli cells cytoskeleton due to retinol-induced reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 271(1-2):189-96.
16. De Oliveira MR, de Bittencourt Pasquali MA, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JC. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain Research* 2007; 1169:112-119.
17. De Oliveira MR, Moreira JCF. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. *Toxicology Letters* 2007; 173:145- 150.
18. De Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello e Souza T, Moreira JCF. Therapeutic vitamin a doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation. *Neurochemistry Research* 2008; 33:378-383.
19. Diplock A.T. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition* 1991; 53: 189S-193S.
20. Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, de Oliveira RB, Dal-Pizzol F, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Moreira JC. Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. *Cellular Signalling* 2006; 18:1685-1694.

21. Gelain DP, Moreira JC, Bevilaqua LR, Dickson PW, Dunkley PR. Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. *Journal Neurochemistry* 2007; 103: 2369-2379.
22. Gelain DP, Moreira JCF. Evidence of increased reactive species formation by retinol, but not retinoic acid, in PC12 cells. *Toxicology in Vitro* 2008; 22:553-558.
23. Gimeno A, Zaragoza R, Vivo-Sese I, Vinã JR, Miralles VJ. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology* 2004;13: 45-54.
24. Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:7757-7763.
25. Goodman GE., Omenn GS, Thornquist MD, Lund B, Metch B, Gyls-Colwell I. The Carotene and Retinol efficacy trial (CARET) to prevent lung cancer in high-risk populations: pilot study with cigarette smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1993; 2: 389 – 396.
26. Goodwin TW. (1963).The biosynthesis of Vitamin A and related compounds. London: Academic.
27. Gudas LJ, Sporn MB, and Roberts AB (1994). Cellular Biology and Biochemistry of the Retinoids. In: *The retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, eds M.B. Sporn, AB Roberts, and DS Goodman, New York: Raven Press, 443-520.

28. Harrison EH and Hassain MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *Journal of Nutrition* 2001; 131: 1405-1408.
29. Holsberger DR, Buchold GM, Leal MC, Kieseewetter SE, O'Brien DA, Hess RA, Francis LR, Kiyokawa H, Cooke PS. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biology of Reproduction* 2005; 72:1429-1436.
30. Hoyos B, Imam A, Chua R, Swenson C, Tong G-X, Levi E, Noy N, Hammerling U. The cysteine-rich regions of the regulatory domains of Raf and protein kinase C as retinoid receptor. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192: 835-845.
31. Hussain MM, Keedes MH, Singh K, Athar H, Jamali NZ. Signpost in the assembly of chylomicrons. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6:320-331.
32. Ichijo H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 1999; 18: 6087-6093.
33. Jeandel C, Nicolas MB, Dubois F, Nabet-Belleville F, Penin F, Cuny G. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology* 1989; 35: 275-282.
34. Jégou B, Sharpe RM. Paracrine mechanisms in testicular control. In: D Kestner, editor. *Molecular biology of the male reproductive system*. San Diego: Academic Press; 1999. P 271-310.
35. Nagai J, Yazawa T, Okudela K, Kigasawa H, Kitamura H, Osaka H. Retinoic Acid Induces Neuroblastoma Cell Death by Inhibiting Proteasomal Degradation of Retinoic Acid Receptor α . *Cancer Research* 64, 7910-7917.

36. Kastner P, Messadeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM., Ward S, Ghyselinck N, Chambon P. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXR beta and RAR alpha lead to early differentiation of embryonic cardiac cardiomyocytes. *Development* 1997; 124: 4749- 4758.
37. Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal* 2006; 18: 2238-2251.
38. Klamt F, Dal-Pizzol F, Bernard EA, Moreira JC. Enhanced UV-mediated free radical generation. DNA and mitochondrial damage caused by retinol supplementation. *Photochemical Photobiology* 2003; 2:856-860.
39. Klamt F, Dal-Pizzol F, Rohers R, Oliveira RB, Dalmolin RJS, Henriques JAP, Andrades HHR, Ramos ALLP, Moreira JCF. Genotoxicity, recombinogenicity and preneoplastic transformation induced by Vitamin A supplementation. *Mutation Research* 2003; 539:117-125.
40. Klamt F, Roberto de Oliveira M, Moreira JC. Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1726:14-20.
41. Kuratomi Y, Kumamoto Y, Yamashita H, Yamamoto T, Inokuchi A, Tomita K. Comparison of survival rates of patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy, 5-fluorouracil and vitamin A (“FAR” therapy) vs FAR therapy plus adjunctive cisplatin and peplomycin chemotherapy. *European Archives of Otorhinolaryngology* 1999; 256: S60–S63.

