

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica

*Aumento da Atividade da MMP-2 Induzido por Tratamento com
Retinol e Ácido Retinóico em Células de Sertoli Cultivadas*

Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito para
a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas – Bioquímica.

Porto Alegre

2008

Aos meus pais, com carinho e saudades.

Agradecimentos

Aos meus familiares, que são o que tenho de mais sólido.

Ao meu orientador, pela amizade, pela infinita paciência e pelos impagáveis ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório 32, pelas diversas contribuições ao longo destes anos de convívio.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pela sempre prestativa ajuda.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica, pela formação proporcionada.

Ao Prof. Dr. José Carlos Germani, pela compreensão durante meu primeiro ano de mestrado.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ-URGS, pelo apoio financeiro.

Especialmente à minha esposa Joana, pela compreensão, carinho, amor, paciência e discussões bioquímicas proporcionadas.

Índice

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUÇÃO	6
VITAMINA A.....	6
<i>Retinol</i>	7
<i>Ácido Retinóico</i>	8
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	9
METALOPROTEINASES DE MATRIZ	11
CÉLULA DE SERTOLI.....	13
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
PARTE II.....	15
RETINOL AND RETINOIC ACID INCREASE MMP-2 ACTIVITY BY DIFFERENT PATHWAYS IN CULTURED SERTOLI CELLS.....	16
PARTE III.....	27
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

PARTE I

Resumo

Espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido descritas como potenciais causadoras de doenças como aterosclerose, artrite e câncer. Falhas na regulação das metaloproteinases de matriz (MMP), uma família de proteases que degradam matriz extracelular, parecem estar intimamente relacionadas com essas mesmas doenças. Além disso, autores sugerem uma relação entre a atividade das MMPs e ROS. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento com retinol 7 μM foi capaz de induzir mudanças no metabolismo de células de Sertoli cultivadas, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, aumento do dano oxidativo a biomoléculas, ativação de ERK1/2 MAPK, alteração do ciclo celular e transformação pré-neoplásica, ligando o tratamento com retinol ao estresse oxidativo. No presente trabalho, nós utilizamos a técnica de zimografia para verificar a atividade da MMP-2 em células de Sertoli tratadas com retinol e ácido retinóico. Nós encontramos que tanto o tratamento por 24 horas com retinol 7 μM , quanto o tratamento por 24 horas com ácido retinóico 1 nM, aumentaram a atividade da MMP-2 em células de Sertoli cultivadas. O co-tratamento com diferentes antioxidantes reverteu o aumento da atividade da MMP-2 induzido por retinol, mas não por ácido retinóico. Além disso, o tratamento com retinol, mas não com ácido retinóico, foi capaz de aumentar a produção de ROS quantificada pela oxidação de DCFH-DA. Nós encontramos também que tanto o tratamento com retinol quanto com ácido retinóico foram capazes de aumentar a fosforilação de ERK1/2. Entretanto, somente o aumento da atividade da MMP-2 induzido por tratamento com retinol foi inibido por co-tratamento com UO126, um potente inibidor de fosforilação de ERK1/2. Nossos resultados sugerem que o aumento da atividade da MMP-2 induzido por retinol, mas não por ácido retinóico, está relacionado com a fosforilação de ERK1/2 e com a geração de ERO.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) have been hypothesized to play a causative role in numerous diseases such as atherosclerosis, arthritis and cancer. Failures in the regulation of the matrix metalloproteinases (MMP), a family of extracellular matrix-degrading proteases, appear to be intimately involved in these diseases. In addition, authors suggest a relationship between MMP activity and ROS. In early reports our research group has demonstrated that 7 μ M retinol was able to induce changes in Sertoli cell metabolism, such as up-regulation of antioxidant enzyme activities, increase in oxidative damage to biomolecules, activation of ERK1/2 MAPK, cell-cycle alteration and pre-neoplastic transformation, linking retinol treatment and oxidative stress. Here, we verify the MMP activity in cultured Sertoli cells treated with vitamin A using gelatin zymography. We found that both retinol (7 μ M by 24 hours) and retinoic acid (1 nM by 24 hours) treatments induces MMP-2 activity in cultured Sertoli cells. Antioxidants co-treatment reversed retinol-induced but not retinoic acid-induced MMP-2 activity. Moreover, retinol but not retinoic acid treatment increased ROS production quantified by DCFH-DA oxidation. We found that both retinol and retinoic acid treatment induced ERK1/2 phosphorylation. However, only retinol-increased MMP-2 activity was inhibited by UO126, a potent ERK1/2 phosphorylation inhibitor. Our results suggested that the increase on MMP-2 activity induced by retinol, but not by retinoic acid, was related to ERK1/2 phosphorylation and ROS production.

Lista de abreviaturas

ADH: álcool desidrogenase

ALDH: aldeído desidrogenases

AP-1: proteína ativadora-1

AR: ácido retinóico

CAT: catalase

CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo a AMP cíclico

DCFH-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DTT: ditioneitol

ECM: matriz extracelular

EGF: fator de crescimento da epiderme

ERK1/2: cinases extracelulares reguladas por sinal 1 e 2

FGF2: fator de crescimento de fibroblastos 2

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione reduzida

MAPK: proteína cinase ativadora de mitógeno

MMP: metaloproteinases de matriz

MMP-2: metaloproteinase de matriz do tipo 2

NAC: N-acetil-cisteína

$O_2^{\bullet -}$: radical superóxido

ODC: ornitina decarboxilase

OH^{\bullet} : radical hidroxil

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

RAR: receptor de ácido retinóico

RARE: elemento responsivo a ácido retinóico

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: receptor de retinóides x

SOD: superóxido dismutase

Introdução

Vitamina A

O termo vitamina A é usado genericamente para descrever os retinóides que apresentam qualitativamente atividade biológica semelhante ao retinol (*all-trans* retinol), incluindo este. A vitamina A controla a diferenciação de várias células epiteliais além de ser fundamental para diversos processos celulares, como visão, crescimento e reprodução.

As principais fontes dietéticas de retinóides naturais são encontradas na forma de ésteres de retinol, presentes no tecido adiposo e no fígado de animais. Além disso, os carotenóides (principalmente o β -caroteno) presentes em grandes quantidades nos vegetais amarelos e verdes, atuam como provitamina A. Os ésteres de retinol ingeridos são hidrolizados a retinol por uma enzima hidrolase presente na luz do intestino. Tanto o retinol quanto os carotenóides são prontamente absorvidos pela mucosa intestinal. Uma vez absorvidos, os retinóides são incorporados aos quilomicrons para serem transportados para o fígado e, em menor grau, testículos, pulmão, rins, tecido adiposo e músculo esquelético (Roos et al., 1998). A vitamina A é estocada principalmente na forma de ésteres de retinol, particularmente palmitato. O fígado é o principal, porém não necessariamente o único local de estocagem. O retinol representa o mais abundante retinóide presente no sangue e o ácido retinóico representa o retinóide mais hormonalmente ativo (Fig.1) (Napolí, 1999).

