

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

**Estudo dos efeitos da suplementação com palmitato de retinol sobre parâmetros
comportamentais e de estresse oxidativo no encéfalo de ratos de meia-idade e
avaliação do β -caroteno como uma alternativa nutriterapêutica**

CARLOS EDUARDO SCHNORR

Porto Alegre, fevereiro de 2015

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

**Estudo dos efeitos da suplementação com palmitato de retinol sobre parâmetros
comportamentais e de estresse oxidativo no encéfalo de ratos de meia-idade e
avaliação do β -caroteno como uma alternativa nutriterapêutica**

Doutorando: Carlos Eduardo Schnorr

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito
para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, fevereiro de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Schnorr, Carlos Eduardo

Estudo dos efeitos da suplementação com palmitato de retinol sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo no encéfalo de ratos de meia-idade e avaliação do beta-caroteno como uma alternativa nutriterapêutica / Carlos Eduardo Schnorr. -- 2015.

90 f.

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Palmitato de Retinol. 2. Beta-caroteno. 3. Estresse Oxidativo. 4. Sistema Nervoso Central. 5. Comportamento. I. Moreira, José Cláudio Fonseca, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta tese foi realizada no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), Brasil.

“As letras e a ciência só tomarão o seu verdadeiro lugar na obra do desenvolvimento humano no dia em que, livres de toda a servidão mercenária, forem exclusivamente cultivadas pelos que as amam e para os que as amam”

Piotr Kropotkin

AGRADECIMENTOS

Aproveito para tornar público os meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e acadêmico durante o período de realização desta tese. Em particular, agradeço:

- Aos meus familiares, em especial meus pais, Gilberto Schnorr e Eliane de Souza Schnorr, meu irmão, Marcos Vinícius Schnorr, e minha namorada, Ivaine Tais Sauthier Sartor, pelo apoio e amor incondicional. Obrigado por vocês existirem. Obrigado por fazer com que eu me torne a cada dia uma pessoa melhor;
- Ao meu orientador, Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, pela confiança depositada no meu trabalho e pelas suas inúmeras contribuições, críticas e sugestões relevantes durante a orientação. Obrigado também pelo grande exemplo de professor e pesquisador;
- Aos demais professores do PPG Bioquímica e aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a Patrícia Sesterheim e sua equipe de bioteristas, pela competência e pelo esforço conjunto que propiciou todas as condições necessárias para o desenvolvimento da minha tese;
- Aos meus colegas de laboratório, em especial Guilherme Antônio Behr, Fares Zeidán Chuliá, Leonardo da Silva Bittencourt e Thallita Kelly Rabelo, pelo importante suporte durante a realização desta tese e pela grande amizade;
- Aos meus amigos, Vinícius da Costa Vidor, Edoardo Rossi, Carlos Edgar Bergold, Fernando Joner, Henrique Joner, Rafael Lima, Igor Rodrigues, Larissa Paludo Smaniotto, Isabel Cristina Giehl, Carlos Eduardo Barros, Camila dos Reis e ao meu afilhado, João Pedro Barros, por me apoiarem nessa caminhada. Obrigado também pelo exemplo infinito de solidariedade e caráter.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| PARTE 1 | VII |
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| LISTA DE ABREVIATURAS | X |
| INTRODUÇÃO | 11 |
| OBJETIVOS | 24 |
| PARTE 2 | 26 |
| MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS | 27 |
| Capítulo I - Chronic Retinyl Palmitate Supplementation to Middle-aged Wistar Rats Disrupts the Brain Redox Homeostasis and Induces Changes in Emotional Behaviour. | 29 |
| Capítulo II - Supplementation of Adult Rats with Moderate Amounts of β-Carotene Modulates the Redox Status in Plasma without Exerting Pro-Oxidant Effects in the Brain: A Safer Alternative to Food Fortification with Vitamin A? . 42 | |
| PARTE 3 | 54 |
| DISCUSSÃO | 55 |
| CONCLUSÕES | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | |
| Figura 1. Estrutura molecular dos principais vitâmeros da vitamina A. | 20 |
| Figura 2. Metabolismo do beta-caroteno..... | 65 |

PARTE 1

RESUMO

A saúde mental dos adultos mais velhos é uma prioridade para a saúde pública devido a sua vulnerabilidade aos transtornos mentais. Pelo menos em parte, essa vulnerabilidade tem sido atribuída às diversas mudanças que ocorrem no cérebro durante o envelhecimento. Sabe-se também que algumas destas mudanças podem aumentar a vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo, um importante fator fisiopatológico em diversos transtornos mentais. Por sua vez, sabe-se que inúmeros fatores podem induzir estresse oxidativo no cérebro, incluindo o consumo de micronutrientes em quantidades inadequadas. Embora a vitamina A seja um micronutriente essencial para a manutenção da homeostase no cérebro, nesta tese demonstramos que a suplementação crônica com palmitato de retinol para ratos durante a meia-idade induz um estado emocional alterado e estresse oxidativo no encéfalo. Além disso, demonstramos que a suplementação com β -caroteno pode ser uma alternativa mais segura ao palmitato de retinol, induzindo modulações antioxidantes no plasma sem exercer efeitos pró-oxidantes no encéfalo de ratos.

ABSTRACT

The mental health of older adults is a priority for public health because of their vulnerability to mental disorders. At least in part, this vulnerability has been attributed to the various changes that occur in the brain during aging. It is also known that some of these changes may increase the vulnerability of the brain to oxidative stress, an important pathophysiological factor in many mental disorders. In turn, it is known that many factors can induce oxidative stress in the brain, including the intake of micronutrients in inadequate quantities. Although Vitamin A is an essential micronutrient for the maintenance of homeostasis in the brain, this thesis demonstrated that the chronic supplementation with retinyl palmitate to rats during middle age induces an altered emotional state and oxidative stress in the brain. Furthermore, we have demonstrated that supplementation with β -carotene may be a safer alternative to retinol palmitate, inducing antioxidant modulations in plasma without exerting pro-oxidant effects in the brain of rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

GSH - Glutationa

RAE - Equivalentes de Atividade de Retinol

RDA - Dose Diária Recomendada

SOD - Superóxido Dismutase

TRAP - Potencial Antioxidante Redutor Total

UL - Nível Máximo de Ingestão Tolerável

INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais em adultos mais velhos

Os transtornos mentais são condições caracterizadas por alterações cognitivas, do humor e/ou comportamentais capazes de prejudicar e/ou limitar o desempenho de um indivíduo na vida pessoal, familiar, social, no trabalho e nos estudos, sua capacidade de compreensão sobre si mesmo e o ambiente, sua capacidade de autocrítica, sua tolerância aos problemas cotidianos e sua capacidade de sentir prazer com a vida de uma forma geral. Em grande parte, a etiologia destes transtornos é desconhecida ou definida por poucas lesões e/ou anomalias fisiológicas, sendo estes clinicamente diagnosticados com base em um conjunto de sinais, sintomas e limitações funcionais. Um exemplo de transtorno mental definido em grande parte por alterações do humor é a depressão e um exemplo de transtorno mental definido por alterações cognitivas (dificuldade de concentração) e do comportamento (hiperatividade) é o transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (American Psychiatric Association, 2013).

Atualmente, os transtornos mentais são reconhecidos como os principais desafios para a saúde pública no século XXI, conforme os dados de prevalência, morbidade e incapacidade, assim como dados de custo econômico e social. Estima-se que em todo o mundo, ao longo de um ano, praticamente um terço da população adulta sofra de um transtorno mental, sendo mais prevalentes transtornos como a ansiedade, a insônia, a depressão, o déficit de atenção com hiperatividade e a demência (Kessler e Üstün, 2008). Estima-se também que os transtornos mentais sejam responsáveis por aproximadamente 13% de todos os casos de doenças no mundo (superando tanto as doenças cardiovasculares quanto o câncer) e sabe-se que eles possuem uma alta co-

morbidade e interação com diversas doenças físicas (Baxter et al., 2011; Collins et al., 2011). Estima-se ainda que os transtornos mentais sejam a principal causa de anos de vida perdidos por incapacidade (DALYs, disability-adjusted life years), representando 37% dos anos perdidos do total representado por todas as doenças crônicas não transmissíveis (Organização Mundial da Saúde, 2011). Além disso, estima-se que o gasto global com transtornos mentais em 2010 tenha representado aproximadamente 50% de toda a despesa global com saúde (estima-se um valor aproximado de U\$ 2,5 tri), sendo os principais responsáveis os custos relacionados à perda de rendimentos gerada pelo desemprego, às despesas com serviços sociais e outros diversos custos indiretos (Organização Mundial da Saúde, 2011).

Dentro deste contexto é necessário considerar também as inúmeras implicações que o rápido processo de envelhecimento da população mundial e a alta prevalência de transtornos mentais em adultos mais velhos (55 anos ou mais) trarão para a saúde pública e os sistemas sociais, o mercado de trabalho e as finanças públicas (Jané-Llopis e Gabilondo, 2008; Organização Mundial da Saúde, 2013a). É hoje um consenso o fato de que a população mundial está envelhecendo e que este processo de envelhecimento atualmente não está restrito aos países desenvolvidos, mas que algumas das taxas mais rápidas de envelhecimento encontram-se nos países mais pobres (Organização Mundial da Saúde, 2013a). Sabe-se hoje também que a população de adultos mais velhos é mais vulnerável a sofrer de um transtorno mental, sendo particularmente prevalentes os transtornos de humor, os transtornos de ansiedade e o grave comprometimento cognitivo em adultos mais velhos (Organização Mundial da Saúde, 2013b).

Esta vulnerabilidade dos adultos mais velhos aos transtornos mentais tem intrigado a comunidade científica e sua alta prevalência tem sido atribuída pelo menos em parte às conseqüências das diversas alterações estruturais, fisiológicas e moleculares que ocorrem no cérebro durante o envelhecimento. As evidências indicam que durante o envelhecimento ocorre uma gradual diminuição do volume do cérebro, provavelmente em conseqüência da perda de neurônios ou da diminuição do volume neuronal (Fjell e Walhovd, 2010). Elas indicam também que ocorrem outras alterações na substância cinzenta, tais como a retração de neurônios, a diminuição dos espinhos sinápticos e a diminuição do número de sinapses (Fjell e Walhovd, 2010). Da mesma forma, as evidências indicam que ocorre uma considerável redução da substância branca durante o envelhecimento, como resultado da gradual diminuição do comprimento dos axônios mielinizados (Fjell e Walhovd, 2010). As evidências indicam também que ocorre uma gradual diminuição na síntese, captação, liberação e número de receptores de diversos neurotransmissores durante o envelhecimento, sendo particularmente consistentes para as alterações nos sistemas serotoninérgicos, colinérgicos e dopaminérgicos (Strong, 1998; Arivazhagan e Panneerselvam, 2002). Além disso, as evidências indicam um decréscimo importante no nível de outros tipos de receptores no cérebro, assim como a sensibilização dos receptores remanescentes, podendo resultar em respostas farmacológicas exageradas (Fjell e Walhovd, 2010; Cefalu, 2011).

O estresse oxidativo

O estado redox do ambiente celular é reconhecido pela grande comunidade científica como sendo fundamental para praticamente todos os aspectos da biologia, existindo em um estado de equilíbrio dinâmico entre seus diferentes componentes, os oxidantes (radicais livres e espécies reativas) e os antioxidantes (enzimáticos e não-enzimáticos). A manutenção deste estado de equilíbrio dinâmico já foi identificada como sendo essencial para a regulação de inúmeras rotas e redes bioquímicas, e conseqüentemente influencia a saúde do organismo (Cooper et al., 2002; Nathan, 2003; Buettner, 2011). Sabe-se também que o estado redox do ambiente celular também determina o estado e função celular, como proliferação, quiescência, migração, diferenciação e morte celular (Schafer e Buettner, 2001; Burhans e Heintz, 2009; Sarsour et al., 2009). Por outro lado, em determinadas condições pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a atuação dos antioxidantes chamada de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode provocar uma série de oxidações descontroladas e desnecessárias dos componentes celulares, prejudicando os processos de controle e sinalização celular e danificando diferentes macromoléculas, como lipídios, carboidratos, proteínas e ADN (Halliwell e Gutteridge, 2006).

As graves conseqüências do estresse oxidativo para a saúde podem ser evidenciadas pelo fato de que ele tem sido consistentemente apontado na literatura como um importante fator na patofisiologia de inúmeras doenças crônicas de alta prevalência em humanos. A longa lista de patologias inclui doenças como a aterosclerose, o câncer, a diabetes, a artrite reumatoide, as lesões de reperfusão pós-isquêmicas, o infarto do miocárdio, as doenças cardiovasculares, a inflamação crônica,

o acidente vascular cerebral e o choque séptico, o envelhecimento e diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e a esclerose lateral amiotrófica (Emerit, Edeas e Bricaire, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2006; Uttara et al., 2009; Melo et al., 2011). Além disso, os dados obtidos em diversos estudos clínicos e pré-clínicos têm sugerido o estresse oxidativo como um fator patofisiológico comum em diferentes transtornos mentais, como a depressão, a ansiedade, a esquizofrenia e o transtorno bipolar, capazes de provocar alterações no comportamento (Ng et al., 2008; Zhang e Yao, 2013; Salim, 2014).

O alto número de doenças do cérebro que tem sido associadas ao estresse oxidativo não é nenhuma surpresa, visto que o cérebro tem sido considerado como sendo particularmente vulnerável ao estresse oxidativo. Uma das razões reside em sua relativamente alta taxa de consumo de oxigênio e modestas defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2006). Outra razão que contribui é a relativamente alta taxa de produção de radicais livres e espécies reativas pelo metabolismo cerebral, incluindo a produção do radical ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) via atividade das mitocôndrias neuronais e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e das monoamino oxidases A e B (Kudin, Debska-Vielhaber e Kunz, 2005; Gal et al., 2005). Também contribui a existência de um grande conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas dos neurônios e de uma grande quantidade de neurotransmissores auto-oxidáveis nos neurônios, como a dopamina, a serotonina e a noradrenalina (Spencer et al., 1998; Wrona e Dryhurst, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2006). Além disso, o cérebro possui uma grande quantidade de ferro e cobre que podem ser liberados durante o dano oxidativo e catalisar reações de formação de radicais livres, assim como muitos aminoácidos excitotóxicos que, quando liberados durante o dano

oxidativo, possuem um grande potencial para danificar neurônios (Mailly et al., 1999; Burdo e Connor, 2003; Zecca et al., 2004).

Durante o envelhecimento, algumas mudanças podem contribuir para tornar o cérebro dos adultos mais velhos ainda mais vulnerável ao estresse oxidativo. Sabe-se que durante o envelhecimento ocorre um declínio gradual nas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas no cérebro como um todo, diminuindo sua capacidade de converter radicais livres e espécies reativas em moléculas menos reativas (Camougrand e Rigoulet, 2001; Gemma et al., 2007). Sabe-se também que durante o envelhecimento ocorre um aumento gradual na taxa de disfunção mitocondrial no cérebro, que pode ser caracterizada pelo aumento na taxa de transferência de elétrons e pela diminuição do potencial de membrana, resultando em um importante aumento da produção de radicais livres e espécies reativas (Gemma et al., 2007; Boveris e Navarro, 2008; Navarro e Boveris, 2010). Além disso, sabe-se que durante o envelhecimento ocorre uma diminuição gradual das maquinarias moleculares de reparo responsáveis por remover e substituir biomoléculas oxidadas em todo o cérebro, resultando em um acúmulo progressivo de dano oxidativo à ADN, lipídios, carboidratos e proteínas (Camougrand e Rigoulet, 2001; Mariani et al., 2005; Gemma et al., 2007).

A alimentação como um fator determinante da saúde mental

A alimentação é um dos principais fatores determinantes da saúde identificado pela comunidade científica e seu papel-chave na origem, progressão e gravidade de inúmeras condições mentais tem sido apontado de forma bastante consistente (Strümpel e Billings, 2008; Lakhan e Vieira, 2008). Particularmente interessantes são as evidências de que até mesmo o consumo inadequado de um único micronutriente pode ter efeitos adversos sobre a saúde mental. Atualmente, sabe-se que mesmo a deficiência subclínica de zinco e ferro pode causar distúrbios cognitivos em crianças e adultos (Tu et al., 1994; Gardner et al., 2005; Murray-Kolb e Beard, 2009). Sabe-se também que fadiga e alterações psicológicas estão associadas à deficiência de vitamina C, assim como sabemos que a deficiência de vitamina D pode precipitar ou predispor um indivíduo aos transtornos de humor, como a depressão (Wilkins et al., 2006; Jorde et al., 2008; Evans-Olders, Eintracht e Hoffer, 2010). Sabe-se ainda que a deficiência em tiamina e niacina pode ser identificada por um estado de estupor, confusão, psicose ou disfunção cognitiva (Sydenstricker e Cleckley, 1941; Botez et al., 1993). Sabe-se também que a deficiência de vitamina B12 pode apresentar transtornos mentais como sua primeira manifestação clínica, sendo a disfunção cognitiva particularmente comum em adultos mais velhos (Hector e Burton, 1988; Smith e Refsum, 2009; Tangney et al., 2009). É também conhecida a associação entre a depressão e a inibição da resposta aos fármacos antidepressivos com a deficiência de ácido fólico (Das, 2008; Farah, 2009). Além disso, sabe-se que a função cognitiva durante o envelhecimento pode ser preservada e até mesmo a demência precoce prevenida pelo consumo habitual de ácido fólico e ácido graxos ômega 3 (Vogel et al., 2009; Cole, Ma e Frautschy, 2009).

Por outro lado, uma parcela da população mundial pode estar também sendo exposta ao consumo excessivo de micronutrientes, pois existem inúmeras evidências de que o consumo de suplementos alimentares é elevado em diversos países, sendo particularmente popular entre os adultos mais velhos (Skully e Saleh, 2011; Troesch, Eggersdorfer e Weber, 2012). Considerando que todas as vitaminas possuem inúmeras atividades fisiológicas e farmacológicas, o consumo de suplementos alimentares também pode ter um impacto importante sobre a saúde mental (Rogovik, Vohra e Goldman, 2010). Isso ocorre principalmente porque grande parte dos suplementos alimentares parece estar sendo consumida de forma descontrolada (em muitos países não há necessidade de uma receita médica para a compra de suplementos alimentares) e desnecessária, mesmo sem evidências claras do de benefícios para a saúde de adultos mais velhos saudáveis (Skully e Saleh, 2011; Troesch, Eggersdorfer e Weber, 2012).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 49% da população adulta americana, 32% da população adulta canadense e pelo menos 15% da população adulta australiana consuma um ou mais tipos de suplementos alimentares (McLennan e Podger, 1997; Gahche et al., 2011; Guo et al., 2009). Estima-se também que o consumo habitual de suplementos alimentares seja elevado em outros países como a Dinamarca (64%), a Suécia (41%), os Países Baixos (34%), o Reino Unido (24%) e a França (20%) (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007; Bates, Lennox e Swan, 2009; Skeie et al., 2009; van Rossum et al., 2011). É importante também salientar que a vitamina A parece ser um micronutriente bastante popular em suplementos alimentares, sendo um componente ativo consumido por aproximadamente 50% da população em suplementos multivitamínicos e por até 10% da população em suplementos isolados (Rothman et al., 1995; Penniston e Tanumihardjo, 2006). Os possíveis riscos deste alto

consumo de suplementos alimentares com vitamina A são particularmente importantes para os adultos mais velhos devido às mudanças que ocorrem no metabolismo da vitamina A durante o envelhecimento, como uma diminuição da taxa de armazenamento no fígado e da taxa de depuração plasmática, podendo representar um maior risco para adultos mais velhos (Penniston e Tanumihardjo, 2006).

O papel da vitamina A como um determinante da saúde mental

A vitamina A é, por definição, um micronutriente lipossolúvel, sem valor energético, que é essencial para a vida. Ela não é sintetizada *de novo* em quantidades suficientes pelo nosso organismo e por isso deve ser obtida através da dieta, onde é encontrada tanto na forma de retinol ou ésteres de retinol em alimentos de origem animal, como fígado, rim, peixes gordurosos, produtos lácteos e ovos, quanto na forma de carotenóides com atividade pró-vitamina A em alimentos de origem vegetal, como cenoura, batata doce, abóbora, brócolis e couve (Bender, 2003; Otten, Hellwig e Meyers, 2006) (Figura 1). Atualmente, a Dose Diária Recomendada (RDA) e o Nível Máximo de Ingestão Tolerável (UL) para a vitamina A são de 900 e 3000 equivalentes de atividade de retinol (RAE) respectivamente (Bender, 2003; Otten, Hellwig e Meyers, 2006). Os RAE são uma nova unidade de medida de atividade da vitamina cujo uso é recomendado por considerar os dados mais recentes sobre a absorção dos carotenóides com atividade pró-vitamina A e por facilitar a comparação dos benefícios de diferentes fontes de vitamina A. Neste novo sistema 1 RAE é equivalente a 1 μg de retinol, 2 μg de β -caroteno em suplementos, 12 μg de β -caroteno e 24 μg de outros carotenóides com atividade pró-vitamina A (Bender, 2003; Otten, Hellwig e Meyers, 2006).