42. Kurlandsky SB, Xiao JH, Duell EA, Voorhees JJ, Fisher GJ. Biological activity of all-trans retinol requires metabolic conversion to all-trans retinoic acid and is mediated through activation of nuclear retinoid receptors in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:32821-32827.
43. Leithner A., Schnack B, Katterschafka T, Wiltschke C, Amann G, Windhager R. Treatment of extra-abdominal desmoid tumors with interferon-alpha with or without tretinoin. *Journal of Surgical Oncology* 2000; 73(1): 21–25.
44. Liu M, Lavarone A, Freedman LP. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 31723–31728.
45. Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 2002;124:173-180.
46. Mangelsdorf DJ & Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-850.
47. Masiá S, Alvarez S, de Lera AR, Baretino D. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Molecular Endocrinology* 2007; 21: 2391–2402.
48. McDonald PN and Ong DE. Evidence of lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263:12478-12482.

49. Miano JM, and Berk BC. Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circulation Research* 2000; 87: 355-362.
50. Moreira JC, Dal-Pizzol F, Rocha AB, Klamt F, Ribeiro NC, Ferreira CJ, Bernard EA. Retinol-induced changes in the phosphorylation levels of histones and high mobility group proteins from Sertoli cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33: 287-293.
51. Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 2003-2008.
52. Napoli J. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996; 80: S52-S62.
53. Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 15:768-784.
54. Noy N. Retinol-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochemical Journal* 2000; 348: 481-495.
55. Olson JA (2001). Vitamin A. In: *Present knowledge in nutrition*, eds. E.E. Ziegler, L.J. Filer Jr. 7^a edição, International Life Sciences Institute Press, 109-119.
56. Omenn GS. Chemoprevention of lung cancers: lessons from CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial, and prospects for the future. *European Journal of Cancer Prevention* 2007; 16:184-191.
57. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Lund B, Metch B, Gyls-Colwell I. The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung

- cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. *Cancer Research* 1994; 54:2038s-2043s.
58. Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differentiation* 1984; 14: 135–144.
59. Pastorino U, Infante M, Maioli M, Chiesa G, Buyse M, Firket P. Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *Journal of Clinical Oncology* 1993; 11(7): 1216–1222.
60. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin RR. Integrations of non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-mediated signaling by steroids to transcription and cell biology. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 50768 – 50775.
61. Penniston KL, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am Journal of Clinical Nutrition* 2006; 83:191-201.
62. Prabhu R, Thomas S, Balasubramanian KA. Surgical stress-induced alterations in retinoid metabolism in the small intestine: role of oxygen free radicals. *Archives in Biochemical and Biophysical* 2005; 434:299-305.
63. Radominka-Pandya A, Ghen G, Czernick PJ, Little JM, Samokyszyn VM., Carter CA, Nowak G. Direct interaction of all-trans retinoic acid with protein kinase C (PKC). *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 22324-22330.
64. Ross AC. Cellular metabolism and activation of retinoids: role of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB Journal* 1993; 7: 317-327.

65. Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Okumura K, Nakano H et al. NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO Journal* 2003; 22: 3898-3909.
66. Sidell N & Schlichter L. Retinoic acid blocks potassium channels in human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1986; 138: 560-567.
67. Soprano DR & Blaner WS, 1994. Plasma retinol binding-protein. In: *The retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, eds. M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, New York: Raven Press, 443-520.
68. Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, 1994. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, second ed. Raven Press, New York. Chambom 1994.
69. Stone JR, Yang S. Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants and Redox Signaling* 2006; 8: 244 -262.
70. Taibi G, Nicotra CMA. Xanthine oxidase catalyzes the oxidation of retinol. *Journal of Enzyme Inhibition in Medicinal Chemistry* 2007; 22:471-476.
71. Taibi G, Paganini A, Gueli MC, Ampola F, Nicotra CMA. Xanthine oxidase catalyzes the synthesis of retinoic acid. *Journal of Enzyme Inhibition in Medicinal Chemistry* 2001;16:275-285.
72. Tan KP, Kosuge K, Yang M, Ito S. NRF2 as a determinant of cellular resistance in retinoic acid cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 2008 (in press).
73. Thompson DA & Gal A. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003; 22: 683-703.

74. Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of Xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 255:6656-6663.
75. Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* 2006; 147: 96-110.
76. Wassermann GF, Loss ES, Wechsler SW. Retinol stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells through a verapamil-sensitive voltage-dependent-channel. *Medical Science Research* 1995; 23: 633–634.
77. Windbichler GH, Hensler E, Widschwendter M, Posch A, Daxenbichler G, Fritsch E. Increased radiosensitivity by a combination of 9-cis-retinoic acid and interferon-gamma in breast cancer cells. *Gynecologic Oncology* 1996; 61(3): 387–394.
78. Zile MH. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *Journal of Nutrition* 2001; 131: 705-708.
79. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2006; 70:181-190.