Estudos têm descrito uma ação protetora da vitamina A em diversas doenças, relacionando à sua capacidade de neutralizar formas tóxicas de oxigênio e outros radicais livres em sistemas biológicos (Palace et al., 1999). Além disso, é bem descrito a função fisiológica dos retinóides em diversos processos celulares como divisão e

diferenciação. Por outro lado, trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a suplementação com retinol causa dano a biomoléculas (Dal Pizzol et al., 2000; de Oliveira et al., 2005; Moreira et al., 1997), aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Dal Pizzol et al., 2001a; de Oliveira et al., 2007; Palace et al., 1999), transformação pré-neoplásica (Klamt et al., 2003) e ativação de rotas de sinalização (Gelain et al., 2006).

Retinol

O retinol é convertido no fígado e em outros tecidos a ácido retinóico (AR). A rota mais bem estabelecida de metabolização envolve a conversão reversível de retinol a retinal que, por sua vez, é irreversivelmente convertido a ácido retinóico. A conversão oxidativa de retinol a retinal é mediada pela família de enzimas microsossomais álcool desidrogenases (ADH), enzimas que utilizam NAD^+ como cofator, gerando NADH. O passo subsequente, a conversão de retinal a AR, é mediada pela ação das enzimas aldeído desidrogenase (ALDH) e por isoenzimas da família P450 (CYP) (Wang, 2005).

Diversos autores relacionam os efeitos biológicos dos retinóides à sua conversão a ácido retinóico que, por sua vez, agiria através da interação com receptores nucleares, modulando a expressão gênica. Porém, diversos trabalhos têm demonstrado que os retinóides possuem ações biológicas que não envolvem sua interação com receptores nucleares (Clifford et al., 1999). Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que o retinol é capaz de modular rotas de sinalização redox-dependentes (Gelain et al., 2006), bem como a atividade de diversas enzimas (Dal Pizzol et al., 2000; Dal Pizzol et al., 2001a; Klamt et al., 2000), através de modificações no *status* redox celular.

Ácido Retinóico

A relativamente pequena e simples molécula de ácido retinóico pode regular a expressão de múltiplos genes de maneira específica em relação ao locus gênico e ao tempo de atuação, de maneira a produzir uma complexa gama de resultados. Existem três tipos de receptores nucleares de ácido retinóico (RAR α , β e γ). Cada um deles é codificado por genes distintos, possuindo múltiplas isoformas produzidas por processamento (*splicing*) alternativo. RARs funcionam como heterodímeros com um segundo grupo de receptores, os receptores de retinóides X (RXRs α , β e γ), os quais também são codificados por três distintos genes e podem funcionar como homodímeros. Assim como os RARs, os RXRs possuem diversas isoformas, de modo que 48 diferentes combinações entre RARs e RXRs são possíveis. Esses receptores ligam-se a regiões promotoras de genes responsivos a retinóides, através dos elementos responsivos ao receptor de AR (RARE) e dos elementos responsivos ao receptor de retinóides X, modulando a expressão de diversos genes (Napoli, 1999).

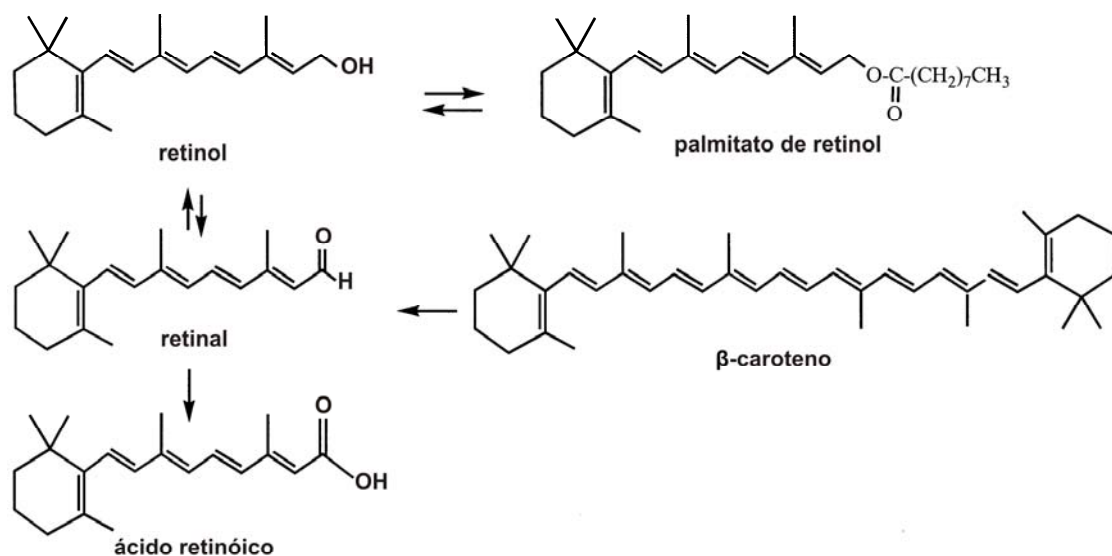


Figura 1. Principais formas de Vitamina A. Modificado de Napoli, 1999.

Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio é necessário para sustentar os processos biológicos de praticamente todos os organismos vivos e, quimicamente, para a maioria dos processos de combustão. Entretanto, enquanto o oxigênio é indispensável para todas as formas de vida aeróbia por servir comoceptor final de elétrons na cadeia mitocondrial, ele também pode ser transformado em formas altamente reativas conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Haddad, 2002).

ROS, como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} , são gerados em diversas rotas celulares (Kamata e Hirata, 1999). Dentre esses, o mais danoso é o radical hidroxil, que rapidamente reage com biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos oxidativos de forma irreversível (Cheng et al., 2002). A cadeia transportadora de elétrons é conhecida como a maior responsável pela geração de ROS *in vivo*. Entretanto, outros sistemas celulares, como hipoxantina/xantina oxidase e NADPH oxidase são conhecidos por gerar ROS. Como proteção contra níveis aumentados de ROS, as células possuem sistemas antioxidantes, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Kamata e Hirata, 1999). Dentre as principais enzimas antioxidantes encontram-se a catalase (CAT), as superóxido dismutases (SOD) e as glutatona peroxidases (GPx). Dentre as defesas não enzimáticas encontram-se uma gama de moléculas de baixo peso molecular, como o peptídeo glutatona (GSH) e vitaminas C e E. Um desbalanço entre as defesas antioxidantes e a produção de ROS podem acarretar diversos danos oxidativos a biomoléculas. De fato, uma produção aumentada de ROS tem sido imputada como causal em numerosas doenças como aterosclerose, artrite e câncer (Jackson e Loeb, 2001).