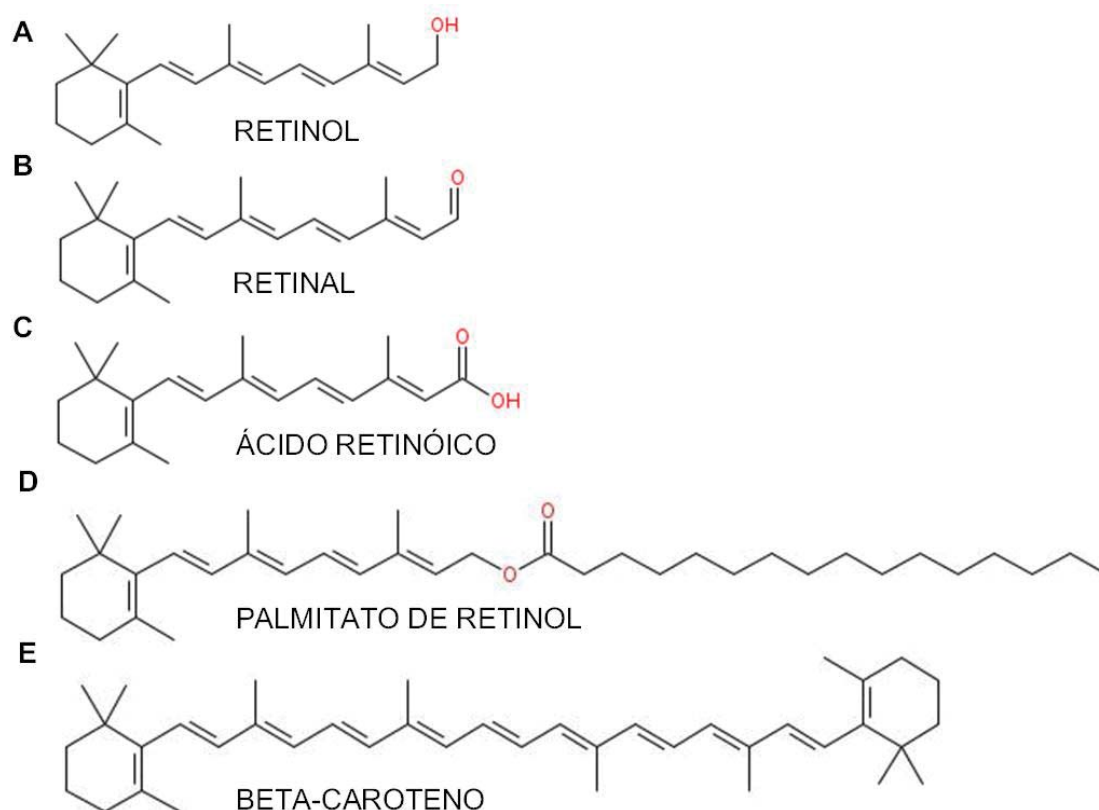


Figura 1. Estrutura molecular dos principais vitâmeros da vitamina A. Retinol (A), retinal (B), ácido retinóico (C), palmitato de retinol (D) e beta-caroteno (E). Todas as estruturas moleculares foram obtidas em Molecular Networks (<http://www.molecular-networks.com>), 2015.

A importância do consumo de uma quantidade adequada de vitamina A é evidenciada pelos severos efeitos associados a sua deficiência e ao seu excesso, afetando principalmente o tecido epitelial, ósseo, hepático e nervoso (Bender, 2003; Otten, Hellwig e Meyers, 2006). Ela participa de diversos processos celulares, tais como a diferenciação celular, o crescimento celular, o controle do ciclo celular e a resposta celular a injúria (Bender, 2003; Otten, Hellwig e Meyers, 2006; Harrison, 2012). Sendo uma das vitaminas mais multifuncionais no corpo humano, ela é essencial para inúmeros processos biológicos, tais como a visão, a reprodução, o crescimento e o desenvolvimento embrionário, a competência imunológica e a manutenção das diferentes superfícies epiteliais (Bender, 2003; Otten, Hellwig e Meyers, 2006).

No tecido nervoso, a vitamina A é importante durante todas as etapas da vida, do desenvolvimento a vida adulta. Durante o desenvolvimento, a vitamina A é essencial para a regulação da diferenciação neuronal, do crescimento dos neuritos e da padronização do eixo ântero-posterior do tubo neural (McCaffery e Drager, 2000; Maden, 2002; McCaffery et. Al., 2003). Na vida adulta, ela é importante na regulação da síntese de neurotransmissores, da plasticidade sináptica, da neurogênese adulta e da sinalização dopaminérgica, necessárias para processos como memória e aprendizado, função locomotora e atividade exploratória, assim como resposta emocional (Lane e Bailey, 2005; Bremner e McCaffery, 2008). Acredita-se também que uma diminuição na sinalização por retinóides no cérebro durante o envelhecimento possa estar associada com o declínio de algumas funções cognitivas (Mingaud et al., 2008).

A vitamina A exerce estas suas inúmeras funções biológicas através de diversos mecanismos de ação, usualmente categorizados em ações genômicas e ações não-genômicas da vitamina A (Bender, 2003; Tanoury, Piskunov e Rochette-Egly, 2013). Em particular, nosso grupo tem se dedicado nos últimos anos a investigar as ações não-genômicas da vitamina A e nosso grupo inclusive tem proposto que as modulações induzidas pela vitamina A sobre o estado redox do ambiente celular estão envolvidas diretamente na regulação de sua sinalização não-genômica (Gelain, 2008). A vitamina A é uma moléculas que pode ser definida como possuindo propriedades redox-ativas, pois ela pode atuar como um agente antioxidante ou pró-oxidante. Por exemplo, sabe-se que em quantidades adequadas a vitamina A atua como um importante antioxidante e que sua diminuição no organismo representa um aumento da vulnerabilidade geral aos problemas de saúde associados ao estresse oxidativo (Jeandel et al., 1989; Diplock,

1991; Brown e Goodman, 1998). Por outro lado, sabe-se também que em quantidades aumentadas a vitamina A pode se comportar como um agente pró-oxidante em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Sabe-se que em experimentos *in vitro* e em células de Sertoli ela induz um aumento da produção de $\bullet\text{O}_2^-$, modula a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta o dano oxidativo a lipídios, proteínas e ADN (Murata e Kawanishi, 2000; Dal-Pizzol et al., 2001; Pasquali et al., 2008). Sabe-se também que a suplementação com vitamina A em doses terapêuticas induz um estado pró-oxidante em diferentes tecidos, incluindo o pulmão, o coração e o cérebro de ratos Wistar (De Oliveira et al, 2008; Pasquali et al., 2009; Pasquali et al., 2010; Rocha et al., 2010; De Oliveira et al., 2011; Schnorr et al., 2011).

O β -caroteno como uma alternativa nutriterapêutica

Considerando: (i) os inúmeros efeitos adversos associado com a suplementação com ésteres de retinol em humanos e (ii) as inúmeras evidências acumuladas pelo nosso grupo ao longo dos anos indicando que a suplementação com ésteres de retinol é capaz de induzir o estresse oxidativo no cérebro de ratos (De Oliveira et al, 2008; De Oliveira et al., 2011; Schnorr et al., 2011), acreditamos que seja nossa responsabilidade procurar por uma alternativa nutriterapêutica mais segura aos ésteres de retinol, mas que também exerça as atividades biológicas da vitamina A. Neste contexto, os carotenóides de importância alimentar com atividade pró-vitamina A são candidatos naturais para se tornarem uma alternativa nutriterapêutica mais segura aos ésteres de retinol.

Entre os carotenóides com importância nutricional, o β -caroteno é o mais estudado. Ele é obtido na dieta a partir de vegetais de folhas verde-escuras (espinafre,

brócolis, couve, etc.) e frutas/legumes laranja e amarelo (cenoura, abóbora, manga, mamão, etc.) (Lessin e Schwartz, 1997). Embora atualmente não exista uma RDA específica para o β -caroteno, sua contribuição para o consumo de vitamina A é importante para uma parcela considerável da população (Otten, Hellwig e Meyers, 2006). Sabe-se que o β -caroteno possui a mais alta atividade pró-vitamina A entre todos os carotenóides estudados (Grune et al., 2010; Yeum e Russel, 2002). Além disso, o β -caroteno é proposto como sendo um antioxidante natural capaz de interceptar e neutralizar os radicais livres e prevenir o estresse oxidativo (Lane, 2004;. Valko et al., 2007; Young e Lowe, 2001). Por outro lado, existe também na literatura algum ceticismo quanto ao seu potencial antioxidante *in vivo*, assim como algumas evidências limitadas indicando que ele possa exercer um efeito pró-oxidante (The ATBC Study Group, 1994; Omenn et al., 1996; Rice-Evans et al., 1997; Halliwell, 1999; Young e Lowe, 2001; Briviba et al., 2004).. Entretanto, apesar do interesse da comunidade científica, nenhum trabalho até hoje investigou os efeitos do consumo de suplementos com β -caroteno sobre parâmetros de estresse oxidativo no cérebro.

OBJETIVOS

Considerando os dados e o contexto apresentados na INTRODUÇÃO, o objetivo central desta tese foi **avaliar o potencial do β -caroteno como uma alternativa nutriterapêutica mais segura ao palmitato de retinol**. Assim, esta tese teve como objetivos específicos:

Estudo 1: Investigar os efeitos da suplementação diária com palmitato de retinol em doses de 300, 600 e 3000 RAE para ratos de meia-idade durante 28 dias sobre os seguintes parâmetros:

- a) Alterações comportamentais no teste do campo aberto, como um indicativo da reatividade emocional dos animais suplementados;
- b) Alterações no nível de diferentes marcadores de dano oxidativo, como um indicativo de estresse oxidativo no fígado e no encéfalo (cerebelo, hipocampo, estriado e córtex);
- c) Alterações no potencial antioxidante redutor total, como um indicativo do status das defesas antioxidantes não-enzimáticas no fígado e no encéfalo (cerebelo, hipocampo, estriado e córtex);
- d) Modulação da atividade das enzimas antioxidantes, como um indicativo do status das defesas antioxidantes enzimáticas no fígado e no encéfalo (cerebelo, hipocampo, estriado e córtex).

Estudo 2: Investigar os efeitos da suplementação diária com β -caroteno em doses de 300, 600 e 3000 RAE para ratos adultos durante 28 dias sobre os seguintes parâmetros:

- a) Modulação da atividade das enzimas antioxidantes, como um indicativo do status das defesas antioxidantes enzimáticas no cérebro (hipocampo, estriado e córtex);
- b) Alterações no potencial antioxidante redutor total, como um indicativo do status das defesas antioxidantes não-enzimáticas no plasma;
- c) Alterações no nível de diferentes marcadores de dano oxidativo, como um indicativo de estresse oxidativo no plasma e no cérebro (hipocampo, estriado e córtex).

PARTE 2

MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS

Nesta tese, os MATERIAIS E MÉTODOS, assim como os RESULTADOS, estão redigidos de forma detalhada nos dois artigos científicos (Estudo I e Estudo II). Entretanto, algumas informações adicionais a respeito do modelo experimental e das doses investigadas nos dois estudos são fornecidas abaixo.

Modelo Experimental

Em virtude das inúmeras dificuldades técnicas e barreiras éticas para a realização de estudos de nível molecular no cérebro humano, utilizamos um modelo experimental animal para avaliar seletivamente alterações comportamentais (Estudo I) e bioquímicas em diferentes regiões do cérebro (Estudo I e II). Em ambos os estudos optamos por utilizar os ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) porque eles são consideravelmente mais calmos e fáceis de manipular do que os camundongos, considerando-se a frequência de pesagens e de gavagens orogástricas. Assim, no Estudo I foram utilizados ratos Wistar de meia-idade (12 meses) porque eles apresentam um declínio cognitivo e um processamento emocional muito semelhante ao apresentado por adultos mais velhos enquanto no Estudo II foram utilizados ratos Wistar adultos jovens (110-120 dias) (Fjell e Walhovd, 2010; Moretti et al., 2011). A utilização de ratos e camundongos em trabalhos científicos para avaliar os efeitos da vitamina A tem sido amplamente aceitos na literatura, devido a sua semelhança com humanos no metabolismo e distribuição tecidual destas moléculas (Kerr et al., 1982; Branzzell et al., 1983; Nulman et al., 1998; Hendrix et al., 2004; Ferguson et al., 2006).

Tratamento

Outro ponto crítico para a realização desta tese foi o estabelecimento de doses experimentais apropriadas para avaliar as possíveis conseqüências do consumo crônico de suplementos com vitamina A utilizando um modelo animal. Por isso, as doses utilizadas nos dois estudos que compõem esta tese (300, 600 e 3000 RAE/kg/dia) foram obtidas a partir da extrapolação alométrica das doses consumidas em suplementos alimentares e da aplicação de um fator de avaliação padrão para considerar também a maior resistência dos ratos aos efeitos tóxicos da vitamina A (Expert Group on Vitamins and Minerals, 2003; US Food and Drug Administration, 2005; Otten, Hellwig e Meyers, 2006). Além disso, nos dois estudos a suplementação foi administrada via gavagem orogástrica por se tratar de uma forma rápida e eficiente para a administração de drogas diretamente no estômago (Turner et al., 2012). Recentemente, a gavagem intragástrica diária foi avaliada como um procedimento que não provoca angústia, estresse ou sofrimento em ratos quando realizada por indivíduos treinados e quando os ratos são devidamente habituados a manipulação (Turner et al., 2012).

Estudo I

Capítulo I - Chronic Retinyl Palmitate Supplementation to Middle-aged Wistar Rats Disrupts the Brain Redox Homeostasis and Induces Changes in Emotional Behaviour.

Artigo aceito para publicação no periódico Molecular Nutrition & Food Research (MNFR201400637.R2).

ISI Impact Factor 2013: 4,909

| | | | | |
|--------|---------|---------------|-----------------------------|-----------|
| APTARA | MNFR | mnfr201400637 | Dispatch: February 25, 2015 | CE: |
| | Journal | MSP No. | No. of pages: 12 | PE: XXXXX |

RESEARCH ARTICLE

Chronic retinyl palmitate supplementation to middle-aged Wistar rats disrupts the brain redox homeostasis and induces changes in emotional behavior

Carlos Eduardo Schnorr, Leonardo da Silva Bittencourt, Lyvia Lintzmaier Petiz, Daniel Pens Gelain, Fares Zeidán-Chuliá and José Cláudio Fonseca Moreira

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

Scope: Aging process makes older adults especially vulnerable to neurodegeneration and mental disorders. Overconsumption-related neurotoxic effects of certain dietary nutrients by older population could represent a contribution factor for the development of neuropsychiatric conditions by this subpopulation. Thus, we here investigated whether chronic supplementation with retinyl palmitate, at doses commonly found in vitamin supplements (300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day), could have an impact on emotional behavior of middle-aged Wistar rats. **Methods and results:** We report that supplementation with retinyl palmitate for 28 days induces an altered emotional state of middle-aged Wistar rats and oxidative stress in cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, and striatum, associated with imbalance of enzymatic antioxidant defences, decrease in nonenzymatic antioxidant defences, and increase in protein and lipid damages.

Conclusion: Our data show evidence for (i) changes in emotional reactivity, similar to anxiety, in middle-aged rats chronically supplemented with retinyl palmitate; and (ii) suggest a possible interrelation between pro-oxidant events in the brain and these differences in the behavioral profile that cannot be attributed to hepatotoxicity. Our results invite for additional studies to further investigate such interrelation.

Keywords:

Mental disorders / Nutritherapeutics / Older adults / Toxicity / Vitamin A

Received: September 10, 2014

Revised: January 29, 2015

Accepted: January 30, 2015

1 Introduction

Prevalence, burden of disease, and disability highlight mental disorders among older adults as a major public health problem. Currently, it is estimated that around 20% of the

population (≥ 50 years old) are experiencing some kind of mental health problem [1, 2]. Most common conditions (in order of prevalence) are anxiety, including phobias and generalized anxiety disorder, severe cognitive impairment (e.g. Alzheimer's disease), and mood disorders (e.g. depression) [1]. In addition, mental disorders are well-known risk factors for different physical diseases and collectively account for 23–30% of the overall burden of diseases from all causes, surpassing all forms of cancer and cardiovascular problems [1, 3, 4]. Furthermore, the burden of disability among mental disorders in older adults negatively affects their adherence to treatments and significantly impairs their quality of life [1, 5].

High prevalence of mental disorders in older adults could be considered, at least in part, a consequence of age-related structural and biochemical changes increasing their vulnerability. The aging brain undergoes progressive decrease of gray and white matters, mainly due to neuronal loss, shrinkage of neurons, and decrease in the length of myelinated axons [6]. In addition, one notable biochemical change is

Correspondence: Dr. Carlos Eduardo Schnorr, Rua Ramiro Barcelos 2600, Anexo Depto. Bioquímica, Lab 32; CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: ceschnorr@gmail.com

Fax: +55-51-33085535

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; GST, glutathione S-transferase; HED, human equivalent doses; mcg, microgram; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OFT, open field test; OH, hydroxyl radical; PKB, protein kinase B; PER, summatory of catalase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase activities; RAE, retinol activity equivalents; ROS, reactive oxygen species; SH, total reduced thiol; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; TRAP, total reactive antioxidant potential

the progressive decrease in enzymatic and nonenzymatic antioxidant defences capable of transforming reactive oxygen species (ROS) into less toxic or nontoxic species [7, 8]. Aging also decreases repair enzymes that remove and replace damaged biomolecules in the brain, resulting in higher oxidative damage [8]. In turn, growing evidence indicate a role for oxidative stress and redox deregulation in the development of mental disorders. Preclinical data suggest oxidative-related mechanisms as common pathogenic pathway for depression, anxiety disorders, schizophrenia, and bipolar disorder, yielding altered behavior [9–11].

With all, vulnerability itself might not be enough to cause mental disorders in older adults. Nutrition is a main health determinant known to play a key role in the onset, severity, and duration of several mental conditions [12, 13]. The lack (or excess) of certain dietary nutrients, such as essential vitamins, minerals, and omega-3 fatty acids, is reported to contribute to the etiology of such conditions, probably due to impairment in redox homeostasis [14–16]. For instance, in vitro and in vivo experimental models confirmed the ability of vitamin A to induce changes on the environmental redox status. Vitamin A is able to increase superoxide radical anion ($O_2^{\cdot-}$) production and oxidative damage to DNA in vitro [17]. In Sertoli cells, vitamin A induces oxidative damage to lipids, proteins, and DNA, modulating the activity of antioxidant enzymes [18, 19]. In addition, vitamin A induces apoptotic cell death through redox deregulation in vitro [20]. Furthermore, supplementation with therapeutic doses of retinyl palmitate to young adults and pregnant Wistar rats induces prooxidant effects in the brain and decreases locomotor activity and exploratory behavior [22–24].

We here investigated (i) the effects of chronic retinyl palmitate supplementation at doses of 300, 600, and 3000 microgram (mcg) of retinol activity equivalents (RAE)/kg/day in the brain of middle-aged Wistar rats, (ii) we analyzed the behavioral effects of orogastric supplementation with RP for 28 days by analyzing classical and ethological parameters in the open field test (OFT), and (iii) we checked for potential changes in the brain redox-related parameters in supplemented animals, including enzymatic antioxidant defences, nonenzymatic antioxidant defences, and markers of oxidative damage to lipids and proteins in different brain regions.

2 Material and methods

The Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul reviewed and approved the study protocol (project number 21563). All experimental procedures were made in accordance with the recommendations of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL-COBEA) and the US National Institute of Health [25].

2.1 Animals and experimental design

Middle-aged Wistar rats (12 months old *Rattus norvegicus*) were used as a reliable experimental model with very similar cognitive decline and emotional processing than those presented by older adults; probably better reflecting the effects of retinyl palmitate supplementation in this subpopulation [6, 26]. Experimental animals were obtained from our breeding colony and were kept in groups of 2–3 animals in polypropylene cages (approximately 41 × 34 × 16 cm) with wire bar lids and pine shaving as bedding (Maravalha Rossa Ltda., Porto União, SC, Brazil). These animals were maintained in standard conditions with 12 h light-dark cycle (lights off at 7:00PM), at constant temperature ($22 \pm 4^\circ\text{C}$) and humidity (30–70%), with free access to water and standard food (CR1 lab chow, Nuvilab Ltda., Curitiba, Brazil; 12 000 IU/kg, or 3.6 µg RAE/g).

2.2 Chemicals

Arovit[®] (a water-soluble commercial formula of retinyl palmitate) was purchased from Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Potassium phosphate monobasic and potassium phosphate dibasic were purchased from Merck KGaA[®], Darmstadt, Germany. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA.

2.3 Grouping and supplementation

Middle-aged rats were randomly assigned to four experimental groups and supplemented for 28 days via orogastric gavage with either 0.9% saline (control group) or retinyl palmitate at doses of 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day. Human equivalent doses (HED) were calculated according to the FDA guidelines by using the dose-by-factor approach (5, 10, and 50 mcg of RAE/kg/day, or approximately 300, 600, and 3000 mcg of RAE/day) [27]. HED are similar to those readily available in dietary supplements and are below the tolerable upper intake level of 3000 mcg of RAE/day for vitamin A [28, 29].

A stock solution of retinyl palmitate was daily prepared in 0.9% saline, protected from light and heat exposure. Animals were weekly weighed and 0.5 mL was the maximum volume of gavage. Since vitamin A is best absorbed when taken during (or after) meals, supplementation was performed at the beginning of the dark phase (8:00 PM). Appropriate procedures were taken to minimize pain and discomfort to animals.

2.4 Behavioral analyses

The OFT is widely used to elucidate drug-induced behavioral effects in rodents and provides simultaneous measures of

general locomotor activity, novel environment exploration, and anxiety-related behavior [30, 31]. OFT was conducted during the last day of supplementation at the light phase (between 8:00 AM and 11:00 AM) and employed an 80 cm circular diameter arena with walls 40 cm high. During the test, all animals were individually and gently placed on the apparatus to freely explore it for 5 min and then returned to their home cages. All tests were recorded with ANY-maze Video tracking Software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) and a number of conventional and etiological parameters were collected during the session [31]. The total distance travelled was analyzed as parameter of general locomotor activity. Activity time and number of rearing were analyzed as parameters of novel environment exploration. Time and travelled distance in the periphery area, time and travelled distance in centre area, and number of centre area entries (the animal enters the centre of the apparatus with four paws) were analyzed as parameters for novel environment exploration and anxiety-related behavior. Freezing time, number of periphery area returns (the animal enters the centre area of the arena with just its front paws and returns to the periphery area), number of grooming, and number of *fecal boli* were analyzed as parameters of anxiety-related behavior.

2.5 Biochemical analyses

Animals were killed by decapitation 24 h right after the last administration of retinyl palmitate. The liver and brain (cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, and striatum) from each animal were separated by dissecting on ice and immediately stored at -80°C . For analysis, tissues were homogenized in 50 mM PBS at pH 7.4, centrifuged to remove cell debris ($10\,000 \times g$, 10 minutes), and finally, the supernatant was collected. All results were normalized for protein content using BSA as standard [32].

2.5.1 Analyses of the enzymatic antioxidant defences

Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST) activities were analyzed as a measure of the enzymatic antioxidant defences. SOD (EC 1.15.1.1) activity was determined by the sample-induced inhibition rate upon the superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation measured over 10 min kinetics at 480 nm [33]. CAT (EC 1.11.1.6) activity was determined by the decrease rate of hydrogen peroxide (H_2O_2) absorbance measured over 5 min kinetics at 240 nm [34]. GPx (EC 1.11.1.9) activity was determined by the decrease rate of tert-butyl hydroperoxide absorbance measured over 6 min kinetics at 340 nm [35]. GST (E.C. 2.5.1.18) activity was determined by the increase rate of conjugated glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene absorbance measured over 3 min at 340 nm [36]. In addition, the ratio between SOD

and the summatory of CAT, GPx, and GST activities (PER) was analyzed for better comprehension of retinyl palmitate supplementation-induced effects upon the enzymatic antioxidant system, since all these enzymes work in enzymatic pathways to convert superoxide anion into water [37]. Results were expressed as U SOD/mg protein, U CAT/mg protein, U GPx/mg protein, U GST/mg protein, and SOD/PER ratio.

2.5.2 Analysis of the non-enzymatic antioxidant defence

Total reactive antioxidant potential (TRAP) was measured as an index of nonenzymatic antioxidant defence [38]. Briefly, 2,2-azobis[2-amidinopropane] was dissolved in 100 mM glycine buffer pH8.6 and mixed with 4 mM luminol to prepare a peroxy radical system generator. Then, sample reaction with peroxy radical was measured as the decrease of luminescence counts per second for 1 h. Results were then transformed in percentage and expressed as TRAP (% of control) [39].

2.5.3 Analyses of redox status in biomolecules (proteins and lipids)

Total reduced thiol (SH) content was determined as an estimation of the overall redox status of the cellular environment [40]. Briefly, samples were mixed in a slightly alkaline medium with 10 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid prepared in ethanol. SH content was determined after 60 min by the absorbance at 412 nm and results were expressed as $\mu\text{mol SH/mg protein}$. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation was measured as an index of lipid peroxidation [41]. Briefly, samples were deproteinized with 10% trichloroacetic acid and the supernatant was heated with 0.67% thiobarbituric acid for 25 min. TBARS level was determined by the absorbance at 532 nm and results were expressed as $\text{nmol TBARS/mg protein}$. Carbonyl groups were measured as an index of protein oxidation [42]. Briefly, samples were mixed with 10% trichloroacetic acid, supernatant removed, and pellet dissolved in 2,4-dinitrophenylhydrazine. Carbonyl content was determined by the absorbance at 370 nm and results were expressed as $\text{nmol carbonyl/mg protein}$.

2.6 Statistical analysis

Body weight was analyzed by repeated measures two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test. Supplementation and animal age were established as analysis factors. Biochemical data were analyzed using the one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. All data were analyzed with GraphPad Prism Software v.5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Results were

Table 1. Body weight of retinyl palmitate supplemented well-fed middle-aged Wistar rats versus control animals

| | Retinyl palmitate (mcg of RAE/kg/day) | | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|----------|----------|----------|
| | 0 (control) | 300 | 600 | 3000 |
| Number of supplemented rats | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Day 0 | 546 ± 10 | 522 ± 11 | 532 ± 13 | 544 ± 14 |
| Day 7 | 554 ± 10 | 525 ± 11 | 537 ± 14 | 548 ± 15 |
| Day 14 | 553 ± 10 | 520 ± 10 | 546 ± 20 | 541 ± 15 |
| Day 21 | 556 ± 9 | 519 ± 10 | 530 ± 14 | 542 ± 16 |
| Day 28 | 553 ± 9 | 525 ± 10 | 539 ± 15 | 546 ± 15 |

No difference in body weight was observed in the experimental animals supplemented with retinyl palmitate for 28 days. Results are expressed as the mean ± SD ($n = 8$ animals/group).

expressed as the mean ± SEM; p values were considered significant when $p \leq 0.05$.

3 Results

3.1 Body weight

Chronic retinyl palmitate supplementation with 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day did not induce overt toxic effects in middle-aged Wistar rats. Animals showed no treatment-related clinical signs of toxicity throughout experimentation or abnormal gross lesions at necropsy examination. Body weight was neither affected by retinyl palmitate supplementation at doses of 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day (Table 1).

3.2 Behavioral analyses

Chronic retinyl palmitate supplementation induced changes in exploratory and anxiety-related behavior, but not in locomotor activity, of middle-aged Wistar rats (Fig. 1). Supplementation did not change the total distance travelled (Fig. 1A), but the time spent to explore the apparatus decreased at 3000 mcg of RAE/kg/day ($p \leq 0.05$; Fig. 1B) and the number of rearing significantly decreased with 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day ($p \leq 0.05$; Fig. 1C). In addition, retinyl palmitate supplementation did not induce changes in distance travelled and time spent in the periphery area (Fig. 1D and E). However, the distance travelled in the centre area was decreased at all tested doses ($p \leq 0.05$; Fig. 1F) and only supplementation with 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day decreased the time spent in the centre area as well as the number of centre area entries ($p \leq 0.05$; Fig. 1G, H). In addition, supplementation with 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day increased the freezing time ($p \leq 0.05$; Fig. 1I) and doses of 3000 mcg of RAE/kg/day increased the number of periphery returns ($p \leq 0.05$; Fig. 1J). Neither grooming nor changes in the number of fecal boli were observed in these animals supplemented with 3000 mcg of RAE/kg/day (Fig. 1K, L).

3.3 Biochemical analyses

3.3.1 Enzymatic antioxidant defences

Chronic retinyl palmitate supplementation did not induce changes in antioxidant enzyme activities in the liver of middle-aged Wistar rats (Table 2). In contrast, several changes in antioxidant enzymes activities were observed in the brain (Table 3). Supplementation with 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day increased the cerebellar SOD activity ($p \leq 0.05$). All tested doses increased SOD activity ($p \leq 0.05$) in the cerebral cortex. At doses of 3000 mcg of RAE/kg/day, we also observed an increase in GPx activity ($p \leq 0.05$). In the hippocampus, doses of 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day increased SOD activity ($p \leq 0.05$) while 3000 mcg of RAE/kg/day decreased CAT activity ($p \leq 0.05$) and increased GST activities ($p \leq 0.05$). In the striatum, supplemented doses of 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day increased SOD ($p \leq 0.05$) but decreased CAT activity ($p \leq 0.05$).

Changes observed in the antioxidant enzyme activities also increased the SOD/PER ratio in the brain of supplemented middle-aged Wistar rats (Fig. 2). Supplementation with 3000 mcg of RAE/kg/day increased the SOD/PER ratio in the cerebellum ($p \leq 0.05$). Supplementation with 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day increased the SOD/PER ratio in the cerebral cortex ($p \leq 0.05$). Additionally, supplementation with 3000 mcg of RAE/kg/day increased the SOD/PER ratio in the hippocampus ($p \leq 0.05$) and striatum ($p \leq 0.05$).

3.3.2 Nonenzymatic antioxidant defence

We did not observed significant changes in the liver TRAP values after chronic retinyl palmitate supplementation of middle-aged Wistar rats (Table 2). However, same supplementation, induced changes in the TRAP in brain samples (Fig. 3). Doses of 3000 mcg of RAE/kg/day decreased the TRAP in the cerebellum ($p \leq 0.05$), supplementation with 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day decreased the TRAP in the cerebral cortex ($p \leq 0.05$), and all tested doses also decreased

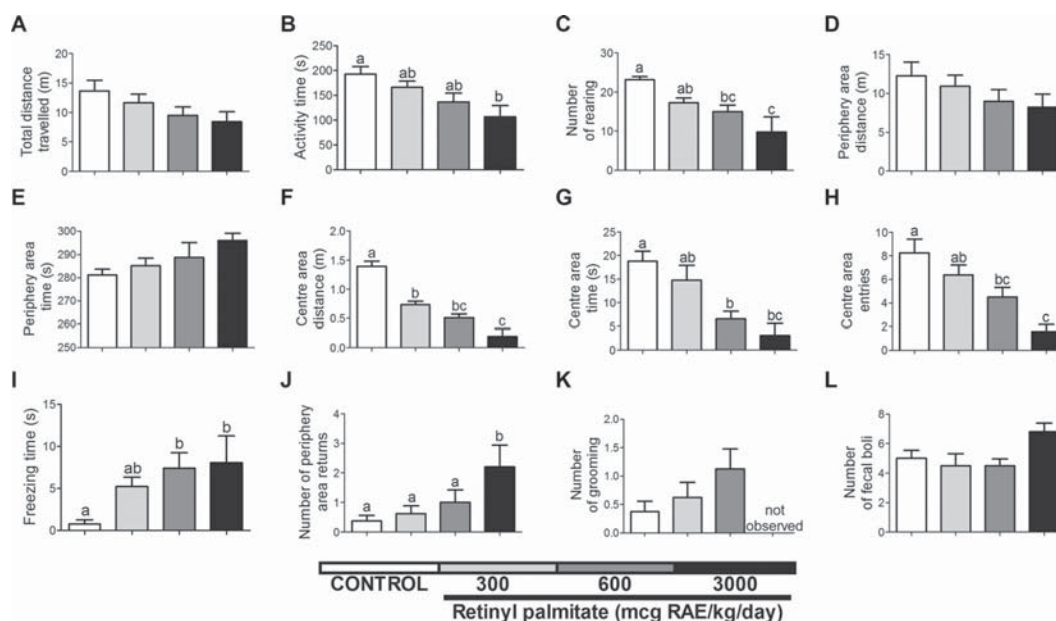


Figure 1. Classical and etiological parameters observed in the open field test (OFT) after 28 days of supplementation with retinyl palmitate to middle-aged Wistar rats. Each animal freely explored the OFT apparatus for 5 min and (A) total distance travelled, (B) activity time, (C) number of rearing, (D) periphery area distance travelled, (E) periphery area time, (F) centre area distance travelled, (G) centre area time, (H) centre area entries, (I) freezing time, (J) number of periphery area returns, (K) number of grooming, and (L) number of fecal boli were collected and recorded with ANY-maze Video tracking Software. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8$ animals/group). Different letters denote significant changes ($p < 0.05$, one-way ANOVA Tukey's post hoc test).

the TRAP in the hippocampus ($p \leq 0.05$). No changes were observed in the striatum.

3.3.3 Redox status of biomolecules

No changes in redox status nor levels of oxidative damage markers to lipids and proteins were detected in the liver of

middle-aged Wistar rats (Table 2). On the contrary, same supplementation led to prooxidant effects as well as increased lipid peroxidation and protein carbonylation levels in the brain (Fig. 4). All tested doses decreased the SH content in the hippocampus, while only 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day decreased the SH content in the cerebellum, but only 3000 mcg of RAE/kg/day decreased the SH content in the cerebral cortex ($p \leq 0.05$; Fig. 4A). No changes were found in

Table 2. Redox profile in the liver of retinyl palmitate supplemented middle-aged Wistar rats and control animals

| | Retinyl palmitate (mcg of RAE/kg/day) | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0 (control) | 300 | 600 | 3000 |
| Number of supplemented rats | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Enzymatic antioxidant defences | | | | |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 39.01 \pm 2.11 | 41.63 \pm 2.17 | 36.38 \pm 2.08 | 39.99 \pm 2.22 |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 56.38 \pm 2.74 | 52.75 \pm 2.97 | 47.24 \pm 2.81 | 51.02 \pm 2.89 |
| GPx activity (U GPx/mg protein) | 28.98 \pm 2.81 | 26.26 \pm 3.03 | 26.63 \pm 2.44 | 23.63 \pm 2.28 |
| GST activity (U GST/mg protein) | 37.23 \pm 2.54 | 41.21 \pm 2.82 | 39.99 \pm 2.61 | 44.14 \pm 3.69 |
| SOD/PER ratio | 0.32 \pm 0.02 | 0.35 \pm 0.02 | 0.33 \pm 0.03 | 0.36 \pm 0.02 |
| Nonenzymatic antioxidant defences | | | | |
| TRAP (% of control) | 97.88 \pm 3.01 | 97.01 \pm 3.59 | 98.25 \pm 2.46 | 98.63 \pm 3.14 |
| Oxidative damage markers | | | | |
| TBARS level (nmol/mg protein) | 6.44 \pm 0.25 | 6.55 \pm 0.29 | 6.60 \pm 0.31 | 6.52 \pm 0.29 |
| Carbonyl level (nmol/mg protein) | 1.52 \pm 0.11 | 1.60 \pm 0.13 | 1.44 \pm 0.12 | 1.35 \pm 0.14 |
| SH content (μ mol/mg protein) | 124.9 \pm 4.34 | 117.5 \pm 5.22 | 110.4 \pm 4.07 | 108.3 \pm 4.18 |

No changes were observed in enzymatic antioxidant defences, nonantioxidant defences, and oxidative damage markers in the liver of middle-aged rats after 28 days of retinyl palmitate supplementation. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8$ animals/group).

Table 3. Antioxidant enzyme activity from selected brain regions in both control and retinyl palmitate supplemented middle-aged Wistar rats

| | Retinyl palmitate (mcg of RAE/kg/day) | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 0 (control) | 300 | 600 | 3000 |
| Number of supplemented rats | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Cerebellum | | | | |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 17.02 ± 0.62 a | 22.89 ± 0.63 b | 27.80 ± 0.68 c | 41.24 ± 1.80 d |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 4.59 ± 0.48 | 5.53 ± 0.68 | 5.00 ± 0.71 | 4.71 ± 0.52 |
| GPx (U GPx/mg protein) | 2.61 ± 0.08 | 2.77 ± 0.05 | 2.86 ± 0.06 | 2.87 ± 0.10 |
| GST (U GST/mg protein) | 1.28 ± 0.06 | 1.37 ± 0.07 | 1.29 ± 0.05 | 1.34 ± 0.06 |
| Cerebral Cortex | | | | |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 14.58 ± 0.93 a | 18.99 ± 0.80 b | 19.78 ± 1.56 b | 26.15 ± 0.97 c |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 2.78 ± 0.33 | 3.28 ± 0.40 | 2.76 ± 0.30 | 2.55 ± 0.33 |
| GPx (U GPx/mg protein) | 2.43 ± 0.06 a | 2.58 ± 0.05 a | 2.69 ± 0.09 a | 2.75 ± 0.08 b |
| GST (U GST/mg protein) | 1.48 ± 0.08 | 1.50 ± 0.08 | 1.49 ± 0.11 | 1.48 ± 0.07 |
| Hippocampus | | | | |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 17.98 ± 0.71 a | 20.33 ± 0.94 a | 20.81 ± 0.84 ab | 24.45 ± 0.95 b |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 2.90 ± 0.22 a | 2.67 ± 0.18 a | 2.20 ± 0.17 a | 2.10 ± 0.14 b |
| GPx (U GPx/mg protein) | 2.83 ± 0.06 | 2.89 ± 0.06 | 2.92 ± 0.08 | 2.85 ± 0.12 |
| GST (U GST/mg protein) | 1.51 ± 0.07 a | 1.78 ± 0.07 a | 1.73 ± 0.07 a | 1.86 ± 0.10 b |
| Striatum | | | | |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 13.48 ± 0.75 a | 14.94 ± 1.00 a | 16.39 ± 0.68 ab | 18.10 ± 0.77 b |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 3.19 ± 0.21 a | 2.96 ± 0.27 a | 2.75 ± 0.27 ab | 1.89 ± 0.18 b |
| GPx (U GPx/mg protein) | 3.20 ± 0.08 | 3.27 ± 0.15 | 3.28 ± 0.07 | 3.17 ± 0.09 |
| GST (U GST/mg protein) | 1.67 ± 0.07 | 1.65 ± 0.09 | 1.57 ± 0.06 | 1.63 ± 0.08 |

Changes in superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione-S-transferase (GST) activities were observed in the brain of middle-aged rats after 28 days of retinyl palmitate supplementation. Results are expressed as the mean ± SEM ($n = 8$ animals/group). Different letters denote significant changes ($p < 0.05$, one-way ANOVA Tukey's post hoc test).

the striatal SH content (Fig. 4A). Supplementation with 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day also increased the TBARS level in the hippocampus ($p \leq 0.05$; Fig. 4B). Only doses of 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day were able to increase the TBARS level in the cerebellum, cerebral cortex, and striatum ($p \leq 0.05$; Fig. 4B). Finally, doses of 600 and 3000 mcg of RAE/kg/day increased the carbonyl content in the hippocampus ($p \leq 0.05$; Fig. 4C). Supplementation with 3000 mcg of RAE/kg/day increased the carbonyl content in the cerebellum

and striatum, but no differences were observed in the cerebral cortex ($p \leq 0.05$; Fig. 4C).

4 Discussion

In the present study, we demonstrate that chronic retinyl palmitate supplementation with 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day is able to decrease the exploratory behavior

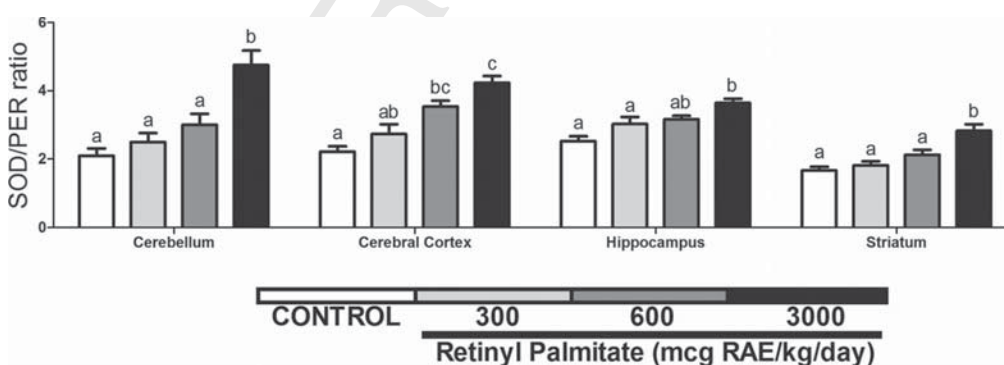


Figure 2. Ratio of superoxide dismutase (SOD) and total peroxidase (PER) activity in the brain of middle-aged Wistar rats after 28 days of supplementation with retinyl palmitate. Supplementation increased the SOD/PER ratio in cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, and striatum. Results are expressed as the mean ± SEM ($n = 8$ animals/group). Different letters denote significant changes ($p < 0.05$, one-way ANOVA Tukey's post hoc test).

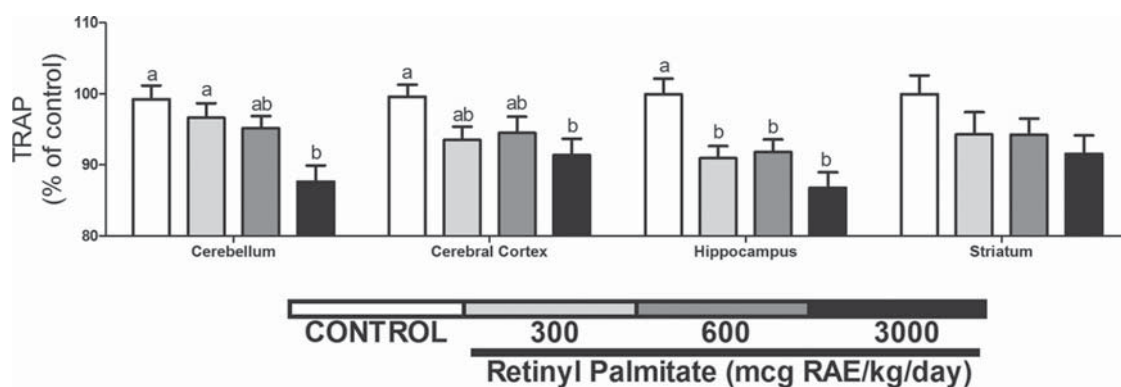


Figure 3. Total antioxidant reactive potential (TRAP) induced in the brain of middle-aged Wistar rats after 28 days of supplementation with retinyl palmitate. Supplementation decreased the TRAP in cerebellum, cerebral cortex, and hippocampus, but not in striatum. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8$ animals/group). Different letters denote significant changes ($p < 0.05$, one-way ANOVA Tukey's post hoc test).

and increase the anxiety-like behavior of middle-aged Wistar rats. In addition, we show that chronic retinyl palmitate supplementation-induced behavioral effects, at doses of 300, 600, and 3000 mcg of RAE/kg/day, are not associated with overt toxic effects or hepatotoxicity but parallels to imbalanced enzymatic antioxidant defences, depletion of the nonenzymatic antioxidant defences, and oxidative damage to lipids and proteins in the brain.