Apesar de potencialmente tóxicas, espécies reativas de oxigênio podem exercer importantes papéis em processos celulares como rotas de sinalização, desde que mantidas em uma quantidade basal (Finkel, 2003). O termo “regulação oxidativa” tem sido proposto para indicar a funcionalidade das modificações redox de proteínas na regulação de suas atividades biológicas. De fato, reações de oxi-redução em biomoléculas, quando em níveis fisiológicos, podem conter informações biológicas que são necessárias para a manutenção da homeostase celular (Haddad, 2002). Muitas proteínas e enzimas celulares contêm resíduos de cisteína, os quais possuem grupamentos sulfidril em suas cadeias laterais. Tais grupamentos tiois proporcionam uma variedade de interações químicas: formação de pontes com íons metálicos, reações eletrofílicas e reações reversíveis de oxiredução. Devido à capacidade de responder seletivamente ao estado redox celular de forma reversível, imagina-se que os resíduos de cisteína sejam os principais alvos da sinalização redox em sistemas biológicos (Biswas et al., 2006).

Baixas concentrações de ROS podem levar à progressão do ciclo celular, por controlar diversas rotas redox-sensíveis. Têm se demonstrado que H_2O_2 induz a fosforilação de receptores de PDGF e de EGF, sugerindo que ROS podem iniciar eventos de sinalização que mimetizam aqueles induzidos por fatores de crescimento. Vários estudos têm estabelecido que espécies reativas de oxigênio possam causar a ativação de diversas proteínas sinalizadoras como as MAPK, resultando na subsequente ativação de fatores de transcrição. Dessa forma, especula-se que ROS leve a diferentes respostas adaptativas celulares, desde o estacionamento temporário ou permanente do crescimento, a morte por apoptose ou necrose, ou o aumento na proliferação, dependendo do tipo e da intensidade do sinal oxidativo (Boonstra e Post, 2004).

Metaloproteinases de Matriz

Classicamente, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são denominadas como endopeptidases dependentes de cálcio, que contêm zinco, estrutural e funcionalmente relacionadas umas às outras (Bode e Maskos, 2003). A família das MMPs contém mais de 20 membros descritos na espécie humana, as quais são divididas em subfamílias devido à organização dos domínios e às especificidades de substrato (Overall e Lopez-Otin, 2002).

Em geral, MMPs são enzimas extracelulares (excetuando-se as MMPs de membrana, conhecidas como MT-MMPs), secretadas na forma de proenzimas. Todas as MMPs são enzimas com multidomínios, contendo os domínios propeptídico, domínio catalítico e domínio hemopexina (exceto a matrilisina, MMP-7). Um resíduo de cisteína altamente conservado entre todas as MMPs tem sido descrito como essencial para manter a enzima na sua forma inativa. Propõe-se que o grupamento sulfidril desse resíduo de cisteína seja ligado ao íon zinco do domínio catalítico e que a interrupção dessa interação cause a ativação da enzima. A ativação fisiológica das MMPs é provavelmente iniciada por proteases que clivam locais específicos na região propeptídica, processando a forma madura da enzima que perde totalmente o propeptídeo (Morgunova et al., 1999).

A principal função das MMPs é promover a degradação da matriz extracelular (ECM). Entretanto, nos últimos anos seus alvos proteolíticos específicos têm sido expandidos para várias outras proteínas extracelulares, incluindo uma variedade de outras proteases, inibidores de proteases, fatores de coagulação, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento, proteínas ligantes de fatores de crescimento,

receptores de superfície celular e moléculas de adesão (McCawley e Matrisian, 2001). Dessa forma, as MMPs podem influenciar diversas propriedades celulares como crescimento, morte e migração (Coussens et al., 2002).

As MMPs são precisamente reguladas em vários níveis: transcrição, ativação do zimogênio, interação com componentes específico de matriz extracelular e inibição por inibidores endógenos. Além disso, a perda do controle da atividade das MMPs está envolvido em uma grande quantidade de condições patológicas (Sternlicht e Werb, 2001). Diversas rotas de sinalização envolvidas no controle da transcrição das MMPs são redox sensíveis e autores propõe uma relação entre a atividade das MMPs e espécies reativas de oxigênio. Sugere-se que ROS possam atuar na ativação de algumas MMPs tanto em nível transcricional, atuando em rotas de sinalização redox-sensíveis, bem como na ativação do zimogênio, por atuar diretamente na oxidação de um resíduo de cisteína localizado na região de ligação ao zinco na porção pró-peptídica (Nelson e Melendez, 2004).

MMPs são intimamente relacionadas com a progressão tumoral por mediar a degradação da ECM e da membrana basal durante os primeiros estágios da tumorigênese, contribuindo com a formação do microambiente que promove o crescimento do tumor. Além disso, recentes estudos demonstraram que as MMPs contribuem para diversos passos da progressão tumoral além da invasão, incluindo angiogênese, estabelecimento e crescimento de lesões metastáticas em diferentes órgãos (Noe et al., 2001). A subfamília de MMPs que degradam colágeno do tipo IV, as gelatinases (Overall, 2002), representam uma das mais importantes MMPs associadas à progressão tumoral. A MMP-2, também conhecida como gelatinase A, possui um alto nível de expressão em amostras de tumores humanos (Overall e Kleinfeld, 2006) e

autores têm descrito sua atividade em células de Sertoli (El Ramy et al., 2005; Longin et al., 2001; Longin e Magueresse-Battistoni, 2002).

Célula de Sertoli

Células de Sertoli são células somáticas, de origem epitelial, encontradas nos túbulos seminíferos, essenciais para o correto desenvolvimento da espermatogênese. Elas apresentam uma baixa taxa de proliferação durante a vida adulta, proliferando principalmente durante a vida fetal e o período pré-puberal. As Sertoli formam uma barreira seletiva entre a circulação sistêmica e as células germinativas. Dessa forma, as células de Sertoli provêm um suporte estrutural e nutricional às células germinativas.

Evidências têm se acumulado mostrando uma intrínseca relação entre células de Sertoli e células germinativas. Um interessante aspecto dessa relação é que as células germinativas variam durante o desenvolvimento e a vida adulta, e as células de Sertoli sofrem drásticas mudanças estruturais e funcionais para acomodar a maturação das células da linhagem espermatogênica. Essas mudanças são associadas com a formação dos testículos a partir das gônadas fetais indiferenciadas sexualmente, com a transformação dos cordões seminíferos em túbulos. Na vida adulta, as Sertoli passam por modificações estruturais cíclicas as quais correspondem às variações no seu *status* funcional durante os ciclos do epitélio seminífero. MMPs atuam como mediadores críticos das mudanças estruturais as quais passam as células de Sertoli durante o desenvolvimento e a vida adulta. Nos túbulos seminíferos, MMP-2 e MMP-9 são secretadas tanto pelas células de Sertoli quanto pelas peritubulares, sendo que esses dois tipos celulares cooperam para a deposição dos componentes de ECM na membrana basal. Assim, qualquer remodelação ou mudança estrutural que ocorra nos túbulos

seminíferos são, provavelmente, dependente das gelatinases (Longin e Magueresse-Battistoni, 2002).