In agreement with the present results, similar behavioral changes were observed in previous studies from our own group, performed in different experimental models. Supplementation with therapeutic doses of retinyl palmitate to male and female young adult rats is consistently reported to induce a decrease in locomotor activity and exploratory behavior [21–23]. During gestation and nursing, supplementation with therapeutic doses of retinyl palmitate decreases the locomotor activity and exploratory behavior of rat dams and their offspring [24]. However, we did not observe changes in locomotor activity associated with supplementation of retinyl palmitate as reported by these studies. In addition, vitamin A deficiency in rats is known to induce a similar decrease in exploratory behavior and increase in anxiety-like behavior without affecting the general locomotor activity [43]. Frequently, both deficiency and excess of vitamin A are described to exert similar disruptive effects on several other biological functions [44].

On the other hand, vitamin A enriched-diet has been shown to (i) counteract declarative-like memory deficits in aged mice, (ii) reverse the vitamin A deficiency-related memory decline [45, 46], and (iii) normalize anxiety levels of vitamin A deficient rats [43]. The amounts of supplemented retinol utilized for those studies are near the doses of 300 and 600 mcg of RAE/kg/day we here investigated. Distinct formulations and preexisting differences in vitamin A status could explain the conflict (in terms of behavioral effects) observed in our study, when compared to some other previous reports in the literature. As a matter of fact, different formu-

lations are known to exert different toxicity and our results may suggest that water-soluble preparations could be more toxic than solid ones [47]. In turn, differences in prior status of vitamin A in the US laboratory animal were already identified [48]. This study reported a pathological increase in retinol content in the liver of laboratory animals, indicating that this increase may be due to the large amounts of vitamin A added to the diet ($4\times$ the recommendation for laboratory animals) to compensate for the losses that occur during transport and storage [48]. Nevertheless, further studies would be needed to confirm potential differences when different formulations (water-soluble \times solid) are used under the same experimental conditions, taking into account the vitamin A content in the chow and the preexisting status of vitamin A in the experimental animals.

With all, we can confirm that our doses were not toxic and that all behavioral differences are not related with hepatotoxicity-related pain in the supplemented experimental animals. Retinyl palmitate chronic supplementation did not induce changes in the enzymatic and nonenzymatic antioxidant defences as well as in the oxidative damage markers to biomolecules in the liver of middle-aged Wistar rats. This is an important finding because oxidative stress is one of the main events observed in all pathological processes in the liver and hepatotoxicity is undoubtedly one of the most severe adverse effects associated with the ingestion of large amounts of vitamin A [29, 49]. In addition, relatively few animal studies have reported chronic toxic effects of vitamin A supplementation in the liver. Our results are in agreement with a previous study that reported no hepatotoxicity associated with 10 months of supplementation with vitamin A doses ranging from 3 to 15,000 mcg of RAE/kg/day [29].

Our study also shows that chronic retinyl palmitate supplementation induces a generalized increase in oxidative stress in different brain regions of middle-aged Wistar rats. Supplementation increased the level of oxidative damage markers to lipids and proteins as well as a depleted the nonenzymatic

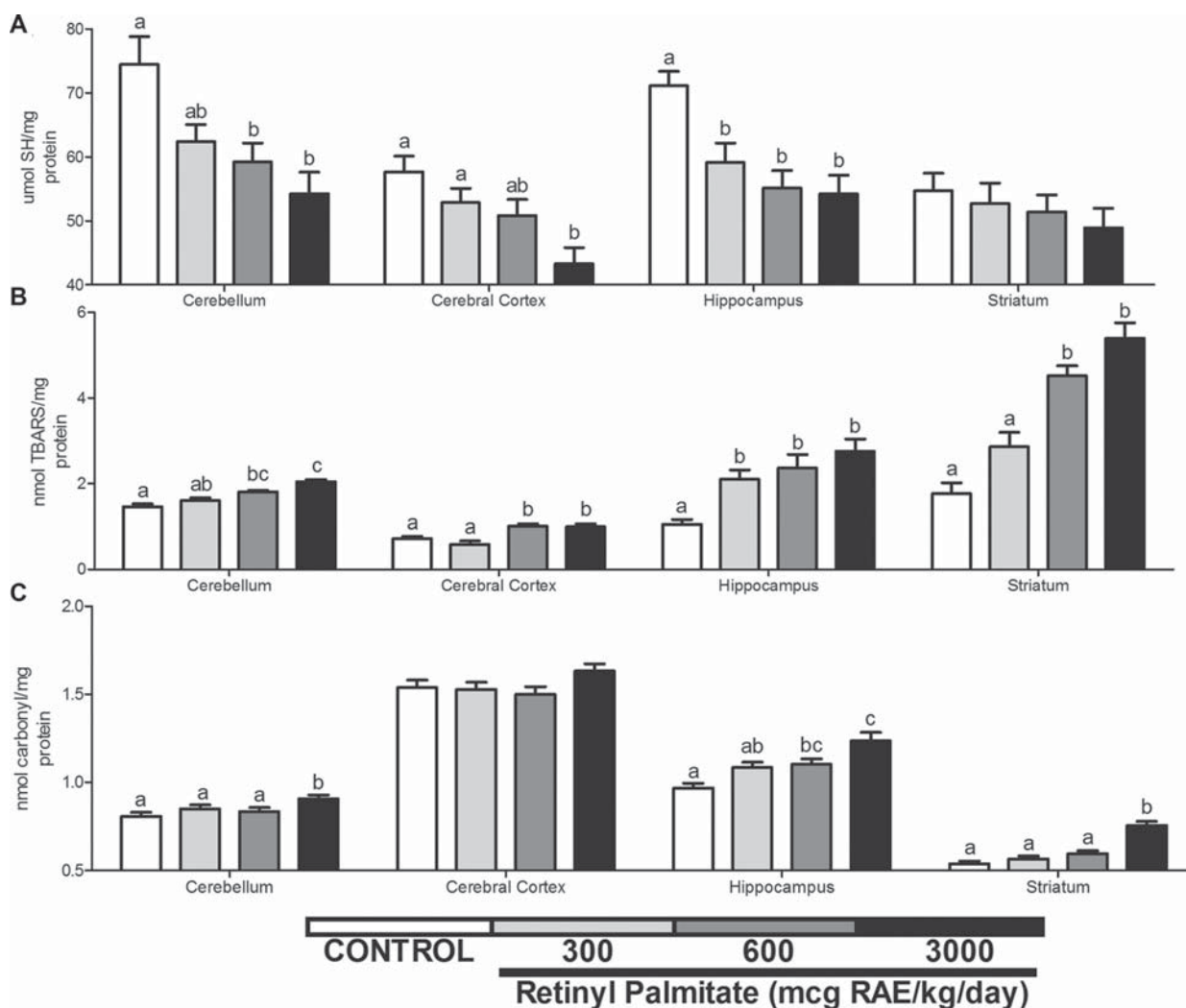


Figure 4. Total reduced thiol content (SH), thiobarbituric acid-reactive species level (TBARS), and protein carbonylation content in the brain of middle-aged Wistar rats after 28 days of supplementation with retinyl palmitate. Supplementation induced changes in SH content (A), TBARS level (B), and carbonyl content (C) in cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, and striatum. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 8$ animals/group). Different letters denote significant changes ($p < 0.05$, one-way ANOVA Tukey's post hoc test).

antioxidant defences. An increase in levels of lipid peroxidation can impair the normal functioning of biological membranes upon transformation of polyunsaturated lipids into polar lipid hydroperoxides [37, 50]. Similarly, since protein carbonylation is an irreversible oxidation product of several amino acid residues, its accumulation may disturb cellular signalling and promote the generation of highly cytotoxic intra- and/or intermolecular cross-links [37, 51]. The decrease in SH groups may also result in excessive generation of disulfide bonding, protein misfolding, aggregation, and degradation, and even lead to cell death because protein and non-protein SH groups are known to be highly susceptible to ROS-induced oxidation [52–54]. Furthermore, a decrease in TRAP may also indicate a possible depletion of various spe-

cific antioxidant components, including GSH, vitamins C and E, uric acid, and bilirubin [38].

Based on the present results, we postulate that chronic retinyl palmitate supplementation can enhance ROS generation in the brain of middle-aged Wistar rats. Vitamin A is known to increase $O_2^{\cdot-}$ production in vitro [17]. Higher $O_2^{\cdot-}$ production could explain the observed increase in SOD activity in the brain and the decrease in CAT activity in both hippocampus and striatum. High concentrations of $O_2^{\cdot-}$ are known to stimulate SOD and inhibit CAT activities [37, 55, 56]. The $O_2^{\cdot-}$ is also capable of inducing the oxidation of various enzymes with iron-sulphur clusters, leading to the release of iron to promote the Fenton reaction, or react with nitric oxide (NO^{\cdot}) to generate peroxynitrite ($ONOO^-$), a nonradical able to

rapidly oxidize various molecules [37,57]. Furthermore, availability of H₂O₂ may be increased in the brain since chronic RP supplementation increased the SOD/PER ratio. Under physiological conditions, H₂O₂ (as well as other ROS) play important roles in the brain, including the regulation of intracellular signalling [58–60]. However, an increase in the availability of H₂O₂ could severely disrupt cellular signalling and, via Fenton reaction, generate hydroxyl radicals (OH[•]) able to target a larger number of biomolecules [37,58].

Oxidative stress is the most severe consequence of the imbalance between the production of ROS and the action of antioxidant defences. With all, an increase in ROS production can also disrupt the brain homeostasis by other mechanisms of action. Currently, it is known that vitamin A plays many of its biological functions through both genomic and nongenomic actions [61,62]. It is also known that nongenomic actions can influence brain functioning, affecting synaptic transmission, catecholamine production in the brain, cell-cycle regulation mediated by mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase B (PKB), and protein kinase C activation [61–65]. However, it was recently demonstrated that retinol-induced ROS production in Sertoli cells is able to activate different pathways of protein kinases, including MAPKs, extracellular-signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases, and PKB [66]. Thus, the oxidative stress observed in the brain of middle-aged Wistar rats after the chronic supplementation of moderate amounts of vitamin A may also have a deleterious effect upon important cell signaling pathways.

Other animal studies have already investigated the role of cerebral oxidative stress in anxiety and depression in vivo models (e.g. immobilization stress, swim stress, chronic mild stress, maternal separation, olfactory bulbectomy, and social defeat). Usually, a general increased production of different ROS (including O₂^{•-}, H₂O₂, and OH[•]) is reported [67–69], as well as higher levels of oxidative damage-related markers (e.g. TBARS, conjugated dienes, and protein carbonylation) [70–74]. Most of these studies reported a decrease in nonenzymatic antioxidant components and a especially consistent decrease in SH groups [72–74]. In addition, SOD activity is generally observed to be increased, despite some reports of decreased activity and negative results [71–73, [75, 76]]. The activity of the other antioxidant enzymes is frequently shown to be both increased and decreased in brain [71–75]. Interestingly, it seems that anxiety-like behavior, induced by oxidative stress, can be successfully prevented through genetic alterations or pharmacological treatments (e.g. antioxidants) [77–79].

HED to the tested doses in the present study are readily available in therapeutic agents and dietary supplements, and are below the established tolerable upper intake level for vitamin A [28, 29]. In addition, behavioral changes displayed by retinyl palmitate-supplemented middle-aged Wistar rats closely resemble the behavioral disturbances observed in humans suffering from high anxiety levels [80, 81]. Anxiety disorders and related-symptoms are the most prevalent mental

health problems among older adults and can lead to diminished physical functioning and increased social isolation [82]. Moreover, it has been established a link between oxidative stress and a number of mental conditions, including patients with obsessive-compulsive disorder, social phobia, panic disorder, anxiety symptoms, and depressive disorders [83–87].

In conclusion, our data suggest that chronic retinyl palmitate supplementation, at moderate doses, is able to induce changes in emotional reactivity of middle-aged rats that are similar to anxiety. We also suggest a possible interrelation between prooxidant events in the brain and these differences in the behavioral profile that cannot be attributed to hepatotoxicity. These results invite for additional studies to further characterize this potential interrelation of cause-effect between oxidative stress in the brain and altered emotional state.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), Brazil.

The authors declare no conflict of interest.

5 References

- [1] Administration on Ageing, *Older Adults and Mental Health: Issues and Opportunities*, US Department of Health and Human Services, Washington, DC 2001.
- [2] World Health Organization, *The Global Burden of Disease: 2004 Update*, WHO, Geneva 2008.
- [3] Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A. et al., The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011, 21, 655–679.
- [4] Office of the Surgeon General, *Mental Health: A Report of the Surgeon General—Executive Summary*, US Department of Health and Human Services, Washington, DC 1999.
- [5] Lima, M. G., Barros, M. B., César, C. L., Goldbaum, M. et al., Health related quality of life among the elderly: a population-based study using SF-36 survey. *Cad. Saúde Pública.* 2009, 25, 2159–2167.
- [6] Fjell, A. M., Walhovd, K. B., Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. *Rev Neurosci.* 2010, 21, 187–221.
- [7] Cefalu, C. A., Theories and mechanisms of aging. *Clin. Geriatr. Med.* 2011, 27, 491–506.
- [8] Camougrand, N., Rigoulet, M., Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Respir. Physiol.* 2001, 128, 393–401.
- [9] Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A. I., Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008, 11, 851–876.

- [10] Zhang, X. Y., Yao, J. K., Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2013, *46*, 197–199.
- [11] Salim, S., Oxidative stress and psychological disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 2014, *12*, 140–147.
- [12] Strümpel, C., Billings, J. (Ed.), *Overview on Health Promotion for Older People*, European Commission, European Union 2008.
- [13] Lakhan, S. E., Vieira, K. F., Nutritional therapies for mental disorders. *Nutr. J.* 2008, *7*, 2.
- [14] Rao, T. S., Asha, M. R., Ramesh, B. N., Rao, K. S., Understanding nutrition, depression and mental illnesses. *Indian J. Psychiatry* 2008, *50*, 77–82.
- [15] Goodwin, J. S., Goodwin, J. M., Garry, P. J., Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA* 1983, *249*, 2917–2921.
- [16] Jacka, F. N., Pasco, J. A., Mykletun, A., Williams, L. J. et al., Association of Western and traditional diets with depression and anxiety in women. *Am. J. Psychiatry* 2010, *167*, 305–311.
- [17] Murata, M., Kawanishi, S., Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivatives via superoxide generation. *J. Biol. Chem.* 2000, *275*, 2003–2008.
- [18] Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Benfato, M. S., Bernard, E. A., Moreira, J. C. F., Retinol supplementation induces oxidative stress and modulate antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Radic. Res.* 2001, *34*, 395–404.
- [19] Pasquali, M. A., Gelain, D. P., Zanotto-Filho, A., deSouza, L. F. et al., Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. *Toxicol. In Vitro.* 2008, *22*, 1177–1183.
- [20] Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Gelain, D. P., Dalmolin, R. S. et al., Vitamin A treatment induces apoptosis through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Cell Biol. Int.* 2008, *32*, 100–116.
- [21] DeOliveira, M. R., Pasquali, M. A. B., Silvestrin, R. B., Mello e Souza, T., Moreira, J. C. F., 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.
- [22] DeOliveira, M. R., Silvestrin, R. B., Mello e Souza, T., Moreira, J. C. F., 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.
- [23] deOliveira, M. R., Lorenzi, R., Schnorr, C. E., Morrone, M., Moreira, J. C., Increased 3-nitrotyrosine levels in mitochondrial membranes and impaired respiratory chain activity in brain regions of adult female rats submitted to daily vitamin A supplementation for 2 months. *Brain Res. Bull.* 2011, *86*, 246–253.
- [24] Schnorr, C. E., da Silva Morrone, M., Simões-Pires, A., da Rocha, R. F. et al., Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Res.* 2011, *1369*, 60–73.
- [25] U. S. National Institute of Health, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th Edition*, National Academies Press (US), Washington, DC 2011.
- [26] Moretti, M., deSouza, A. G., deChaves, G., deAndrade, V. M. et al., Emotional behavior in middle-aged rats: Implications for geriatric psychopathologies. *Physiol. Behav.* 2011, *102*, 115–120.
- [27] USFDA, *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Adult Healthy Volunteer*, US Food and Drug Administration, Rockville 2005.
- [28] US National Research Council, *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*, National Academy Press (US), Washington, DC 2001.
- [29] European Food Safety Authority. *Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals*. EFSA, European Union 2006.
- [30] Buccafusco, J. J. (Ed), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd edn, CRC Press, Boca Ra ton, FL 2009.
- [31] Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P., Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* 2002, *134*, 49–57.
- [32] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, *193*, 265–275.
- [33] Misra, H. P., Fridovich I., The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972, *247*, 3170–3175.
- [34] Aebi, H., Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, *105*, 121–126.
- [35] Habig, W. H., Jakoby, W. B., Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 1981, *77*, 398–405.
- [36] Wendel, A., Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981, *77*, 325–333.
- [37] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals Biology and Medicine*, 4th edn, Oxford Science Publications, Oxford 2006.
- [38] Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M. D., Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, *18*, 153–158.
- [39] Dresch, M. T., Rossato, S. B., Kappel, V. D., Biegelmeyer, R. et al., Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal. Biochem.* 2009, *385*, 107–114.
- [40] Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, *82*, 70–77.
- [41] Draper, H. H., Hadley, M., Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation". *Methods Enzymol.* 1990, *186*, 421–431.
- [42] Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990, *186*, 464–478.

- [43] Bonhomme, D., Minni, A. M., Alfons, S., Roux, P. et al., Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front. Behav. Neurosci.* 2014, *8*, 20.
- [44] Olson, C. R., Mello, C. V., Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, *54*, 489–495.
- [45] Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N. et al., Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J. Neurosci.* 2008, *28*, 279–291.
- [46] Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A. et al., Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 2002, *115*, 475–482.
- [47] Myhre, A. M., Carlsen, M. H., Bohn, S. K., Wold, H. L. et al., Water-miscible, emulsified, and solid forms of retinol supplements are more toxic than oil-based preparations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, *78*, 1152–1159.
- [48] Penniston, K. L., Tanumihardjo, S. A., The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, *83*, 191–201.
- [49] Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A. et al., Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 2002, *65*, 166–176.
- [50] Avery, S. V., Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 2011, *434*, 201–210.
- [51] Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M. et al., Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, *1773*, 93–104.
- [52] Winterbourn, C. C., Metodiewa, D., Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, *27*, 322–328.
- [53] Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M. et al., Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2004, *279*, 21749–21758.
- [54] Sitia, R., Molteni, S. N., Stress, protein (mis) folding, and signaling: the redox connection. *Sci. STKE.* 2004, *2004*, 27.
- [55] Kono, Y., Fridovich, I., Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 1982, *257*, 5751–5755.
- [56] Shimizu, N., Kobayashi, K., Hayashi, K., The reaction of superoxide radical with catalase. *J. Biol. Chem.* 1984, *259*, 4414–4418.
- [57] Liang, L. P., Patel, M., Iron–sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2004, *90*, 1076–1084.
- [58] Veal, E. A., Day, A. M., Morgan, B. A., Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell.* 2007, *26*, 1–14.
- [59] Miller, E. W., Tulyathan, O., Isacoff, E. Y., Chang, C. J., Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. *Nat. Chem. Biol.* 2007, *3*, 263–267.
- [60] Veal, E., Day, A., Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid. Redox Signal.* 2011, *15*, 147–151.
- [61] Masia, S., Alvarez, S., deLera, A. R., Baretino, D., Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol. Endocrinol.* 2007, *21*, 2391–402.
- [62] Canon, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S., Aranda, A., Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol. Biol. Cell.* 2004, *15*, 5583–5592.
- [63] Liou, J. C., Ho, S. Y., Shen, M. R., Liao, Y. P., Chiu, W. T., Kang, K. H., A rapid, nongenomic pathway facilitates the synaptic transmission induced by retinoic acid at the developing synapse. *J. Cell. Sci.* 2005, *118*, 4721–4730.
- [64] Liao, Y. P., Ho, S. Y., Liou, J. C., Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *J. Cell. Sci.* 2004, *117*, 2917–2924.
- [65] Gelain, D. P., Moreira, J. C., Bevilaqua, L. R., Dickson, P. W., Dunkley, P. R., 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.
- [66] Gelain, D. P., Pasquali, M. A., Caregnato, F. F., Castro, M. A., Moreira, J. C., Retinol induces morphological alterations and proliferative focus formation through free radical-mediated activation of multiple signaling pathways. *Acta Pharmacol. Sin.* 2012, *33*, 558–567.
- [67] Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Reus, G. Z. et al., Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem. Int.* 2009, *54*, 358–362.
- [68] Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., Soulmani, R., Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav. Immun.* 2008, *22*, 1156–1159.
- [69] Matsumoto, K., Yobimoto, K., Huong, N. T., Abdel-Fattah, M. et al., Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Res.* 1999, *839*, 74–84.
- [70] Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Reus, G. Z. et al., Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J. Psychiatr. Res.* 2009, *43*, 864–869.
- [71] Zafir, A., Banu, N., Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 2009, *12*, 167–177.
- [72] Sahin, E., Gumuslu, S., Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav. Brain Res.* 2004, *155*, 241–248.
- [73] Tunes, I., Drucker-Colin, R., Montilla, P., Pena, J. et al., Protective effect of nicotine on oxidative and cell damage in rats with depression induced by olfactory bulbectomy. *Eur. J. Pharmacol.* 2010, *627*, 115–118.
- [74] Eren, I., Naziroglu, M., Demirdas, A., Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem. Res.* 2007, *32*, 1188–1195.
- [75] Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., Radojicic, M. B., Chronic social isolation is related to both upregulation of plasticity genes and initiation of proapoptotic signaling in

- 1
2
3 Wistar rat hippocampus. *J. Neural. Transm.* 2009, 116, 1579–
4 1589.
- 5 [76] Grundmann, O., Lv, Y., Kelber, O., Butterweck, V., Mechanism
6 of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint
7 stress is mediated by the inter-relationship of the immune,
8 oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neurophar-*
9 *macology* 2010, 58, 767–773.
- 10 [77] Hovatta, I., Tennant, R. S., Helton, R., Marr, R. A. et al., Glyox-
11 alase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice.
12 *Nature* 2005, 438, 662–666.
- 13 [78] Masood, A., Nadeem, A., Mustafa, S. J., O'Donnell, J. M.,
14 Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of
15 phosphodiesterase-2 in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008,
16 326, 369–379.
- 17 [79] Salim, S., Asghar, M., Chugh, G., Taneja, M. et al., Oxida-
18 tive stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and
19 insulin resistance. *Brain Res.* 2010, 1359, 178–185.
- 20 [80] Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Rodgers, R. J., in:
21 Olivier, B., Mos, J., Slangen, J. L. (Eds.), *Animal Models in*
22 *Psychopharmacology—Risk Assessment and Animal Mod-*
23 *els of Anxiety*, Birkhauser Verlag Basel, Boston 1991, pp.
24 117–134.
- 25 [81] Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., Holmes, A., Animal mod-
26 els of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol.*
27 *Res.* 1997, 30, 3289–3304.
- 28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
- [82] Scrabble, H., Burns-Cusato, M., Medrano, S., Anxiety and the
aging brain: stressed out over p53? *Biochim. Biophys. Acta.*
2009, 1790, 1587–1591.
- [83] Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O. et al., Antioxi-
dant enzyme activities and malondialdehyde levels in pa-
tients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobi-*
ology 2002, 46, 27–32.
- [84] Atmaca, M., Tezcan, E., Kuloglu, M., Ustundag, B.,
Tunckol, H., Antioxidant enzyme and malondialdehyde val-
ues in social phobia before and after citalopram treat-
ment. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2004, 254,
231–235.
- [85] Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M. A., Uydu, H. A. et al., Antioxi-
dative enzyme activities and lipid peroxidation in major de-
pression: alterations by antidepressant treatments. *J. Affect.*
Disord. 2001, 64, 43–51.
- [86] Ersoy, M. A., Selek, S., Celik, H., Erel, O. et al., Role of oxida-
tive and antioxidative parameters in etiopathogenesis and
prognosis of panic disorder. *Int. J. Neurosci.* 2008, 118, 1025–
1037.
- [87] Selek, S., Herken, H., Bulut, M., Ceylan, M. F. et al., Ox-
idative imbalance in obsessive compulsive disorder pa-
tients: a total evaluation of oxidant-antioxidant status.
Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008, 32,
487–491.

Estudo II

Capítulo II - Supplementation of Adult Rats with Moderate Amounts of β -Carotene Modulates the Redox Status in Plasma without Exerting Pro-Oxidant Effects in the Brain: A Safer Alternative to Food Fortification with Vitamin A?

Artigo publicado no periódico *Nutrients*, volume 6, pg. 5572-5582 (2014).

ISI Impact Factor 2013: 3,148

Communication

Supplementation of Adult Rats with Moderate Amounts of β -Carotene Modulates the Redox Status in Plasma without Exerting Pro-Oxidant Effects in the Brain: A Safer Alternative to Food Fortification with Vitamin A?

Carlos Eduardo Schnorr *, Maurilio da Silva Morrone, André Simões-Pires, Leonardo da Silva Bittencourt, Fares Zeidán-Chuliá and José Cláudio Fonseca Moreira

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, Anexo Depto. Bioquímica, Lab 32, CEP 90035-003, Porto Alegre, Brazil;

E-Mails: maurilio.bio@gmail.com (M.S.M); andresimoepires@gmail.com (A.S.-P.);

lsbittencourt@hotmail.com (L.S.B); fzchulia.biomed@gmail.com (F.Z.-C.);

00006866@ufrgs.br (J.C.F.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ceschnorr@gmail.com; Tel.: +55-51-3308-557; Fax: +55-51-3308-553.

Received: 12 August 2014; in revised form: 10 November 2014 / Accepted: 18 November 2014 /

Published: 1 December 2014

Abstract: Despite the antioxidant potential of vitamin A, recent studies reported that chronic retinol ester supplementation can also exert pro-oxidant effects and neurotoxicity *in vivo* and raises the mortality rates among healthy subjects. Our aim was to find evidence for a safer (*i.e.*, less toxic) molecule with provitamin A activity. Therefore, we investigated whether chronic supplementation of healthy Wistar rats with β -carotene (0.6, 3, and 6 mg/kg/day) would demonstrate antioxidant characteristics without leading to pro-oxidant side effects in the brain. Total reactive antioxidant potential (TRAP), thiobarbituric reactive species level (TBARS), and total reduced thiol content (SH) were evaluated in plasma. TBARS and SH were additionally evaluated in selected brain regions together with superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity. In the present study, we show that β -carotene is able to exert antioxidant activity in plasma without triggering pro-oxidant events in the brain, providing evidence that may justify its further evaluation as a safer nutritional supplement with provitamin A activity.

Keywords: vitamin A; rat model; oxidative stress; retinol; toxicity; nutrition

1. Introduction

Food fortification and dietary supplementation with retinol esters are commonly used to mitigate the impacts of hypovitaminosis A. However, increasing interest in fortified foods and vitamin A supplements is leading to a large percentage of the healthy population being constantly exposed to a higher intake of vitamin A than recommended [1]. Additionally, retinol esters are widely proposed as therapeutic agents for the treatment of many diseases and disorders, such as depression, schizophrenia, and Alzheimer's disease [2]. However, excessive consumption of vitamin A can have a severe adverse impact on human health. Even without any manifestation of clinical signs of hypervitaminosis A, neurotoxic effects may occur in adults due to excessive vitamin A intake because vitamin A readily enters the central nervous system (CNS) [3]. Recently, the harmful effects of retinol ester supplementation to the brain have been investigated using experimental animal models. Retinol ester supplementation at doses ranging from 600 to 3000 retinol activity equivalents (RAE) was demonstrated to induce pro-oxidant effects in different regions of the CNS, including the hippocampus, striatum, and cerebral cortex [4–7]. Therefore, the search for safer sources of vitamin A seems to be timely and necessary.

To the best of our knowledge, no previous studies have ever investigated the effects of supplementation with provitamin A carotenoids on the brain. In addition to its potential as an alternative source of vitamin A, β -carotene, of all the dietary provitamin A carotenoids, appears to be an excellent choice as vitamin A source because it displays the greatest provitamin A activity among all other studied carotenoids [8]. Additionally, β -carotene is proposed to be a natural antioxidant able to trap and neutralize free radicals and prevent oxidative stress [9]. Moreover, despite the acute and chronic toxic effects associated with retinol ester supplementation, β -carotene has not been associated with hypervitaminosis A even when administered at doses up to 3000 RAE [8]. Thus, the aim of the present study was (i) to investigate whether chronic oral supplementation with β -carotene (by orogastric gavage for 28 days) to well-fed male Wistar rats would demonstrate systemic antioxidant potential at the therapeutic doses of 0.6, 3 and 6 mg/kg/day; and (ii) to investigate the safety of such administration for the CNS by evaluating any potential vitamin A-associated neurotoxicity (pro-oxidant effects) of these same doses to the vulnerable regions of the brain (hippocampus, striatum, and cerebral cortex).

2. Experimental Section

2.1. Animals

Male Wistar rats (110–120 day old *Rattus norvegicus*) were obtained from our breeding colony and housed in groups of four animals on a 12 h light–dark cycle (lights on at 7:00 AM) at constant temperature (22 ± 4 °C) and relative humidity (30%–70%). Standard food (CR1 lab chow, Nuvilab Ltda., Curitiba, Brazil) and water were provided *ad libitum*. The Federal University of Rio Grande do Sul Ethical Committee for animal experimentation reviewed and approved the study protocol (project number 21563). All experimental procedures were in compliance with the recommendations of the Brazilian Society for

Science in Laboratory Animals (SBCAL-COBEA) and the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [10].

2.2. Treatment

The animals were randomized into four study groups ($n = 6$ or 7 animals per group) and received vegetable oil (control group) or β -carotene (0.6, 3, or 6 mg/kg/day) for 28 days orally, via a metallic gastric tube (gavage). The animals were weighed once a week and received the gavage in a maximum volume of 0.3 mL. A 10 mg/mL stock solution of β -carotene (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) was prepared in vegetable oil (Cargill Inc., Minneapolis, MN, USA) and was protected from light. The retinol activity equivalent (RAE) of β -carotene in this formulation was 300, 600, and 3000 RAE/kg/day, respectively, considering the actual rate to be 2 μ g of β -carotene to 1 μ g retinol for synthetic pure β -carotene prepared in oil [11,12]. The treatments were administered at the beginning of the dark phase (8:00 PM) to ensure maximum β -carotene absorption because this nutrient is better absorbed during or after a meal.

2.3. Biochemical Analyses

All animals were killed by decapitation 24 h after the last β -carotene administration. Blood samples were collected, and plasma for analysis was separated immediately ($2000\times g$ per 10 min). The cerebral cortex, hippocampus, and striatum from each animal were separated by dissection on ice and homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 7.4. The samples were centrifuged ($10,000\times g$, 10 min), the supernatants were collected and all redox results were normalized to the protein content [13].

Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) formation was evaluated as an estimation of the oxidative damage to lipids as previously described [14]. TBARS were determined by the absorbance at 532 nm, and the results were expressed as pmol or nmol TBARS/mg protein (for plasma and dissected tissues, respectively). Total thiol content was evaluated as an estimation of the oxidative damage to proteins, as previously described [15]. Total thiol content was determined by the absorbance after 60 min at 412 nm, and the results were expressed as μ mol SH/mg protein. Plasma total reactive antioxidant potential (TRAP) was evaluated as an index of the non-enzymatic antioxidant capacity [16]. The results were expressed as the percentage of system area under curve inhibition (% AUC), as previously described [17]. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were analyzed in the cerebral cortex, hippocampus and striatum as a measure of the enzymatic antioxidant defenses [18,19]. These results were expressed as U CAT/mg protein and U SOD/mg protein.

2.4. Statistical Analyses

The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test. All data were analyzed using GraphPad Prism Software v.5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results were expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.); p values were considered significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

The animals supplemented with β -carotene showed no treatment-related clinical signs of toxicity and no differences in body weight gain (Figure 1) during the experimentation. The β -carotene-supplemented animals also showed no gross lesions or abnormalities on necropsy examination. However, the plasma collected from the β -carotene-supplemented groups showed an increase in antioxidant activity, as demonstrated by the decrease in the AUC of the TRAP assay when compared to the control group (Figure 2A), but only the effect of the supplementation at 6 mg/kg/day was statistically significantly ($p < 0.01$) (Figure 2B). β -carotene supplementation at 0.6 ($p < 0.05$), 3 ($p < 0.05$), and 6 ($p < 0.05$) mg/kg/day also reduced the lipid peroxidation levels (TBARS) in the plasma, but did not affect the total thiol content (Figure 2C,D, respectively). We did not find any evidence for pro-oxidant activity in the brain induced by chronic β -carotene supplementation at these same doses (Table 1). In fact, no changes in CAT and SOD activities, TBARS levels, or SH content in the hippocampus and striatum were observed. However, supplementation at 3 mg/kg/day increased CAT activity in the cerebral cortex ($p < 0.05$) (Table 1).

Table 1. Oxidative stress parameters from selected brain regions of both control and β -carotene supplemented healthy rats. No pro-oxidant events were observed in the studied brain areas.

| Redox Parameters | β -CAROTENE (mg/kg/day) | | | |
|--|-------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | 0 (Control) | 0.6 | 3 | 6 |
| Number of supplemented rats | 6 | 7 | 7 | 7 |
| Hippocampus | | | | |
| TBARS level (nmol MDA/mg protein) | 3.67 \pm 0.66 | 3.29 \pm 0.34 | 3.24 \pm 0.53 | 2.96 \pm 0.31 |
| Total thiol content (mmol SH/mg protein) | 17.7 \pm 1.4 | 18.1 \pm 0.8 | 17.8 \pm 1.1 | 17.2 \pm 1.3 |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 1.19 \pm 0.21 | 1.04 \pm 0.18 | 1.28 \pm 0.22 | 1.09 \pm 0.25 |
| SOD activity (U SOS/mg protein) | 32.1 \pm 1.6 | 31.9 \pm 0.8 | 33.4 \pm 0.8 | 32.6 \pm 1.7 |
| Striatum | | | | |
| TBARS level (nmol MDA/mg protein) | 3.09 \pm 0.73 | 2.63 \pm 0.23 | 2.71 \pm 0.56 | 2.67 \pm 0.69 |
| Total thiol content (mmol SH/mg protein) | 17.7 \pm 1.3 | 18.9 \pm 1.9 | 20.4 \pm 3.0 | 19.9 \pm 2.5 |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 1.47 \pm 0.6 | 1.16 \pm 0.51 | 1.22 \pm 0.48 | 0.96 \pm 0.39 |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 32.7 \pm 4.8 | 33.6 \pm 2.9 | 36.1 \pm 2.2 | 33.6 \pm 2.8 |
| Cerebral Cortex | | | | |
| TBARS level (nmol MDA/mg protein) | 1.08 \pm 0.18 | 1.3 \pm 0.36 | 1.17 \pm 0.35 | 0.99 \pm 0.37 |
| Total thiol content (mmol SH/mg protein) | 22.4 \pm 3.4 | 24.9 \pm 3.1 | 21.9 \pm 4.1 | 18.9 \pm 4.9 |
| CAT activity (U CAT/mg protein) | 1.53 \pm 0.37 | 1.86 \pm 0.54 | 2.41 \pm 0.39 * | 1.79 \pm 0.29 |
| SOD activity (U SOD/mg protein) | 37.9 \pm 2.7 | 34.5 \pm 4.4 | 37.4 \pm 3.1 | 33.5 \pm 5.1 |

* Significantly different from the control, $p \leq 0.05$.

Figure 1. Absence of evidence of toxicity in β -carotene-supplemented healthy rats. A decrease in body weight in the treated animals was used as an indicator of *in vivo* toxicity. The results were considered significant when $p < 0.05$.

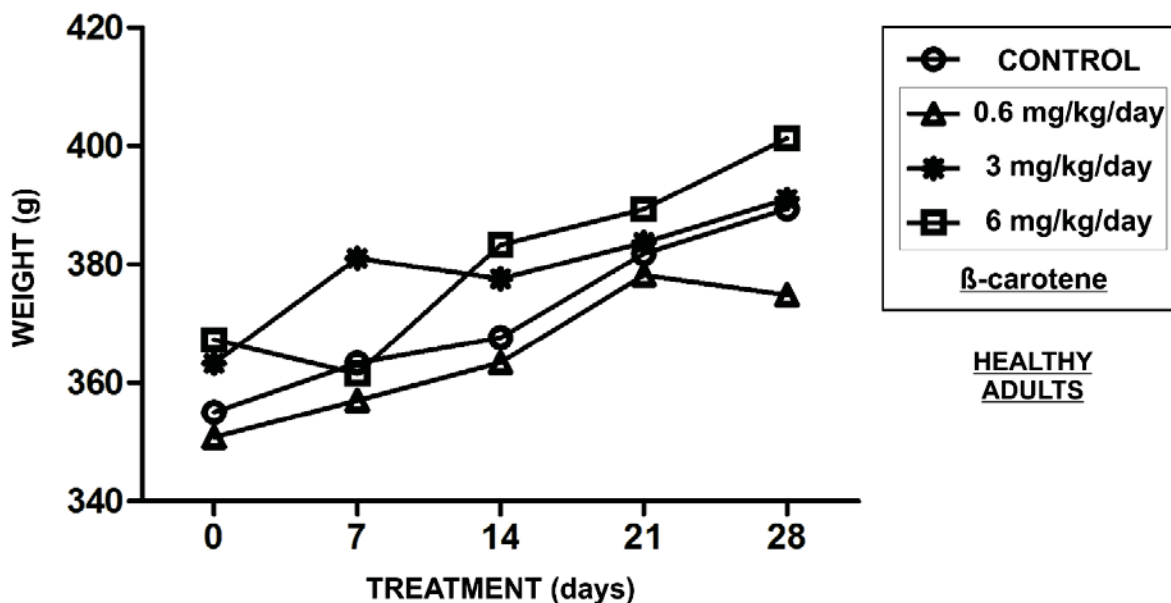
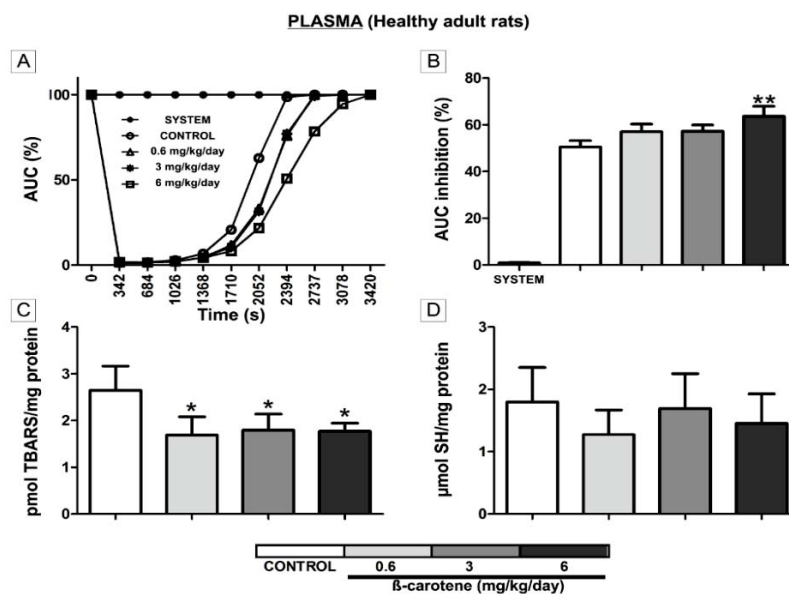


Figure 2. *In vivo* modulation of plasma redox parameters in β -carotene-supplemented adult healthy rats. Total reactive antioxidant potential (TRAP) in plasma from β -carotene-supplemented healthy animals when compared to controls (A,B). Lipid and protein damage parameters (TBARS and SH, respectively) detected in plasma from β -carotene-supplemented healthy animals when compared to controls (C,D). The results were considered significant when $p < 0.05$. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.



4. Discussion

Some clinical trials have already suggested a relationship between β -carotene consumption and higher incidences of lung cancer, together with an increase in the overall mortality when compared to placebo subjects [20,21]; however, several others did not find any adverse effects [22–24]. Doses equivalent to 30 mg of β -carotene have been associated with lung squamous metaplasia. However, doses on the order of 6 mg were able to provide moderate protection against the squamous metaplasia induced by cigarette smoke [25]. All these studies together may indicate that lower doses of β -carotene may potentially exert safe and beneficial effects on human health. In the present study, we utilized 0.6, 3, and 6 mg of β -carotene. These doses can be achieved not only with a regular diet rich in fruits and vegetables but also with dietary supplements, probably best reflecting the effects observed in healthy humans who are chronically exposed to β -carotene supplementation. In many Western countries, the current recommendation for vitamin A intake in adults is 600–1000 RAE/day. β -carotene supplementation may exceed these recommendations by factor of 4 [11,26,27]. Similarly, the nutritional requirement for Wistar rats is 700 RAE/kg/day, but the supplemented doses of 300, 600, and 3000 RAE/kg/day increased this value up to 4 times [28].

In this study, we observed that β -carotene supplementation, at the tested moderate doses, was able to modify the plasma redox parameters in well-fed adult Wistar rats. These results contrast with other reports that expressed skepticism regarding the potential *in vivo* antioxidant properties of this supplement [29–31]. In fact, β -carotene increased TRAP and decreased TBARS levels without changing SH content in plasma after 28 days of supplementation. Because the TRAP results in plasma depend on the relative concentrations of antioxidants and their synergism, the observed modulations may indicate a successful absorption of β -carotene and improved antioxidant defense status [32,33]. Additionally, β -carotene is a lipophilic molecule, which tends to accumulate in lipophilic compartments such as membranes or lipoproteins, and has been postulated to be an important chain-breaking antioxidant, scavenging lipid oxide and lipid peroxide radicals [8]. It is also postulated that β -carotene is able to protect human lymphocytes from damage caused by singlet oxygen, thereby protecting humans from the risk of several disorders, including cancer, cardiovascular, and ophthalmological diseases [34].