Objetivos

Objetivo Geral

Levando em conta que o tratamento com retinol sabidamente leva a um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas oxidantes, induzindo uma série de modificações no metabolismo celular, o presente trabalho tem como objetivo principal investigar a ativação da MMP-2, uma importante enzima na regulação funcional das células de Sertoli, induzida por tratamento com retinol e ácido retinóico em células de Sertoli cultivadas.

Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade da MMP-2 em células de Sertoli tratadas com retinol e ácido retinóico;
- Verificar a produção de espécies reativas de oxigênio em células de Sertoli cultivadas tratadas com retinol e ácido retinóico;
- Verificar um possível papel de espécies reativas de oxigênio no processo de ativação da MMP-2 induzida por tratamento com retinol e ácido retinóico;
- Identificar possíveis rotas de ativação;
- Avaliar o perfil morfológico de culturas de células de Sertoli tratadas com retinol e ácido retinóico.

PARTE II

**Retinol and retinoic acid increase MMP-2 activity by
different pathways in cultured Sertoli cells**

Free Radical Research, December 2007; 41(12): 1338-1347.

Retinol and retinoic acid increase MMP-2 activity by different pathways in cultured Sertoli cells

RODRIGO J. S. DALMOLIN¹, ALFEU ZANOTTO-FILHO¹, RAMATIS B. DE OLIVEIRA¹, ROXANE F. DUARTE¹, MATHEUS A. B. PASQUALI¹, & JOSÉ C. F. MOREIRA¹

¹*Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil*

Accepted by Prof. Henrik Poulsen

Abstract

Diseases such as atherosclerosis, arthritis and cancer have been related with imbalance in ROS production and failures in regulation of the MMPs. Authors suggested a relationship between MMP activity and ROS. Our research group has demonstrated that retinol 7 μ M induced changes in Sertoli cell metabolism linking retinol treatment and oxidative stress. We verified MMP activity in Sertoli cells treated with vitamin A using gelatin zymography. We found that retinol (7 μ M) and retinoic acid (1 nM) induced MMP-2 activity in Sertoli cells. Antioxidants reversed retinol-induced but not retinoic acid-induced MMP-2 activity. Moreover, retinol but not retinoic acid increased ROS production quantified by DCFH-DA oxidation. We found that retinol and retinoic acid induced ERK1/2 phosphorylation, but only retinol-increased MMP-2 activity was inhibited by UO126, an ERK1/2 phosphorylation inhibitor. Our findings suggested that retinol-induced MMP-2 activity, but not retinoic acid-induced MMP-2 activity, was related to ERK1/2 phosphorylation and ROS production.

Keywords: MMP, retinol, retinoic acid, ROS, Sertoli cells

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are constantly generated in aerobic metabolism and play an important role in cellular processes, such as signaling pathways, when in a basal rate [1]. The term “oxidative regulation” has been proposed to indicate the functionality of redox modifications of proteins in regulation of their biological activities. Oxide-reductive reactions of biomolecules were known as “oxidative stress”. Now were considered as “signals” and might contain biological information that is necessary to maintain cellular homeostasis [2]. However, an imbalance between anti-oxidant defenses and ROS production can lead to oxidative damages in biomolecules playing a causative role in numerous diseases such as atherosclerosis, arthritis, and cancer [3]. The modulation of an important family of proteases,

matrix metalloproteinases (MMP), seems to be intimately related to these diseases [4].

MMPs are traditionally denominated as calcium-dependent zinc-containing endopeptidases, structurally and functionally related [5]. The main function of the MMPs is to promote the extracellular matrix (ECM) degradation. In the past years, their specific proteolytic targets have expanded to several other extracellular proteins, including an assortment of other proteinases, proteinase inhibitors, clotting factors, chemotactic molecules, latent growth factors, growth factor binding proteins, cell surface receptors, and adhesion molecules [6]. Thus, MMP can influence directly or indirectly several cellular properties such as growth, death and migration [7].

MMPs activity is precisely regulated at different levels: transcription, activation of the precursor

Correspondence: Rodrigo J. S. Dalmolin. Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, lab 32, Departamento de Bioquímica, ICBS-UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2600, anexo. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 33085578. Fax: +55 51 33085540. Email: rodrigo.dalmolin@ufrgs.br

zymogens, interaction with specific ECM components, and inhibition by endogenous inhibitors. The loss of control of the MMP activity is involved in a large range of diseases [8]. Numerous signaling pathways involved in the control of MMP transcription are redox-responsive and authors have proposed a relationship between MMP activity and ROS [9]. An important member of MMP family is MMP-2, also known as gelatinase-A [10]. MMP-2 is expressed at high levels in several human tumour samples [11] and authors have described their activity in Sertoli cells [12–14].

Sertoli cells are epithelial cells that provide structural and nutritional support to developing germinal cells and participate in the architecture of seminiferous tubules, establishing interactions with peritubular cells and ECM in a MMP-dependent process [13,14]. Our group has used Sertoli cells as a model to study oxidative stress and redox signaling induced by vitamin A. Researchers have described a protective role of vitamin A in several diseases, which was related to its ability to scavenge toxic forms of oxygen and other free radicals in living systems [15]. In addition, the physiological function of retinoids in several cellular processes, such as division and differentiation, is well-known. On the other hand, our previous results have demonstrated that retinol supplementation induces oxidative damage in biomolecules, [16–18] upregulation of antioxidant enzymes, [19,20] preneoplastic transformation, [21] and activation of phosphorylation signaling pathways [22]. In this work, we investigated the MMP-2 activation by treatment with retinol and retinoic acid in cultured Sertoli cells. We evidenced that both retinol and retinoic acid increased MMP-2 activity. We also investigated the role of ROS in this activation. As described before, retinol treatment is able to cause ERK1/2 MAPK phosphorylation by radical overproduction [22]. We confirmed these results and verified a retinoic acid-dependent ERK1/2 MAPK phosphorylation, as well as the relationship between ERK1/2 MAPK phosphorylation and MMP-2 upregulation. Eventually, we analyzed the morphological aspect of Sertoli cell cultures for five days after the onset of retinol or retinoic acid treatment.

Materials and methods

Animals and chemicals

Type I collagenase, hyaluronidase, medium 199, HBSS, all-*trans* retinol and all-*trans* retinoic acid were purchased from Sigma, St. Louis, MO, US. Trypsin was purchased from Difco, Detroit, MI, US. Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) was obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, US). Horseradish peroxidase-coupled anti-IgG antibody was from Amersham Pharmacia Biotech

(Piscataway, NJ, US). The West Pico chemiluminescent kit was obtained from Pierce (Rockford, IL, US). Pregnant Wistar rats were housed individually in Plexiglas cages. The animals were maintained in a 12h light/dark cycle at a constant temperature of 23°C, with free access to commercial food and water.