One could also speculate whether the numerous reported positive effects of β -carotene actions could be related, at least in part, to its redox modulatory characteristics in plasma as shown here in supplemented adult animals. It has been reported that β -carotene plays an important role in immune function and enhances lymphocyte proliferation independently of its provitamin A function [35]. Epidemiological studies also found a positive association between β -carotene intake and lung function, including higher forced expiratory volume and forced vital capacity [36]. Moreover, several epidemiological studies point towards an inverse association between β -carotene intake and cancer risk, especially at early stages of carcinogenesis [37]. The protective potential of β -carotene and other dietary antioxidants towards cancer and other oxidative stress-related diseases have been summarized in two important recent studies [38,39]. In contrast to the previously presented reports of the CARET [21] and ATBC [20] trials, there is a substantial body of data that generally supports the hypothesis that supplementation with β -carotene in non-smoker adults may reduce the morbidity associated with lung cancer [38]. Several human intervention trials also indicate that β -carotene is an important factor in preventing oral, pharyngeal, laryngeal, and esophageal cancer [38]. Similarly, case-control studies have

confirmed an inverse relationship between the dietary intake of β -carotene and colon cancer [38]. In addition, the consumption of β -carotene seems to exert protective effects on cardiovascular diseases in 7 of 10 cohort studies, although no beneficial effect has been documented in any large-scale randomized trials such as ATBC, PHS, and WHS trials [39].

Overall, the results shown by a recent systematic review that examined all primary and secondary prevention randomized clinical trials involving β -carotene contradict the findings from the observational studies that claim that β -carotene improves health and protects against various diseases [40]. The explanation for the contradictions may be that the doses investigated in the clinical studies were higher than those that can be obtained from a diet rich in fruits and vegetables and even above the tolerable upper intake level [40]. Recently, it has been suggested that high doses of β -carotene may stimulate its asymmetric cleavage by non-enzymatic and enzymatic mechanisms including β -carotene-9',10'-oxygenase (CMOII) [41]. It was also shown that CMOII behaves as a regulated oxidative stress protein, one of whose functions is to protect against the mitochondrial apoptosis induced by an excessive quantity of β -carotene [41]. However, stimulation of the asymmetric cleavage of β -carotene has been proposed to be responsible for the detrimental effects observed in many clinical trials because it may increase the levels of β -apocarotenoids [41]. The β -apocarotenoids may decrease the levels of retinoic acid and may modulate the signaling by nuclear receptors, which can lead to diminished retinoid signaling [41].

Our results encourage further exploration regarding the exact mechanisms by which redox modulation in plasma by β -carotene supplementation and the absence of pro-oxidant effects on the CNS are achieved. The present data suggest β -carotene as a safer (non-toxic) alternative option for nutritherapeutic vitamin A supplementation, usually focused on retinol esters that are associated with pro-oxidant-based neurotoxic effects on the CNS [4–6]. While our results show that no changes in SOD and CAT activities are induced by β -carotene supplementation, supplementation with retinol esters at 300, 600, and 3000 RAE/kg/day induces an imbalance in the SOD/CAT ratio in striatum, cerebral cortex, and hippocampus. This imbalance is also associated with increased lipoperoxidation (higher levels of TBARS) and a decreased SH content in the same CNS regions [4–6]. The nutritional alternative we present here (β -carotene supplementation) could have a critical impact on nutritherapeutic safety because oxidative stress in the CNS is associated with the development of several neuropsychiatric and neurodegenerative disorders including anxiety, depression, and Alzheimer's disease [42].

Others have reported that supplementation with β -carotene attenuates the incidence of aneurysms and cerebral ischemia [43] and overcomes the association between a low intake of β -carotene and cognitive decline or an increased risk of dementia [44–47]. Longitudinal studies have also reported a lower rate of cognitive decline and a diminished risk of Alzheimer's disease in subjects supplemented with β -carotene [48–50]. Furthermore, the Physician's Health Study II (PHSII) reported that cognitive function benefits can be observed after long-term supplementation with β -carotene but following short-term intakes [51].

5. Conclusions

The improved antioxidant defense status of well-fed Wistar rats supplementation with β -carotene in the absence of any associated neurotoxic events suggest that β -carotene is a safer alternative source of

vitamin A for food fortification and supplementation than the commonly used retinol esters. However, further work is needed to confirm our findings, to assess which metabolites are responsible for this modulation and determine the real potential of β -carotene as a nutritherapeutic supplement.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number: 470973/2012-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), Brazil.

Author Contributions

C.E.S. and J.C.F.M. conceived and designed the experiments; C.E.S., M.S.M., A.S.P. and L.S.B. performed the experiments; C.E.S. and F.Z.C. analyzed the data; C.E.S. wrote the paper; F.Z.C. and J.C.F.M. critically revised the paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Allen, L.H.; Haskell, M. Estimating the potential for vitamin A toxicity in women and young children. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2907S–2919S.
2. Malaspina, A.; Michael-Titus, A.T. Is the modulation of retinoid and retinoid-associated signaling a future therapeutic strategy in neurological trauma and neurodegeneration? *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 584–595.
3. Snodgrass, S.R. Vitamin neurotoxicity. *Mol. Neurobiol.* **1992**, *6*, 41–73.
4. De Oliveira, M.R.; Silvestrin, R.B.; Mello, E.; Souza, T.; Moreira, J.C. 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.
5. De Oliveira, M.R.; de Bittencourt Pasquali, M.A.; Silvestrin, R.B.; Mello E.; Souza, T.; Moreira, J.C. 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.
6. De Oliveira, M.R.; Moreira, J.C. 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.
7. Schnorr, C.E.; da Silva Morrone, M.; Simões-Pires, A.; da Rocha, R.F.; Behr, G.A.; Moreira, J.C. Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Res.* **2011**, *1369*, 60–73.

8. Grune, T.; Lietz, G.; Palou, A.; Ross, A.C.; Stahl, W.; Tang, G.; Thurham, D.; Yin, S.A.; Biesalski, H.K. β -Carotene is an important vitamin A source for humans. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 2268S–2285S.
9. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84.
10. US National Institute of Health. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2011.
11. US National Research Council. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*; The National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2001.
12. Tang, G.; Hu, Y.; Yin, S.A.; Wang, Y.; Dallal, G.E.; Grusak, M.A.; Russell, R.M. β -Carotene in Golden Rice is as good as β -carotene in oil at providing vitamin A to children. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 658–664.
13. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
14. Draper, H.H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 421–431.
15. Ellman, G.L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
16. Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; del Castillo, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 153–158.
17. Dresch, M.T.; Rossato, S.B.; Kappel, V.D.; Biegelmeyer, R.; Hoff, M.L.; Mayorga, P.; Zuanazzi, J.A.; Henriques, A.T.; Moreira, J.C. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 107–114.
18. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126.
19. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
20. The ATBC Study Group. The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 1029–1035.
21. Omenn, G.S.; Goodman, G.E.; Thornquist, M.D.; Balmes, J.; Cullen, M.R.; Glass, A.; Keogh, J.P.; Meyskens, F.L.; Valanis, B.; Williams, J.H.; *et.al*. Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1150–1155.
22. Hennekens, C.H.; Buring, J.E.; Manson, J.E.; Stampfer, M.; Rosner, B.; Cook, N.R.; Belanger, C.; LaMotte, F.; Gaziano, J.M.; Ridker, P.M.; *et.al*. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1145–1149.
23. Lee, I.-M.; Cook, N.R.; Manson, J.E.; Buring, J.E.; Hennekens, C.H. β -Carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: The Women's Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 2102–2109.

24. Greenberg, E.R.; Baron, J.A.; Karagas, M.R.; Stukel, T.A.; Nierenberg, D.W.; Stevens, M.M.; Mandel, J.S.; Haile, R.W. Mortality associated with low plasma concentration of β carotene and the effect of oral supplementation. *JAMA* **1996**, *275*, 699–703.
25. Russell, R.M. The enigma of β -carotene in carcinogenesis: What can be learned from animal studies. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 262S–268S.
26. Great Britain: Committee on Medical Aspects of Food Policy; Great Britain: Department of Health; Acheson, D. *Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom*; HMSO: London, UK, 1991; pp. 1–210.
27. Australian National Health and Medical Research Council; New Zealand Ministry of Health. *Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand Including Recommended Dietary Intakes*; NHRMC Press (AU): Canberra, Australia, 2006.
28. US National Research Council. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th ed.; The National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 1995.
29. Rice-Evans, C.A.; Sampson, J.; Bramley, P.M.; Holloway, D.E. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Radic. Res.* **1997**, *26*, 381–398.
30. Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 261–272.
31. Briviba, K.; Schnäbele, K.; Rechkemmer, G.; Bub, A. Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1081–1083.
32. Cao, G.; Booth, S.L.; Sadowski, J.A.; Prior, R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1081–1087.
33. Cao, G.; Rusell, R.M.; Lischner, N.; Prior, R.L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 2383–2390.
34. Tapiero, H.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 100–110.
35. Bendich, A.; Shapiro, S.S. Effect of β -carotene and canthaxanthin on immune responses of the rat. *J. Nutr.* **1986**, *116*, 2254–2262.
36. Schunemann, H.J.; Grant, B.J.B.; Freudenheim, J.L.; Muti, P.; Browne, R.W.; Drake, J.A.; Klocke, R.A.; Trevisan, M. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *163*, 1246–1255.
37. Issing, W.J. Micronutrients as intermediate biomarkers in chemotherapy and enhancement for cancer treatments. In *Primary and Secondary Preventive Nutrition Part II*; Bendich, A., Deckelbaum, R.J., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2001; Volume 4, pp. 55–74.
38. Fiedor, J.; Burda, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* **2014**, *6*, 466–488
39. Wang, Y.; Chun, O.K.; Song, W.O. Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: A review of human studies. *Nutrients* **2013**, *5*, 2969–3004.

40. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Gluud, L.L.; Simonetti, R.G.; Gluud, C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *3*, CD007176.
41. Shete, V.; Quadro, L. Mammalian metabolism of β -carotene: Gaps in knowledge. *Nutrients* **2013**, *5*, 4849–4868.
42. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 1634–1658.
43. Gopal, K.; Nagarajan, P.; Raj, T.A.; Jahan, P.; Ganapathy, H.S.; Mahesh Kumar, M.J. Effect of dietary β carotene on cerebral aneurysm and subarachnoid haemorrhage in the brain apo E^{-/-} mice. *J. Thromb. Thrombolysis* **2011**, *32*, 343–355.
44. Jama, J.W.; Launer, L.J.; Witteman, J.C.; den Breeijen, J.H.; Breteler, M.M.; Grobbee, D.E.; Hofman, A. Dietary antioxidants and cognitive function in a population-based sample of older persons. The Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* **1996**, *144*, 275–280.
45. Akbaraly, N.T.; Faure, H.; Gourlet, V.; Favier, A.; Berr, C. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: Results of the EVA Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2007**, *62*, 308–316.
46. Rinaldi, P.; Polidori, M.C.; Metastasio, A.; Mariani, E.; Mattioli, P.; Cherubini, A.; Catani, M.; Cecchetti, R.; Senin, U.; Mecocci, P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 915–919.
47. Von Arnim, C.A.; Herbolsheimer, F.; Nikolaus, T.; Peter, R.; Biesalski, H.K.; Ludolph, A.C.; Riepe, M.; Nagel, G. Dietary antioxidants and dementia in a population-based case-control study among older people in south Germany. *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *31*, 717–724.
48. Wengreen, H.J.; Munger, R.G.; Corcoran, C.D.; Zandi, P.; Hayden, K.M.; Fotuhi, M.; Skoog, I.; Norton, M.C.; Tschanz, J.; Breitner, J.C.; *et.al.* Antioxidant intake and cognitive function of elderly men and women: The Cache County Study. *J. Nutr. Health Aging* **2007**, *11*, 230–237.
49. Hu, P.; Bretsky, P.; Crimmins, E.M.; Guralnik, J.M.; Reuben, D.B.; Seeman, T.E. Association between serum β -carotene levels and decline of cognitive function in high-functioning older persons with or without apolipoprotein E 4 alleles: MacArthur studies of successful aging. *J. Gerontol.* **2006**, *61*, 616–620.
50. Engelhart, M.J.; Geerlings, M.I.; Ruitenberg, A.; van Swieten, J.C.; Hofman, A.; Witteman, J.C.; Breteler, M.M. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* **2002**, *287*, 3223–3229.
51. Grodstein, F.; Kang, J.H.; Glynn, R.J.; Cook, N.R.; Gaziano, J.M. A randomized trial of β carotene supplementation and cognitive function in men: The physicians' health study II. *Arch. Intern. Med.* **2007**, *167*, 2184–2190.

PARTE 3

DISCUSSÃO

Diferentes estudos na literatura têm investigado os efeitos da vitamina A sobre o comportamento utilizando tanto ratos deficientes em vitamina A quanto ratos suplementados com doses terapêuticas de palmitato de retinol. Assim como em outras funções biológicas, estes estudos indicam certa similaridade entre os efeitos observados em ratos deficientes e ratos expostos ao excesso de vitamina A (Olson e Mello, 2010). Os resultados dos experimentos com ratos Wistar adultos com deficiência em vitamina A tem indicado que a falta de vitamina A piora o desempenho dos animais em testes de memória e aprendizado espacial, assim como induz comportamentos do tipo-ansiedade (Cocco et al., 2002; Bonhomme et al., 2014a). Por sua vez, os experimentos com ratos Wistar adultos suplementados com doses terapêuticas de palmitato de retinol têm indicado que o excesso de vitamina A diminui a atividade locomotora e exploratória, e também induz comportamentos do tipo-ansiedade, mas não comportamentos do tipo-depressão (De Oliveira et al., 2007a; De Oliveira et al., 2007b; De Oliveira et al., 2008; De Oliveira et al., 2009). Além disso, os experimentos com a suplementação de ratas Wistar durante a gestação e a amamentação também indicam que o excesso de vitamina A induz alterações comportamentais similares nas ratas, assim como uma série de alterações comportamentais em seus filhotes (Schnorr et al., 2011).

As evidências acima reforçam a importância de uma ingestão adequada de vitamina A para a manutenção do desempenho cognitivo e da resposta emocional em ratos, sugerindo também que a vitamina A possa ter um papel importante nas alterações comportamentais observadas em ratos de meia-idade. Os ratos de meia-idade apresentam níveis mais elevados de comportamentos do tipo-ansiedade e tipo-

depressão, assim como um pior desempenho em testes cognitivos quando comparados com ratos mais jovens (Moretti et al., 2011). De fato, os experimentos com dieta enriquecida com retinol demonstram que a vitamina A é capaz de prevenir o declínio cognitivo em ratos e camundongos de meia-idade (Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013; Bonhomme et al., 2014b). Por outro lado, nenhum destes estudos se dedicou a investigar também os efeitos da suplementação com vitamina A sobre a reatividade emocional em ratos de meia-idade, apesar das evidências indicarem que a reatividade emocional possa influenciar o desempenho cognitivo (Moretti et al., 2011).

Nosso estudo demonstrou que a suplementação crônica com palmitato de retinol em doses baixas (300 RAE/kg/dia) induziu alterações comportamentais discretas no teste do Campo Aberto, indicando que os benefícios cognitivos reportados em estudos anteriores parecem ser independentes de alterações emocionais em ratos de meia-idade (Estudo I). Por sua vez, nosso estudo também demonstrou que a suplementação crônica com palmitato de retinol em doses moderadas (600-3000 RAE/kg/dia) induz uma diminuição na atividade exploratória, um aumento da aversão à área ansiogênica do aparato e um aumento do tempo em *freezing* no teste do Campo Aberto, sugerindo que a suplementação nestas doses é capaz de induzir alterações na reatividade emocional de ratos de meia-idade. Por outro lado, um estudo anterior reportou que uma dieta enriquecida com retinol com uma dose aproximada de 600 RAE/kg/dia não induz alterações na atividade exploratória e nos níveis de ansiedade em ratos adultos (Bonhomme et al., 2014a). Este contraste sugere um efeito comportamental dependente da idade dos ratos, mas é necessário considerar também outras diferenças importantes entre os estudos.

Entre as diferenças existentes entre os dois estudos talvez as mais importantes (além da idade dos animais) sejam as diferenças na formulação (hidrossolúvel x sólida) e possíveis diferenças pré-existentes no status de vitamina A dos animais experimentais. A influência da formulação da vitamina A em uma avaliação toxicológica foi identificada anteriormente em um estudo que investigou o potencial toxicológico de diferentes formulações (hidrossolúvel, lipossolúvel e sólida) e concluiu que as formulações hidrossolúveis podem ser mais tóxicas do que as formulações sólidas (Myhre et al., 2003). Por sua vez, a existência de diferenças no status prévio de vitamina A em animais de laboratórios nos EUA foi identificada por um estudo que investigou o status de vitamina A dos animais experimentais mantidos em uma dieta padrão (Penniston e Tanumihardjo, 2006). Este estudo reportou um aumento patológico no conteúdo de retinol no fígado de diversos animais de laboratório, indicando que esse aumento possa ser consequência da grande quantidade de vitamina A adicionada à ração (4x a recomendação para animais de laboratório) para compensar pelas perdas que ocorrem durante o transporte e armazenamento (Penniston e Tanumihardjo, 2006).

Infelizmente, a influência destes fatores nas diferenças comportamentais observadas nos dois estudos permanece indeterminada. Por outro lado, não observamos qualquer alteração clínica associada à intoxicação crônica com vitamina A (hipervitaminose A) nos animais suplementados, como vômitos, pilo ereção, tremores, fraqueza muscular ou diarreia, por exemplo. A suplementação crônica com palmitato de retinol também não induziu alterações no peso e nenhuma anomalia morfológica foi detectada durante a necropsia de todos os animais. Além disso, sabe-se que um aumento patológico de vitamina A no fígado pode provocar fibrose e a ativação de células hepáticas estreladas, que passam a secretar colágeno e podem causar cirrose. Sabe-se

também que estes processos patológicos no fígado estão fortemente associados ao estresse oxidativo (Jaeschke et al., 2002; European Food Safety Authority, 2006). Entretanto, a suplementação crônica com palmitato de retinol não induziu alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, ou nos diferentes marcadores de dano oxidativo no fígado dos ratos de meia-idade. De uma forma geral, nossos resultados sugerem que a suplementação com palmitato de retinol não induziu hepatotoxicidade e estão de acordo com outros estudos que também reportaram a ausência de hepatotoxicidade em ratos que foram suplementados por até 10 meses com doses entre 300-15000 RAE/kg/dia (European Food Safety Authority, 2006).

No mesmo estudo (Estudo I), nós também demonstramos que a suplementação crônica com palmitato de retinol induz um aumento generalizado do estresse oxidativo em diferentes regiões do encéfalo de ratos Wistar de meia-idade. Entretanto, a suplementação de uma dose baixa de palmitato de retinol (300 RAE/kg/dia) induziu dano oxidativo apenas no hipocampo enquanto as duas doses moderadas (600 e 3000 RAE/kg/dia) induziram dano oxidativo em todas as regiões investigadas. Em todas as regiões foi observado um aumento no dano oxidativo a lipídios, indicando um possível comprometimento da função normal das membranas biológicas, que pode resultar em um aumento da fluidez, a inativação de enzimas e receptores ancorados na membrana, assim como a promoção do efluxo citosólico de solutos (Halliwell e Gutteridge, 2006; Avery, 2011). Em todas as regiões também observamos um aumento no dano oxidativo a proteínas, indicando um possível comprometimento dos processos de sinalização celular e de regulação do metabolismo energético (Halliwell e Gutteridge, 2006). O aumento da carbonilação de proteínas (exceto no córtex cerebral) também pode induzir a formação de agregados de grande massa molecular com alto potencial citotóxico

(Halliwell e Gutteridge, 2006; Cecarini et al., 2007). Além disso, o aumento da oxidação dos grupamentos tióis das proteínas (exceto no estriado) pode induzir a formação excessiva de ligações dissulfeto entre proteínas, afetar o *fold*ing de proteínas e induzir a agregação e degradação de proteínas (Winterbourn e Metodiewa, 1999; Cumming et al., 2004; Sitia e Molteni, 2004).

Também neste estudo (Estudo I) nós demonstramos que a suplementação crônica com palmitato de retinol induz uma diminuição no nível das defesas antioxidantes não-enzimáticas no encéfalo (exceto no estriado) de ratos de meia-idade, evidenciado pela diminuição do potencial antioxidante redutor total (TRAP). Esta diminuição indica que a suplementação induziu uma eventual depleção de um ou mais componentes antioxidantes específicos, como a glutathiona (GSH), as vitaminas C e E, o ácido úrico e a bilirrubina (Lissi et al., 1995). É também interessante observar que a diminuição nos grupamentos tióis é paralela a diminuição nos níveis do potencial redutor antioxidante total (TRAP) nas mesmas regiões do encéfalo dos animais suplementados. Estes dois resultados em conjunto sugerem que a suplementação pode ter induzido a oxidação de grupamentos tióis não-proteicos importantes na composição das defesas antioxidantes não-enzimáticas, como a GSH.