Sertoli cell culture and treatment

Sertoli cells from 15-days-old Wistar rats were isolated and cultured as described before [17,20]. In short, animals were killed by ether asphyxiation, testes were removed, decapsulated, washed in saline pH 7.4, digested enzymatically with trypsin (30min at 34°C), and centrifuged (750 × g for 5min). After, the trypsin was inhibited, the sample was centrifuged (750 × g for 5 min), the supernatant was discarded, the pellet incubated with collagenase and hyaluronidase (30min at 34°C), and once more centrifuged (10 min at 40 × g). Isolated cells were counted by Tripitan blue exclusion probe in Neubauer chamber and maintained at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, growing in a plating density of 3.2 × 10⁵ cells/cm² in medium 199 (pH 7.4) supplemented with 1% fetal bovine serum (v/v) in the first 24h. After that, the medium was replaced by serum free medium and cells were maintained for more 24h. Experiments were performed on cells treated with retinol (7μM), retinoic acid (1nM), and retinol vehicle (ethanol 0.1% v/v), or co-treated with Trolox® (a hydrophilic analogue of vitamin E, 100μM), the ·OH radical scavenger mannitol (1mM), the thiol antioxidants dithiothreitol (DTT; 1mM) and N-acetyl-cysteine (NAC, 1mM), and UO126 (inhibitor of ERK1/2 phosphorylation) for 24h, except in the ERK1/2 phosphorylation and DCFH-DA experiments. All treatments were performed in a light-protected environment.

Gelatin zymography

Zymography was performed as previously described [12]. In brief, culture media were removed, centrifuged (1000 × g for 5min) to eliminate cell debris, and concentrated ten times using Centricon (cut-off at 30kDa; Millipore, Bedford, MA, US). Equal amounts of cell proteins (approximately 40 μg/lane) were electrophoresed (120V) at 4°C on 8% polyacrylamide gels containing 0,2% gelatin (Sigma Chemical Co.) in the absence of reducing agent. Following electrophoresis, gel was washed in Triton X-100 2.5% pH 7.5 (three times of 30min at room temperature) to remove SDS and washed again in distilled water (three times of 30min at room temperature). The gel was subsequently incubated at 37°C for 16h in reaction buffer (50mM Tris-base, NaCl 150mM, ZnCl₂ 1μM, sodium azide 0.02%, CaCl 10mM, pH 8). In these conditions, gelatinases present in the samples is renatured and autoactivated.

White zones of lysis indicating gelatin-degrading activity were revealed by staining with Coomassie Brilliant blue R-250 0.1%. Densitometric analyses of the gels were performed with the ImageJ[®] software. Data were normalized by mean of control and expressed in arbitrary units.

Determination of intracellular ROS production

Intracellular ROS production was detected using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). This reagent is known to enter the cells and react predominantly with highly oxidizing species of ROS, producing the fluorophore dichlorofluorescein (DCF) [23]. Briefly, cells were seeded in 96-well plates and cultured for 48h. 100 μ M DCFH-DA dissolved in medium containing 1% FBS was added to the cell culture 30min before retinol or retinoic acid incubation to allow cellular incorporation. Then, the medium was discarded and cells treated for 40min. The DCFH-DA oxidation was monitored with 10min interval at 37°C from the fluorescence emission intensity in a 96-well plate fluorescence reader (model F2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) with an emission wavelength set at 535nm and an excitation wavelength set at 485nm. Data were expressed in arbitrary fluorescence units.

Western blotting

SDS-PAGE and Western blotting were carried out as before reported [22]. Sertoli cells were previously cultured by 48h and retinol or retinoic acid treatments were added in culture media. After different times of treatment (15, 30, 60 and 120 minutes for retinoic acid and 1, 5, 10, 15 and 30 minutes for retinol), culture media was removed and cells were lysed in Laemmli-sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol) and equal amounts of cell proteins (approximately 35 μ g/lane) were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Protein loading and electroblotting efficiency were verified by Ponceau S staining, and the membrane was then blocked in Tween-Tris buffered saline (TTBS; 100mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20) containing 5% albumin and incubated overnight with the primary antibody to be tested. The membrane was washed in TTBS and incubated with horseradish peroxidase-coupled anti-IgG antibody, washed again and the immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence.

Morphological aspect of Sertoli cell cultures

Sertoli cells were cultured as described. After 24h, the treatments were removed and cultures received media 199 pH 7.4 supplemented with 10% fetal bovine

serum. Supplemented medium was replaced every two days. Before medium replacement, the cultures were observed and photographed under a phase-contrast microscopy.

Protein quantification

All the results were normalized by protein content, measured as described by Lowry [24].

Statistic analysis

Data are expressed as means \pm S.E.M. Differences were considered to be significant at the $p < 0.05$ and were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test.

Results

Retinoic acid and retinol increase MMP-2 activity

Sertoli cells were treated with retinoic acid or retinol in different concentrations and gelatin zymography assay was carried out as described in *Materials and Methods*. MMP-2 migrates as a triplet around 72, 66 and 62 kDa (Figure 1.B) [12]. However, bands can appear fused and/or incompletely identifiable (Figure 1.A) as a result of gelatinolytic activity of the enzyme. We observed an increased enzyme activity in retinoic acid 1nM treatment as well as retinol 7 μ M treatment (Figure 1). This increase is not detected in higher concentrations indicating a no dose-dependent relationship leading us to choose these concentrations for further experiments.

Antioxidant treatment reverses MMP-2 activation induced by retinol but not by retinoic acid

Sertoli cells received Trolox[®] 100 μ M, mannitol 1mM, DTT 1mM or NAC 1mM in co-treatment with retinoic acid 1nM or retinol 7 μ M (Figure 2). The elevation on MMP-2 activity induced by retinoic acid was reversed only by DTT (Figure 2.A). DTT was also capable to reverse MMP-2 activation induced by retinol treatment. In addition, both

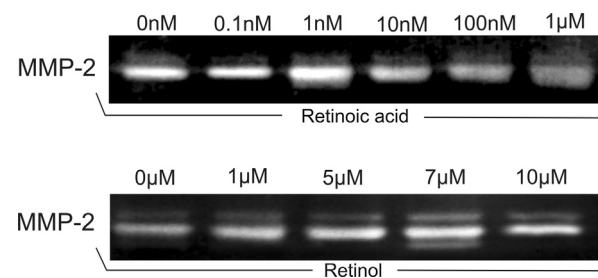


Figure 1. Retinoic acid and retinol induced MMP-2 activity. Concentrated media of cultured Sertoli cells treated for 24 hours with retinoic acid or retinol were analyzed by gelatin zymography. White lytic bands correspond to MMP-2 activity. Experiments were repeated three times and representative experiments are shown.

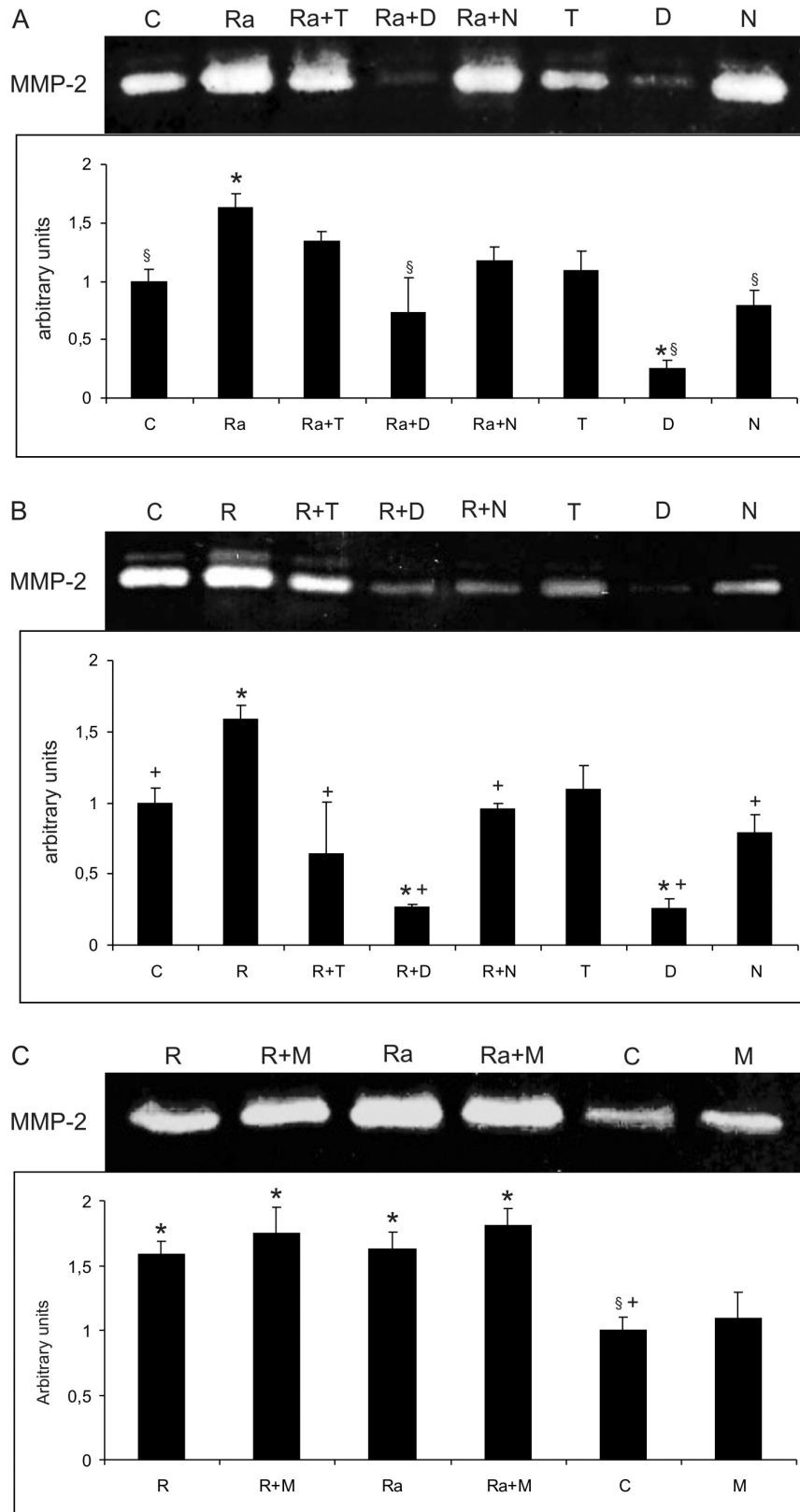


Figure 2. MMP-2 activity in cultured Sertoli cells treated with retinoic acid or retinol and co-treated with antioxidants. Gelatin zymography of concentrated culture media of Sertoli cells treated for 24 hours with: retinoic acid 1nM and co-treated with dithiothreitol 1mM, N-acetyl-cysteine 1mM, or Trolox® 100µM (A); retinol 7µM and co-treated with dithiothreitol 1mM, N-acetyl-cysteine 1mM, or Trolox® 100µM (B); retinol 7µM or retinoic acid 1nM and co-treated with mannitol 1mM (C). Experiments were repeated four times and representative experiments are shown. (*) different of control, (§) different of retinoic acid and (+) different of retinol. p < 0.05. C = control, Ra = retinoic acid 1nM, R = retinol 7µM, T = Trolox® 100µM, D = dithiothreitol 1mM, N = N-acetyl-cysteine 1mM and M = mannitol 1mM.

Trolox[®] and NAC were able to attenuate retinol-induced MMP-2 activation (Figure 2.B). Mannitol was incapable of reversing the MMP-2 activation induced by both retinoids (Figure 2.C) suggesting that ·OH radical does not seem to be involved in this MMP-2 activation.

Retinol but not retinoic acid treatment induces ROS production

Figure 3 shows that retinol 7µM enhanced intracellular ROS production during 40min period evaluated and Trolox[®] 100µM co-treatment blocked this effect. In contrast, retinoic acid 1nM did not increase ROS production. In DCF assay, we used hydrogen peroxide 100µM as positive control for ROS production (not shown).

Retinoic acid and retinol increase ERK1/2 phosphorylation

We perform a Western blotting with a specific antibody able to detect ERK1/2 only when dually phosphorylated (i.e. when activated; pERK1/2 [25]). Both retinoic acid and retinol induced an increase in ERK1/2 phosphorylation (Figure 4.A). A peak was identify around 15 minutes of treatment and decreasing at 30 minutes in both treatments, suggesting a rapid and transient activation of these members of MAPK family.

ERK1/2 inhibitor reverses MMP-2 activity induced by retinol but not by retinoic acid

Figure 4.B shows that the co-treatment with UO126, a classical inhibitor of ERK1/2 which impedes MEK1/2 to act in ERK1/2 phosphorylation, [26,27] reversed MMP-2 activity induced by retinol. UO126

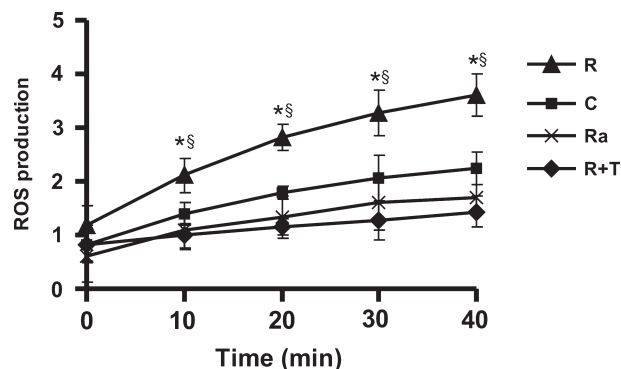


Figure 3. Intracellular ROS production determined by DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) oxidation in cultured Sertoli cells treated with retinoic acid 1nM and retinol 7µM for different times. The DCFH-DA oxidation was monitored with 10min interval at 37°C from the fluorescence emission intensity. Data were expressed in arbitrary fluorescence units. (*) different of control and (§) different of retinoic acid. $p < 0.05$. R = retinol 7µM, C = control, Ra = retinoic acid 1nM and T = Trolox[®] 100µM.

did not reverse MMP-2 activity induced by retinoic acid (Figure 4B).