Nós também postulamos que um aumento na formação de espécies reativas no encéfalo dos ratos de meia-idade suplementados com palmitato de retinol possa ser responsável por este marcante aumento no dano oxidativo (Estudo I). Nós sabemos que a vitamina A é capaz de induzir um aumento na produção de $\bullet\text{O}_2^-$ in vitro e que a suplementação com palmitato de retinol também é capaz de induzir um aumento na produção de $\bullet\text{O}_2^-$ no encéfalo de ratos jovens adultos (Murata e Kawanishi, 2000; De

Oliveira e Moreira, 2007). Um aumento na produção de $\bullet\text{O}_2^-$ poderia ser responsável por induzir tanto o aumento na atividade da SOD quanto a diminuição da atividade da CAT no encéfalo, pois sabe-se que as altas concentrações de $\bullet\text{O}_2^-$ são capazes de estimular a atividade da SOD e inibir a atividade da CAT (Kono e Fridovich, 1982; Shimizu, Kobayashi e Hayashi, 1984; Halliwell e Gutteridge, 2006). Sabe-se também que o $\bullet\text{O}_2^-$ é capaz de induzir a oxidação de várias enzimas com ferro-enxofre, o que pode resultar em uma liberação de íons ferro (presente em grandes quantidades no cérebro) que pode promover a reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 2006; Liang e Patel, 2004). O $\bullet\text{O}_2^-$ pode ainda reagir com o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), promovendo a formação de peroxinitrito (ONOO), uma molécula não-radical capaz de oxidar rapidamente vários tipos de moléculas (Halliwell e Gutteridge, 2006; Liang e Patel, 2004).

Da mesma forma postulamos que a suplementação crônica com palmitato de retinol pode ter aumentado a disponibilidade de H_2O_2 no encéfalo, visto que a suplementação aumentou a razão SOD/PER em todas as regiões do encéfalo (Estudo I). Sabe-se que sob condições fisiológicas, o H_2O_2 (bem como outras espécies reativas) desempenha um papel importante no cérebro, incluindo a regulação de processos de sinalização intracelular (Veal, Day e Morgan, 2007; Miller et al., 2007; Veal e Day, 2011). Entretanto, um aumento na disponibilidade de H_2O_2 pode perturbar seriamente esses processos de sinalização celular e, via reação de Fenton, induzir a formação de radicais hidroxilas ($\text{OH}\bullet$), os quais por sua vez são capazes de reagir com um grande número de biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 2006; Veal, Day e Morgan, 2007).

Embora no nosso estudo não possamos estabelecer uma relação de causa e efeito entre as alterações comportamentais e o estresse oxidativo observado no encéfalo de ratos de meia-idade após a suplementação crônica com palmitato de retinol, existe na literatura um número cada vez maior de evidências para essa associação a partir de experimentos utilizando diferentes modelos experimentais (como por exemplo, estresse de imobilização, nado forçado, estresse crônico leve, separação materna, bulbectomia olfativa e estresse social). A evidência mais consistente nestes estudos é o aumento na produção total de diferentes espécies reativas (incluindo $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\text{OH}\bullet$) e o aumento no nível de diferentes marcadores de dano oxidativo à biomoléculas (como por exemplo, TBARS, dienos conjugados e carbonilação de proteínas) no encéfalo destes animais (Matsumoto et al., 1999; Sahin e Gumuslu, 2004; Eren, Naziroglu e Demirdas, 2007; Rammal et al., 2008; Lucca et al., 2009a; Lucca et al., 2009b; Zafir e Banu, 2009; Tunez et al., 2010). Além disso, é consistente a diminuição no nível de diferentes componentes específicos das defesas antioxidantes não-enzimáticas (Sahin e Gumuslu, 2004; Eren, Naziroglu e Demirdas, 2007; Tunez et al., 2010).

Nestes diferentes estudos foram encontradas também algumas alterações à atividade das enzimas antioxidantes semelhantes às observadas no encéfalo dos ratos de meia-idade suplementados com palmitato de retinol. Entre as diferentes enzimas, a evidência mais consistente na literatura é o aumento na atividade da SOD no encéfalo de animais ansiosos ou deprimidos (Sahin e Gumuslu, 2004; Zafir e Banu, 2009; Djordjevic et al., 2009; Tunez et al., 2010; Grundmann et al., 2010). Por outro lado, a atividade das demais enzimas antioxidantes é reportada de forma inconsistente, sendo observado aumento, diminuição e até mesmo nenhuma alteração em diferentes modelos

experimentais (Sahin e Gumuslu, 2004; Eren, Naziroglu e Demirdas, 2007; Lucca et al, 2009b; Zafir e Banu, 2009; Djordjevic et al., 2009; Tunez et al., 2010).

Por outro lado, nosso segundo estudo demonstra que a suplementação crônica com β -caroteno, em doses equivalentes às doses frequentemente utilizadas em estudos com suplementação de palmitato de retinol, não induz alterações em diferentes parâmetros de estresse oxidativo, como a atividade das enzimas antioxidantes e o nível de marcadores de dano oxidativo à macromoléculas (Estudo II). Considerando o grande contraste com os resultados reportados para a suplementação com palmitato de retinol, nosso estudo indica que a suplementação com β -caroteno tem potencial para se tornar uma alternativa nutriterapêutica mais segura do que os ésteres de retinol. Além disso, o consumo de suplementos com β -caroteno tem sido indicado como capaz de diminuir a incidência de aneurismas e de isquemias cerebrais (Gopal et al., 2011). Existem também diferentes tipos de estudos que indicam que a ingestão adequada de β -caroteno é importante para a manutenção da capacidade cognitiva e que diminui o risco de demência (Jama et al., 1996; Engelhart et al., 2002; Rinaldi et al., 2003; Hu et al., 2006; Akbaraly et al., 2007; Wengreen et al, 2007; Von Arnim et al., 2012). Estes benefícios para a função cognitiva associados ao consumo de β -caroteno parecem estar associados ao consumo em longo prazo, mas não o consumo eventual (Grodstein et al., 2007).

Neste mesmo estudo também demonstramos que a suplementação com as mesmas doses de β -caroteno foi capaz de alterar os parâmetros redox no plasma de ratos adultos que foram mantidos em uma dieta normal (Estudo II). A suplementação efetivamente induziu um aumento do TRAP e uma diminuição do nível de marcadores de dano oxidativo a lipídios. Visto que o TRAP no plasma é dependente das

concentrações relativas de diferentes antioxidantes e de seu sinergismo, o aumento no TRAP sugere uma absorção bem sucedida do β -caroteno e um conseqüente aumento no nível das defesas antioxidantes não-enzimáticas (Cao et al., 1998a; Cao et al., 1998b). Além disso, por ser uma molécula lipofílica, o β -caroteno tende a se acumular em compartimentos lipofílicos, tais como as membranas e lipoproteínas, sendo proposto como um antioxidante importante para a interrupção de reações em cadeia, assim como na eliminação de lipóxidos e lipoperóxidos (Grune et al., 2010).

É possível que pelo menos parte dos efeitos positivos especulados como estando associados ao consumo de β -caroteno sejam decorrentes de sua atuação como um antioxidante, como observado no plasma de ratos adultos (Estudo II). Atualmente, o β -caroteno é considerado como sendo capaz de proteger os linfócitos humanos do dano oxidativo e conseqüentemente proteger o organismo contra várias doenças, incluindo o cancro, as doenças cardiovasculares e as doenças oftalmológicas (Tapiero, Townsend e Tew, 2004). O β -caroteno também tem sido apontado como sendo importante para o sistema imunitário e para a função pulmonar, sendo capaz de aumentar o volume expiratório forçado e a capacidade respiratória forçada (Bendich e Shapiro, 1986; Schunemann et al., 2001). Existem estudos também que sugerem uma relação inversa entre a ingestão de β -caroteno e o risco de diferentes tipos de câncer, especialmente nas fases iniciais da carcinogênese (Issing, 2001). Estes e outros benefícios associados ao consumo de β -caroteno (e outros antioxidantes presentes na dieta) foram recentemente revisados em duas publicações (Fiedor e Burda, 2014; Wang, Chun e Song, 2013).

Por outro lado, apesar de todas estas evidências de benefícios associados ao consumo de β -caroteno, seu potencial como molécula alternativa nutriterapêutica

precisa ser investigado mais a fundo. Principalmente porque apesar destas evidências muitos estudos clínicos grandes têm reportado resultados contraditórios no que diz respeito aos benefícios da suplementação com β -caroteno. Diversos destes estudos reportaram resultados negativos (Hennekens et al., 1996; Greenberg et al., 1996; Lee et al., 1999) enquanto outros reportaram resultados adversos, como o aumento da incidência de câncer de pulmão e da mortalidade, quando compararam indivíduos suplementados com um grupo placebo (The ATBC Study Group, 1994; Omenn et al., 1996). Recentemente, uma importante uma revisão sistemática também encontrou uma associação entre o consumo de suplementos antioxidantes (incluindo o β -caroteno) e um aumento na mortalidade (Bjelakovic et al., 2012).

Uma hipótese que ganha força na comunidade científica é que esta contradição entre tantos estudos importantes deve estar associada às doses investigadas que muitas vezes são elevadas e até mesmo acima do nível de ingestão tolerável (Bjelakovic et al., 2012). Essa hipótese é reforçada pelos resultados de um estudo que avaliou os efeitos do consumo de suplementos com β -caroteno em diferentes doses sobre a metaplasia pulmonar induzida pela fumaça do cigarro e observou que, apesar do consumo equivalente a 30 mg estar associado a metaplasia escamosa do pulmão, o consumo de doses equivalentes a 6 mg forneceu proteção moderada contra a fumaça do cigarro (Russell, 2004). Além disso, sabe-se que o consumo de doses elevadas de β -caroteno pode estimular sua clivagem assimétrica por mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos, como a β -caroteno-9',10'-oxigenase (CMOII) (Shete e Quadro, 2013) (Figura 2). Este estímulo pode resultar em um aumento consideravelmente da produção de β -apocarotenóides, os quais podem ser responsáveis pelos efeitos deletérios

observados em muitos ensaios clínicos, pois são capazes de diminuir os níveis celulares de ácido retinóico e inibir a sinalização por retinóides (Shete e Quadro, 2013).

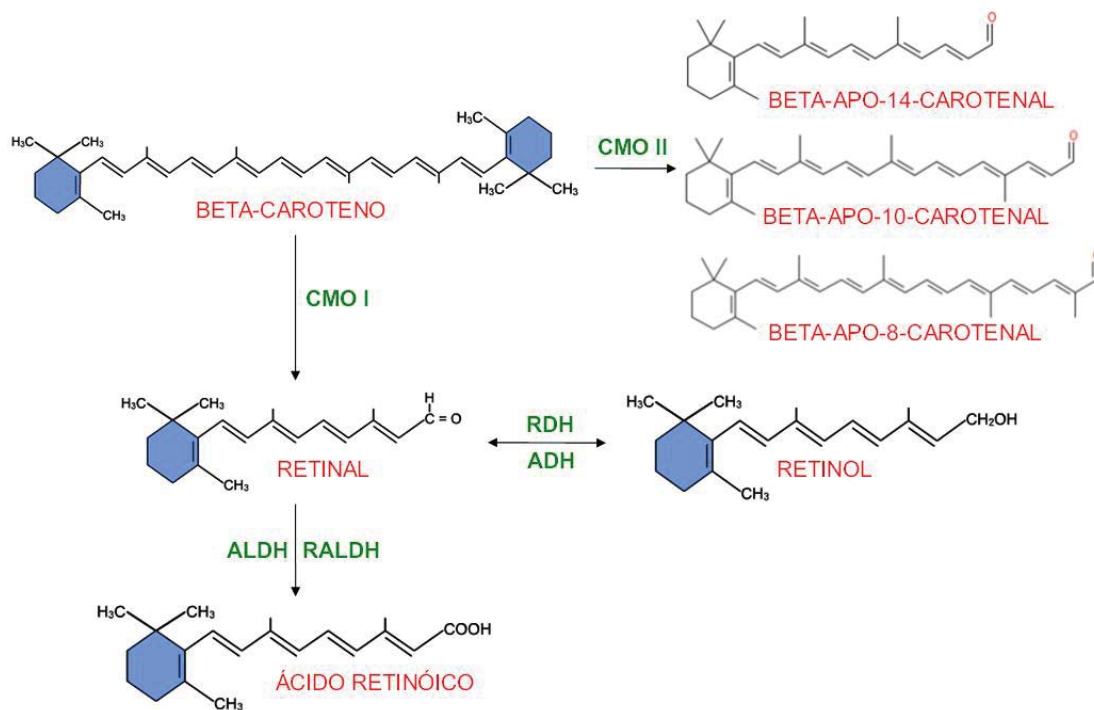


Figura 2. Metabolismo do beta-caroteno. Beta-caroteno-15,15'-oxigenase (CMOI), beta-caroteno-9',10'-oxigenase (CMOII), retinal desidrogenase (RALDH) aldeído desidrogenase (ALDH), retinol desidrogenase (RDH) e álcool desidrogenase (ADH). Todas as estruturas moleculares foram obtidas em Molecular Networks (<http://www.molecular-networks.com>), 2015.

Em resumo, o Estudo I desta tese apresenta resultados que se somam a inúmeros outros estudos anteriores que alertam para uma possível neurointoxicação associada ao consumo de suplementos na forma de ésteres de retinol (De Oliveira et al., 2007a; De Oliveira et al., 2007b; De Oliveira et al., 2008; De Oliveira et al., 2009; Schnorr et al., 2011). Desta forma, este estudo reforça a importância do Estudo II que sugere que a suplementação com β -caroteno em doses moderadas (300-3000 RAE/kg/dia) possa ter potencial para se tornar uma alternativa nutriterapêutica mais segura (do ponto de vista do estresse oxidativo) aos ésteres de retinol. A suplementação crônica com β -caroteno, ao contrário dos ésteres de retinol, foi capaz de induzir uma atividade antioxidante

sistêmica sem induzir um perigoso efeito pró-oxidante em diferentes regiões do encéfalo de ratos adultos.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta tese, podemos concluir que:

- 1) A suplementação crônica com doses moderadas de palmitato de retinol diminuiu a atividade exploratória, aumentou a aversão à área ansiogênica do aparato e aumentou o tempo em comportamentos do tipo freezing de ratos Wistar de meia-idade no teste do Campo Aberto, indicando que a suplementação nestas doses é capaz de induzir alterações na reatividade emocional;
- 2) A suplementação com doses moderadas de palmitato de retinol durante 28 dias não induziu alterações nos parâmetros de estresse oxidativo investigados no fígado de ratos Wistar de meia-idade, indicando que a suplementação não induziu um aumento patológico de vitamina A no fígado e que as alterações comportamentais observadas não estão associadas à hepatotoxicidade;
- 3) A suplementação com palmitato de retinol em doses moderadas por um período de 28 dias induziu um aumento no nível de marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas em diferentes regiões do encéfalo de ratos Wistar de meia-idade, indicando que a suplementação perturbou a homeostase redox no encéfalo e que as alterações comportamentais observadas estão associadas ao aumento do estresse oxidativo nas mesmas doses experimentais;

- 4) A suplementação crônica com palmitato de retinol nas mesmas doses experimentais induziu uma diminuição do TRAP e do conteúdo total de SH no encéfalo (exceto no estriado) de ratos Wistar de meia-idade, indicando que a suplementação diminuiu a capacidade de atuação das defesas antioxidantes não-enzimáticas, provavelmente devido a uma depleção dos níveis de GSH;
- 5) A suplementação crônica com doses moderadas de palmitato de retinol também induziu um aumento na razão SOD/CAT em todas as regiões investigadas do encéfalo de ratos Wistar de meia-idade, indicando que a suplementação pode ter induzido um aumento na produção de ROS ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2) que pode ser responsável pelo dano oxidativo observado nas mesmas doses experimentais;
- 6) A suplementação crônica com doses equivalentes de β -caroteno não induziu alterações nos níveis de marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas, ou na atividade das enzimas antioxidantes, em diferentes regiões do encéfalo de ratos Wistar adultos, indicando que a suplementação não perturbou a homeostase redox e não induziu estresse oxidativo nestas doses experimentais;
- 7) A suplementação crônica com β -caroteno nas mesmas doses experimentais induziu um aumento do TRAP e uma diminuição nos níveis de marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas

no plasma de ratos Wistar adultos, indicando que a suplementação resultou em uma absorção bem sucedida do β -caroteno e um importante efeito antioxidante no plasma;

- 8) Em resumo, esta tese como um todo indica: i) que a suplementação com doses moderadas de uma formulação hidrossolúvel de palmitato de retinol está associada a alterações comportamentais e ao aumento do estresse oxidativo no encéfalo de ratos, ii) mas que a suplementação com doses equivalentes de β -caroteno não está associada a perturbações da homeostase redox no encéfalo e apresentou atividade antioxidante no plasma, indicando que o β -caroteno pode ser uma alternativa nutriterapêutica mais segura do que o palmitato de retinol em suplementos alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (2007). Summary of the Individual and National Study on Food Consumption 2 INCA 2 2006–2007. Paris: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Akbaraly, N. T., Faure, H., Gourlet, V., Favier, A., Berr, C. (2007). Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: Results of the EVA Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 308–316.
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th edition). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Arivazhagan, P., Panneerselvam, C. (2002). Neurochemical changes related to ageing in the rat brain and the effect of DL-alpha-lipoic acid. *Exp. Gerontol.* 37(12), 1489-1494.
- Atmaca, M., Tezcan, E., Kuloglu, M., Ustundag, B., Tunckol, H. (2004). Antioxidant enzyme and malondialdehyde values in social phobia before and after citalopram treatment. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 254, 231–235.
- Avery, S. V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 434(2), 201–210.
- Bates, B., Lennox, A., Swan, G. (2009). National Diet and Nutrition Survey. London: Food Standards Agency and the Department of Health.
- Baxter, A. J., Charlson, F. J., Soverville A. J., Whiteford, H. A. (2011). Mental disorders as risk factors: assessing the evidence for the Global Burden of Disease Study. *BMC Medicine.* 9, 134.
- Bender, D. A. (Ed) (2003). Nutritional Biochemistry of the Vitamins second edition. Cambridge: Cambridge University Press.

- Bendich, A., Shapiro, S. S. (1986). Effect of β -carotene and canthaxanthin on immune responses of the rat. *J. Nutr.* 116, 2254–2262.
- Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M. A., Uydu, H. A., Bekaroglu, M., Deger, O. (2001). Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J. Affect. Disord.* 64, 43–51.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G., Gluud, C. (2012). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.* 3, CD007176.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Rodgers, R. J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B., Mos, J., Slangen, J. L. (Eds). *Animal models in psychopharmacology*. Boston: Birkhauser Verlag Basel, 1991, pp. 117-134.
- Bonhomme, D., Minni, A. M., Alfos, S., Roux, P., Richard, E., Higuieret, P., Moisan, M. P., Pallet, V., Touyarot, K. (2014a). Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front. Behav. Neurosci.* 4, 8:20.
- Bonhomme, D., Pallet, V., Dominguez, G., Servant, L., Henkous, N., Lafenêtre, P., Higuieret, P., Béracochéa, D., Touyarot, K. (2014b). Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. *Front. Aging Neurosci.* 7, 6:6.
- Botez, M. I., Botez, T., Ross-Chouinard, A., Lalonde, R. (1993). Thiamine and folate treatment of chronic epileptic patients: a controlled study with the Wechsler IQ scale. *Epilepsy Res.* 16, 157-163.
- Boveris, A., Navarro, A. (2008). Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life.* 60(5), 308-314.

- Bremner, J. D., McCaffery, P. (2008). The neurobiology of retinoic acid in affective disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32(2), 315–331.
- Briviba, K., Schnäbele, K., Rechkemmer, G., Bub, A. (2004). Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *J. Nutr.* 134, 1081–1083.
- Brown, D. J., Goodman, J. (1998). A review of vitamins A, C and E and their relationship to cardiovascular disease. *Clin. Excell. Nurse Pract.* 2(1), 10-22.
- Buettner, G. R. (2011). Superoxide dismutase in redox biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med. Chem.* 11, 341–346.
- Burdo, J. R., Connor, J. R. (2003). Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* 16, 63–75.
- Burhans, W. C., Heintz, N. H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1282–1293.
- Camougrand, N., Rigoulet, M. (2001). Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Respir Physiol.* 128(3), 393-401.
- Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., Prior, R. L. (1998a). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1081–1087.
- Cao, G., Rusell, R. M., Lischner, N., Prior, R. L. (1998b). Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* 128, 2383–2390.
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773(2), 93–104.

- Cefalu, C. A., (2011). Theories and mechanisms of aging. *Clin. Geriatr. Med.* 27(4), 91–506.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., Fadda, F. (2002). Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience.* 115, 475–482.
- Cole, G. M., Ma, Q. L., Frautschy, S. A. (2009). Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 81, 213-221.
- Collins, P. Y., Patel, V., Joestl, S. S., March, D., Insel, T. R., Daar, A. S., Bordin, I. A., Costello, E. J., Durkin, M., Fairburn, C., Glass, R. I., Hall, W., Huang, Y., Hyman, S. E., Jamison, K., Kaaya, S., Kapur, S., Kleinman, A., Ogunniyi, A., Otero-Ojeda, A., Poo, M. M., Ravindranath, V., Sahakian, B. J., Saxena, S., Singer, P. A., Stein, D. J., Anderson, W., Dhansay, M. A., Ewart, W., Phillips, A., Shurin, S., Walport, M. (2011). Grand challenges in global mental health. *Nature.* 475 (7354), 27-30.
- Cooper, C. E., Patel, R. P., Brookes, P. S., Darley-Usmar, V. M. (2002). Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem. Sci.* 27, 489–492.
- Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H., Schubert, D. (2004). Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 279, 21749–21758.
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Benfato, M. S., Bernard, E. A., Moreira, J. C. F. (2001). Retinol supplementation induces oxidative stress and modulate antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Radic. Res.* 34, 395–404.