Modifications on morphological aspect of Sertoli cell cultures treated with vitamin A

Figure 5 demonstrated that cell cultures treated with retinol or retinoic acid for 24 hours presented lower density compared to control cells. After three days, cells established a monolayer and there was a similarity in the morphological aspect among the three groups (retinoic acid, retinol and control). High cell density was observed after five days and, at this time, we could observe cell agglomeration over the monolayer.

Discussion

The activity of MMPs is regulated at several levels and the loss of control of their activity leads to a breakdown in tissue homeostasis. Unregulated control of MMP activities changes tissue functionality and seems to be deleterious in biological systems [4]. Nelson and Melendez (2004) proposed an oxidative activation of pro-MMP-1 [9]. MMPs are secreted as inactive zymogens and its catalytic domain contains a highly conserved zinc-binding site bound by a cysteine residue within the propeptide region. This folded conformation is required to keep the MMP in its inactive proform. Oxidants may react and oxidatively modify the thiol residue releasing the zinc-binding domain and turning an unstable MMP-1 intermediate susceptible to cleavage by autocatalytic processing, therefore activating MMP-1. Proteolytic cleavage of MMPs is an important mechanism of zymogen activation. Given the conserved cysteine-switch domain and the general activation mechanism of most MMP family members, the activation by oxidation may regulate several MMPs [9,28].

We and others have demonstrated that retinol 7µM might induce oxidative stress in different cell systems [21,29]. Figure 3 confirms that retinol 7µM treatment generated ROS in Sertoli cells and Trolox[®] co-treatment decreased ROS production. Figure 2.B shows that both Trolox[®] and NAC were able to reverse retinol-induced MMP-2 activity at control levels and DTT decreased enzyme activity to lower levels than baseline. Altogether, these results suggested that ROS were involved in MMP-2 activity induced by retinol. In contrast, Figure 2.C shows that mannitol co-treatment was unable to reverse retinol-induced MMP-2 activity. This result contrasted to previous reports that showed mannitol preventing some of retinol biological effects [22,30].

Under normal metabolic conditions, 1–2% of the oxygen consumed by the cell is converted to $^{\cdot-}O_2$ by electron leakage at mitochondrial complex I and complex III [31] and other sites of ROS production

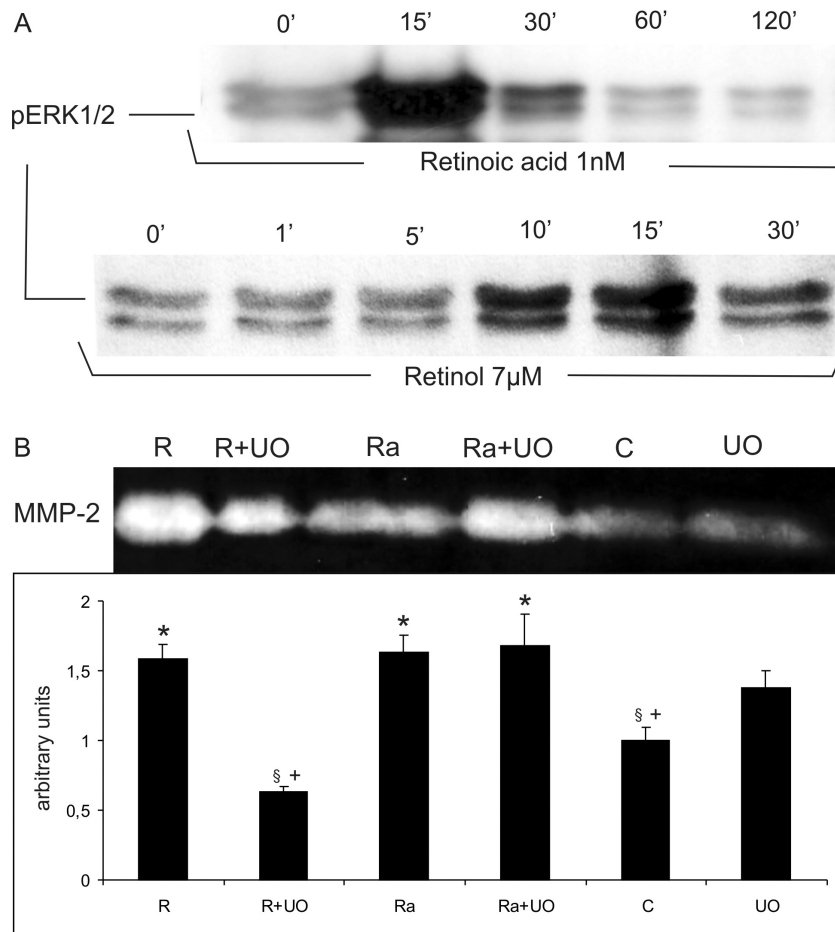


Figure 4. (A) ERK1/2 phosphorylation determined by Western blotting in cultured Sertoli cells treated with retinoic acid 1nM and retinol 7µM for different times. Sertoli cell treated with retinol or retinoic acid for different times (15, 30, 60 and 120 minutes for retinoic acid and 1, 5, 10, 15 and 30 minutes for retinol), culture media was removed, cells were lysed and immunoblot was performed. (B) Gelatin zymography of concentrated culture media of Sertoli cells treated for 24 hours with retinoic acid 1nM or retinoic acid 7µM and co-treated with UO126. Experiments were repeated three times and representative experiments are shown. (*) different of control, (§) different of retinoic acid and (+) different of retinol. $p < 0.05$. R = retinol 7µM, Ra = retinoic acid 1nM, C = control and UO = UO126.

such as hypoxanthine/xanthine oxidase and NADPH oxidase are known. Majority of ROS generated in these cellular systems are only moderately reactive (e.g. $^-\text{O}_2$ and H_2O_2) with other biological molecules [32]. At normal levels, reactive species can execute an important function in the regulation of the signaling pathways [1] acting in proteins, lipids, and nucleic acids by modifications in ROS-sensitive domains [33]. The most important redox-sensitive domain in proteins are cysteine residues, which can be modulated by alterations in their redox state, acting as redox sensor [34]. In recent years it has become clear that ROS regulate several genes, modulating process such as cell proliferation and differentiation as well as cell death and life machinery, acting as second messengers in signaling cascades [32].