- Das, U. N. (2008). Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia, and Alzheimer's disease—but how and why? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 78, 11-19.
- De Oliveira, M. R., de Bittencourt Pasquali, M. A., Silvestrin, R. B., Mello e Souza, T., Moreira, J. C. (2007a). Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain Res*. 1169, 112–119.
- De Oliveira, M. R., Silvestrin, R. B., Mello, E., Souza, T., Moreira, J. C. (2007b). 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*. 28, 1191–1199.
- De Oliveira, M. R., Moreira, J. C. (2007c). 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*. 173, 145–150.
- De Oliveira, M. R., Silvestrin, R. B., Mello e Souza, T., Moreira, J. C. F. (2008). 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*. 33, 378–383.
- De Oliveira, M. R., Oliveira, M. W. S., Behr, G. A., Moreira, J. C. F. (2009). Vitamin A supplementation at clinical doses induces a dysfunction in the redox and bioenergetics states, but did change neither caspases activities nor TNF- α levels in the frontal cortex of adult Wistar rats. *J. Psychiatr. Res*. 43, 754–762.
- De Oliveira, M. R., Lorenzi, R., Schnorr, C. E., Morrone, M., Moreira, J. C. (2011). Increased 3-nitrotyrosine levels in mitochondrial membranes and impaired

respiratory chain activity in brain regions of adult female rats submitted to daily vitamin A supplementation for 2 months. *Brain Res. Bull.* 86(3-4), 246-253.

Diplock, A. T. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(1), 189S-193S.

Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., Radojic, M.B. (2009). Chronic social isolation is related to both upregulation of plasticity genes and initiation of proapoptotic signaling in Wistar rat hippocampus. *J. Neural Transm.* 116, 1579–1589.

Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* 58(1), 39-46.

Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Ruitenber, A., van Swieten, J. C., Hofman, A., Witteman, J. C., Breteler, M. M. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 287, 3223–3229.

Eren, I., Naziroglu, M., Demirdas, A. (2007). Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem. Res.* 32, 1188–1195.

Ersoy, M. A., Selek, S., Celik, H., Erel, O., Kaya, M. C., Savas, H. A., Herken, H. (2008). Role of oxidative and antioxidative parameters in etiopathogenesis and prognosis of panic disorder. *Int. J. Neurosci.* 118, 1025–1037.

European Food Safety Authority. (2006). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. European Union:European Food Safety Authority.

Evans-Olders, R., Eintracht, S., Hoffer, L. J. (2010). Metabolic origin of hypovitaminosis C in acutely hospitalized patients. *Nutrition.* 26(11-12), 1070-1074.

- Expert Group on Vitamins and Minerals.(2003). Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. London: Food Standards Agency.
- Farah, A. (2009). The role of L-methylfolate in depressive disorders. *CNS Spectr.* 14(1-2), 2-7.
- Fiedor, J., Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients.* 6, 466–488.
- Fjell, A. M., Walhovd, K. B., Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. *Rev Neurosci.* 2010, 21, 187–221.
- Gahche, J., Bailey, R., Burt, V., Hughes, J., Yetley, E., Dwyer, J., Picciano, M. F., McDowell, M., Sempos, C. (2011). Dietary supplement use among U.S. adults has increased since NHANES III (1988–1994). *NCHS Data Brief.* 61, 1–8.
- Gal, S., Zheng, H., Fridkin, M., Youdim, M. B. (2005). Novel multi-functional neuroprotective iron chelator – monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J. Neurochem.* 95, 79–88.
- Gardner, J. M., Powell, C. A., Baker-Henningham, H., Walker, S. P., Cole, T. J., Grantham-McGregor, S. M. Zinc supplementation and psychosocial stimulation: effects on the development of undernourished Jamaican children. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 399-405.
- Gelain, D. P. Sinalização não-genômica do retinol mediada por espécies reativas. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

- Gemma, C., Vila, J., Bachstetter, A., Bickford, P. C. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Riddle, D. R. (Ed). Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007. Cap 15.
- Gerster, H. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 16, 109–26.
- Goodwin, T. W. (1980). *The biochemistry of the carotenoids* second edition. New York:Chapman and Hall.
- Gopal, K., Nagarajan, P., Raj, T. A., Jahan, P., Ganapathy, H. S., Mahesh Kumar, M. J. (2011). Effect of dietary β carotene on cerebral aneurysm and subarachnoid haemorrhage in the brain apo E^{-/-} mice. *J. Thromb. Thrombolysis.* 32, 343–355.
- Greenberg, E. R., Baron, J. A., Karagas, M. R., Stukel, T. A., Nierenberg, D. W., Stevens, M. M., Mandel, J. S., Haile, R. W. (1996). Mortality associated with low plasma concentration of β carotene and the effect of oral supplementation. *JAMA.* 275, 699–703.
- Grodstein, F., Kang, J. H., Glynn, R. J., Cook, N. R., Gaziano, J. M. (2007). A randomized trial of β carotene supplementation and cognitive function in men: The physicians' health study II. *Arch. Intern. Med.* 167, 2184–2190.
- Grundmann, O., Lv, Y., Kelber, O., Butterweck, V. (2010). Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the inter-relationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology.* 58, 767–773.
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A. C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S., Biesalski, H. K. (2010). Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. *J. Nutr.* 140, 2268S–2285S.

- Guo, X., Willows, N., Kuhle, S., Jhangri, G., Veugelers, P. J. (2009). Use of vitamin and mineral supplements among canadian adults. *Can. J. Public Health.* 100(5), 357–360.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31, 261–272.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2006). *Free Radicals Biology and Medicine* 4th edition. Oxford: Oxford Science Publications.
- Harrison , E. H. (2012). Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821, 70-77.
- Hector, M., Burton, J. R. (1988). What are the psychiatric manifestations of vitamin B12 deficiency? *J. Am. Geriatr. Soc.* 36, 1105-1112.
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., Manson, J. E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N. R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J. M., Ridker, P. M., Willett, W., Peto, R. (1996). Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1145–1149.
- Hu, P., Bretsky, P., Crimmins, E. M., Guralnik, J. M., Reuben, D. B., Seeman, T. E. (2006). Association between serum β -carotene levels and decline of cognitive function in high-functioning older persons with or without apolipoprotein E 4 alleles: MacArthur studies of successful aging. *J. Gerontol.* 61, 616–620.
- Issing, W. J. (2001). Micronutrients as intermediate biomarkers in chemotherapy and enhancement for cancer treatments. In: Bendich, A., Deckelbaum, R. J. (Eds). *Primary and Secondary Preventive Nutrition Part II.* Totowa:Humana Press. vol. 4, p. 55–74.

- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65(2), 166-176.
- Jama, J. W., Launer, L. J., Wittteman, J. C., den Breeijen, J. H., Breteler, M. M., Grobbee, D. E., Hofman, A. (1996). Dietary antioxidants and cognitive function in a population-based sample of older persons. The Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 144, 275–280.
- Jané-Llopis, E., Gabilondo, A. (2008). Mental Health in Older People. Consensus paper. Luxembourg: European Communities.
- Jeandel, C., Nicolas, M. B., Nabet-Belleville, F., Cuny, G. (1989). Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology.* 35(5-6), 275-82.
- Jorde, R., Sneve, M., Figenschau, Y., Svartberg, J., Waterloo, K. (2008). Effects of vitamin D supplementation on symptoms of depression in overweight and obese subjects: randomized double blind trial. *J. Intern. Med.* 264, 599-609.
- Kessler, Üstün (Editor). (2008). The WHO World Mental Health Surveys: Global Perspectives on the Epidemiology of Mental Disorders. New York: Cambridge University Press.
- Kono, Y., Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751–575.
- Kudin, A. P., Debska-Vielhaber, G., Kunz, W. S. (2005). Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed. Pharmacother.* 59, 163–168.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Tunckol, H., Ustundag, B. (2002). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology.* 46, 27–32.

- Lakhan, S. E., Vieira, K. F. (2008). Nutritional therapies for mental disorders. *Nutr. J.* 2008, 7-2.
- Lane, M. A., Bailey, S. J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 75(4), 275–293.
- Lane, N. (2004). *Oxygen: The Molecule that Made the World*. New York:Oxford University Press.
- Lee, I. M., Cook, N. R., Manson, J. E., Buring, J. E., Hennekens, C. H. (1999). β -Carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: The Women's Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 2102–2109.
- Lessin, W. J., Schwartz, S. J. (1997). Quantification of cis-trans Isomers of Provitamin A Carotenoids in Fresh and Processed Fruits and Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3728–3732.
- Liang, L. P., Patel, M. (2004). Iron–sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 90, 1076–1084.
- Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M. D. (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 153-158.
- Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Reus, G. Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E. C., Quevedo, J. (2009a). Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem. Int.* 54, 358–362.
- Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Reus, G. Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E. C., Quevedo, J. (2009b). Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J. Psychiatr. Res.* 43, 864–869.

- Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 843–853.
- Mailly, F., Marin, P., Israel, M., Glowinski, J., Premont, J. (1999). Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 73, 1181–1188.
- Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A., Mecocci, P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 827(1):65-75.
- Matsumoto, K., Yobimoto, K., Huong, N. T., Abdel-Fattah, M., Van Hien, T., Watanabe, H. (1999). Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and angiogenic drugs in mice. *Brain Res.* 839, 74–84.
- McCaffery, P., Drager, U. C. (2000). Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 233–249.
- McCaffery, P. J., Adams, J., Maden, M., Rosa-Molinar, E. (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur. J. Neurosci.* 18, 457–472.
- McCaffery, P., Zhang, J., Crandall, J. E. (2005) Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol.* 66, 780-791.
- McLennan, W., Podger A. (Eds). (1997). National Nutrition Survey: Selected Highlights. Canberra: Australian Bureau of Statistics.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R. M., Oliveira, D. M., Cerqueira, M. D., El-Bachá, R. S. (2011). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011, 2011:467180.

- Miller, E. W., Tulyathan, O., Isacoff, E. Y., Chang, C. J. (2007). Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. *Nat Chem Biol.* 3(5), 263-7.
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuieret, P., Marighetto, A. (2008). Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J. Neurosci.* 28, 279–291.
- Moretti, M., de Souza, A. G., de Chaves, G., de Andrade, V. M., Romao, P. R., Gavioli, E. C., Boeck, C. R. (2011). Emotional behavior in middle-aged rats: Implications for geriatric psychopathologies. *Physiol. Behav.* 10, 102(1), 115-120.
- Murata, M., Kawanishi, S. (2000). Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivatives via superoxide generation. *J. Biol. Chem.* 275, 2003–2008.
- Murray-Kolb, L. E., Beard, J. L. (2007). Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 778-787.
- Myhre, A. M., Carlsen, M. H., Bohn, S. K., Wold, H. L., Laake, P., Blomhoff, R. (2003). Water-miscible, emulsified, and solid forms of retinol supplements are more toxic than oil-based preparations. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 1152-1159.
- Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest.* 111, 769–778.
- Navarro, A., Boveris, A. (2010). Brain Mitochondrial Dysfunction in Aging, Neurodegeneration, and Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2010, 2-34.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A. I. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11(6), 851-876.

- Olson, C. R., Mello, C. V. (2010). Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol. Nutr. Food Res.* 54(4), 489-495.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., Hammar, S. (1996). Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1150–1155.
- Organização Mundial da Saúde. (2011). Global status report on non-communicable diseases 2010. Geneva: Organização Mundial da Saúde.
- Organização Mundial da Saúde. (2013a). Functional decline and dependence in ageing populations. Geneva: Organização Mundial da Saúde.
- Organização Mundial da Saúde. (2013b). Comprehensive mental health action plan 2013-2020. Geneva: Organização Mundial da Saúde.
- Otten, J. J., Hellwig, J. P., Meyers, L. D. (Eds) (2006). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: The National Academies Press.
- Pasquali, M. A., Gelain, D. P., Zanotto-Filho, A., de Souza, L. F., de Oliveira, R. B., Klamt, F., Moreira, J. C. (2008). Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. *Toxicol. In Vitro.* 22, 1177–1183.
- Pasquali, M. A., Gelain, D. P., Oliveira, M. R., Behr, G. A., Motta, L. L., Rocha, R. F., Klamt, F., Moreira, J. C. (2009). Vitamin A supplementation induces oxidative stress and decreases the immunoccontent of catalase and superoxide dismutase in rat lungs. *Exp. Lung Res.* 35(5), 427-38.

- Pasquali, M. A., Schnorr, C. E., Feistauer, L. B., Gelain, D. P., Moreira, J. C. (2010). Vitamin A supplementation to pregnant and breastfeeding female rats induces oxidative stress in the neonatal lung. *Reprod. Toxicol.* 30(3), 452-456.
- Penniston, K. L., Tanumihardjo, S. A. (2006). The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 191–201.
- Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., Soulimani, R. (2008). Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav. Immun.* 22, 1156–1159.
- Rice-Evans, C. A., Sampson, J., Bramley, P. M., Holloway, D. E. (1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? *Free Radic. Res.* 26, 381–398.
- Rinaldi, P., Polidori, M. C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., Mecocci, P. (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 24, 915–919.
- Rocha, R. F., de Oliveira, M. R., Schonhofen, P., De Bastiani, M. A., Schnorr, C. E., Klamt, F., Dal Pizzol, F., Moreira, J. C. (2010). Vitamin A supplementation for different periods alters rat vascular redox parameters. *J. Physiol. Biochem.* 66(4), 351-357.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 3289-3304.
- Rogovik, A. L., Vohra, S., Goldman, R. D. (2010). Safety considerations and potential interactions of vitamins: should vitamins be considered drugs? *Ann. Pharmacother.* 44(2), 311–324.

- Rothman, K. J., Moore, L. L., Singer, M. R., Nguyen, U. S. D. T., Mannino, S., Milunsky, A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N. Engl. J. Med.* 333(21), 1369–1373.
- Russell, R. M. (2004). The enigma of β -carotene in carcinogenesis: What can be learned from animal studies. *J. Nutr.* 134, 262S–268S.
- Sahin, E., Gumuslu, S. (2004). Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav. Brain Res.* 155, 241–248.
- Salim, S. (2014). Oxidative stress and psychological disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 12(2), 140-147.
- Sarsour, E. H., Kumar, M. G., Chaudhuri, L., Kalen, A. L., Goswami, P. C. (2009). Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2985–3011.
- Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001). Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212.
- Schnorr, C. E., da Silva Morrone, M., Simões-Pires, A., da Rocha, R. F., Behr, G. A., Moreira, J. C. (2011). Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Res.* 1369, 60-73.
- Schunemann, H. J., Grant, B. J. B., Freudenheim, J. L., Muti, P., Browne, R. W., Drake, J. A., Klocke, R. A., Trevisan, M. (2001). The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1246–1255.
- Scrable, H., Burns-Cusato, M., Medrano, S. (2009). Anxiety and the aging brain: stressed out over p53? *Biochim. Biophys. Acta.* 1790(12), 1587-1591.

- Selek, S., Herken, H., Bulut, M., Ceylan, M.F., Celik, H., Savas, H. A., Erel, O. (2008). Oxidative imbalance in obsessive compulsive disorder patients: a total evaluation of oxidant-antioxidant status. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32, 487–491.
- Shete, V., Quadro, L. (2013). Mammalian metabolism of β -carotene: Gaps in knowledge. *Nutrients.* 5, 4849–4868.
- Shimizu, N., Kobayashi, K., Hayashi, K. (1984). The reaction of superoxide radical with catalase. *J. Biol. Chem.* 259, 4414–4418.
- Sitia, R., Molteni, S. N. (2004). Stress, protein (mis) folding, and signaling: the redox connection. *Sci. STKE.* 2004(239), 27.
- Skeie, G., Braaten, T., Hjartåker, A., Lentjes, M., Amiano, P., Jakšzyn, P., Pala, V., Palanca, A., Niekerk, E. M., Verhagen, H., Avloniti, K., Psaltopoulou, T., Niravong, M., Touvier, M., Nimpisch, K., Haubrock, J., Walker, L., Spencer, E. A., Roswall, N., Olsen, A., Wallström, P., Nilsson, S., Casagrande, C., Deharveng, G., Hellström, V., Boutron-Ruault, M. C., Tjønneland, A., Joensen, A. M., Clavel-Chapelon, F., Trichopoulou, A., Martinez, C., Rodríguez, L., Frasca, G., Sacerdote, C., Peeters, P. H., Linseisen, J., Schienkiewitz, A., Welch, A. A., Manjer, J., Ferrari, P., Riboli, E., Bingham, S., Engeset, D., Lund, E., Slimani, N. (2009). Use of dietary supplements in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition calibration study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, S226–238.
- Skully, R., Saleh, A.S. (2011). Aging and the effects of vitamins and supplements. *Clin. Geriatr. Med.* 27(4), 591–607.
- Smith, A. D., Refsum, H. (2009). Vitamin B-12 and cognition in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 707S-711S.

- Spencer, J. P., Jenner, P., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Halliwell, B. (1998). Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 71, 2112– 2122.
- Strong, R. (1998). Neurochemical changes in the aging human brain: implications for behavioral impairment and neurodegenerative disease. *Geriatrics.* 53(1), 9-12.
- Strümpel, C., Billings, J. (Ed.) (2008). Overview on health promotion for older people. European Union: European Commission.
- Sydenstricker, V. P., Cleckley, H. M. (1941). The effect of nicotinic acid in stupor, lethargy and various other psychiatric disorders. *Is. J. Psychiatry.* 98, 83-92.
- Tangney, C. C., Tang, Y., Evans, D. A., Morris, M. C. (2009). Biochemical indicators of vitamin B12 and folate insufficiency and cognitive decline. *Neurol.* 72, 361-367.
- Tanoury, Z., Piskunov, A., Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J. Lipid Res.* 54(7), 1761-1775.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 58, 100–110.
- The ATBC Study Group. (1994). The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* 330, 1029-1035.
- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenêtre, P., Richard, E., Higuieret, P., Pallet, V. (2013). A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS One.* 8(8), e72101.

- Troesch, B., Eggersdorfer, M., Weber P. (2012). 100 years of vitamins: adequate intake in the elderly is still a matter of concern. *J. Nutr.* 142(6), 979-980.
- Tu, J. B., Shafey, H., VanDewetering, C. (1994). Iron deficiency in two adolescents with conduct, dysthymic and movement disorders. *Can. J. Psychiatry.* 39, 371-375.
- Tunez, I., Drucker-Colin, R., Montilla, P., Pena, J., Jimena, I., Medina, F. J., Tasset, I. (2010). Protective effect of nicotine on oxidative and cell damage in rats with depression induced by olfactory bulbectomy. *Eur. J. Pharmacol.* 627, 115–118.
- Turner, P. V., Vaughn, E., Sunohara-Neilson, J., Ovari, J., Leri, F. (2012). Oral gavage in rats: animal welfare evaluation. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51(1), 25-30.
- US Food and Drug Administration. (2005). *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Adult Healthy Volunteer*. Rockville: US Food and Drug Administration.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 7(1), 65–74.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- van Rossum, C. T. M., Fransen, H. R., Verkaik-Kloosterman, J., Buurma-Rethans, E. J. M., Ocké, M. C. (2011). *Dutch National Food Consumption Survey 2007-2010 Diet of children and adults aged 7 to 69 years*. Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment.
- Veal, E. A., Day, A. M., Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell.* 26(1), 1-14.

- Veal, E., Day, A. (2011). Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal.* 15(1), 147-51.
- Vogel, T., Dali-Youcef, N., Kaltenbach, G., Andres, E. (2009). Homocysteine, vitamin B12, folate and cognitive functions: a systematic and critical review of the literature. *Int. J. Clin. Pract.* 63, 1061-1067.
- Von Arnim, C. A., Herbolsheimer, F., Nikolaus, T., Peter, R., Biesalski, H. K., Ludolph, A. C., Riepe, M., Nagel, G. (2012). Dietary antioxidants and dementia in a population-based case-control study among older people in south Germany. *J. Alzheimer Dis.* 31, 717–724.
- Wang, Y., Chun, O. K., Song, W. O. (2013). Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: A review of human studies. *Nutrients.* 5, 2969–3004.
- Wengreen, H. J., Munger, R. G., Corcoran, C. D., Zandi, P., Hayden, K. M., Fotuhi, M., Skoog, I., Norton, M. C., Tschanz, J., Breitner, J. C., Welsh-Bohmer, K. A. (2007). Antioxidant intake and cognitive function of elderly men and women: The Cache County Study. *J. Nutr. Health Aging.* 11, 230–237.
- Wilkins, C. H., Sheline, Y. I., Roe, C. M., Birge, S. J., Morris, J. C. Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults. *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 14, 1032-1040.
- Winterbourn, C. C., Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 322-328.
- Wrona, M. Z., Dryhurst G. (1998). Oxidation of serotonin by superoxide radical: implications to neurodegenerative brain disorders. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 639–650.

- Yeum, K. J., Russell, R. M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 483–504.
- Young, A. J., Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 20–7.
- Zafir, A., Banu, N. (2009). Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress.* 12, 167–177.
- Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 863–873.
- Zhang, X. Y., Yao, J. K. (2013). Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 46, 197-199