One of the most important ROS that act in redox signaling is H_2O_2 , that can be spontaneously or enzymatically generated from $^-\text{O}_2$ and is highly diffusible into cells [35]. However, $^-\text{O}_2$ and H_2O_2 can be converted into $\cdot\text{OH}$ by Fenton or Haber-Weiss reactions [36]. $\cdot\text{OH}$ seems inappropriate to act as a

second messenger in signaling pathways as it is a high-reactive short-life radical that quickly induce irreversible damages to biomolecules [36]. The fact of the well-established hydroxyl radical scavenger mannitol [37] has not reversed MMP-2 activity induced by retinol suggest that other reactive species than $\cdot\text{OH}$ mediated MMP-2 upregulation. Retinol treatment seems to generate $^-\text{O}_2$ and H_2O_2 as previous works showed increased activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase [19]. In addition, previous works have shown that an iron chelator (1,10-phenantroline) reversed oxidative damage induced by retinol [16], suggesting that Fenton reaction was involved in retinol-induced oxidative damage. However, retinol-induced MMP-2 activity seems to be independent of hydroxyl radical, in spite of it probably has been generated.

The extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are members of the superfamily of mitogen-activated protein kinases (MAPK). These kinases are important regulatory proteins through which extra-

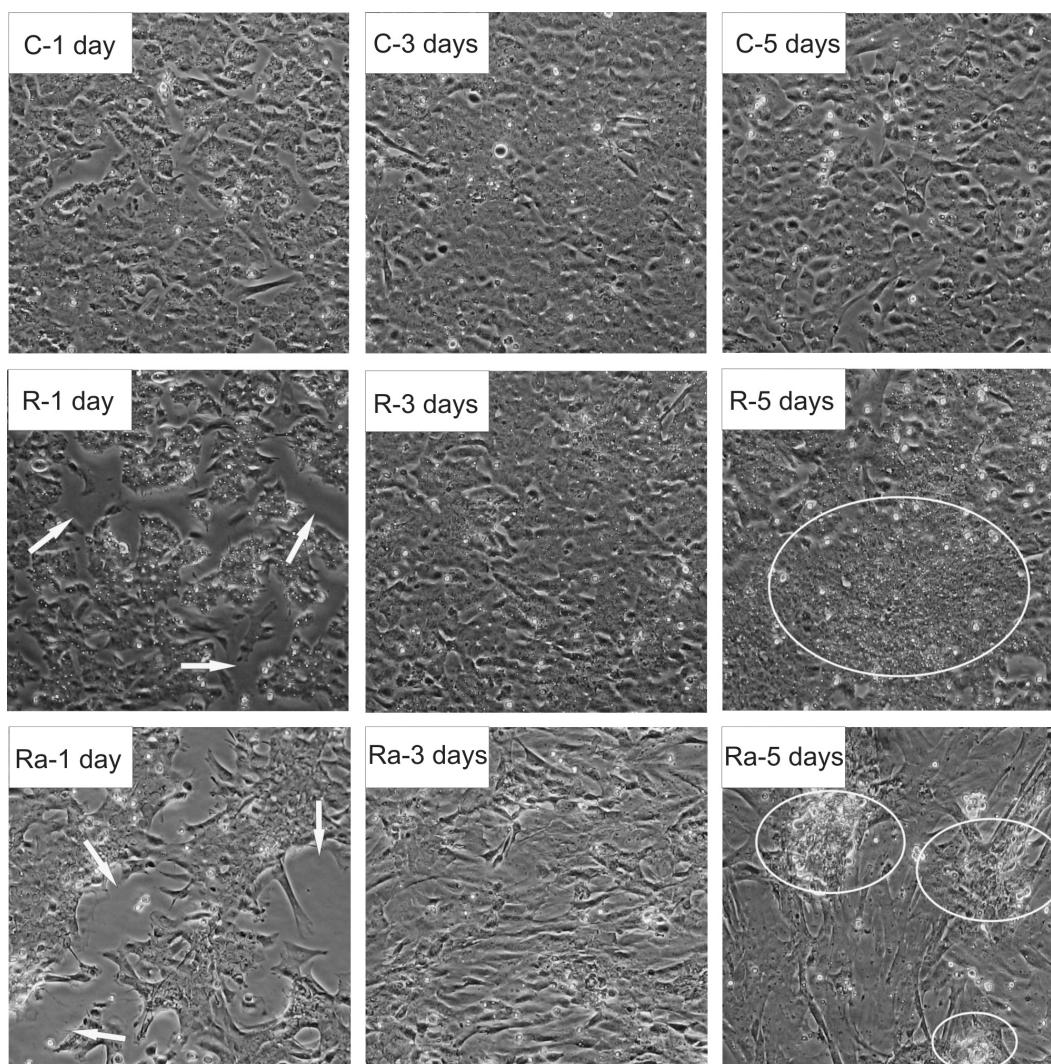


Figure 5. Morphological aspect of Sertoli cell cultures treated with retinol $7\mu\text{M}$ or retinoic acid 1nM . Sertoli cells were cultured and treated as described in *Material and Methods*. After 24 hours of treatment culture medium was replaced for 199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and fresh supplemented medium was added every two days. Before each medium replacement, the cultures were photographed under a phase-contrast microscope. Arrows indicate areas of low density. Ellipses indicate areas of over monolayer density. The experiments were repeated three times with nearly identical results. Representative photographs are shown. C-1 day = control after one day of culture, C-3 days = control after three days of culture, C-5 days = control after five days of culture, R-1 day = retinol $7\mu\text{M}$ after one day of culture, R-3 days = retinol $7\mu\text{M}$ after three days of culture, R-5 days = retinol $7\mu\text{M}$ after five days of culture, Ra-1 day = retinoic acid 1nM after one day of culture, Ra-3 days = retinoic acid 1nM after three days of culture and Ra-5 days = retinoic acid 1nM after five days of culture.

cellular signals are translated into intracellular events [38,39] and are related to MMP expression [40]. Gelain (2006) demonstrated that retinol treatment induced CREB phosphorylation mediated by ROS-dependent ERK1/2 activation [22]. CREB, once activated by phosphorylation at Ser-133, modulates cell cycle/apoptosis regulation genes, and also other transcription factors, such as different members of the AP-1 family, among others. One of the genes that CREB has been associated is MMP-2 [41]. In the Figure 4.A we show that retinol led to ERK1/2 activation. Generally, ERKs are mainly involved in anabolic processes, such as cell division and growth and can be activated by ROS such as oxygen peroxide [42,43]. Figure 4.B shows that UO126 co-treatment

reverse totally retinol-induced MMP-2 activity, indicating that ERK1/2 pathway was involved in this increased enzyme activity.

Altogether, these results suggest that retinol $7\mu\text{M}$ treatment increased ROS production, which activates ERK1/2 signaling pathway, increasing MMP-2 activity. It is rational to think that higher retinol concentrations would increase ROS production. However, elevated ROS generation can damage cellular systems to react with biomolecules in unspecific sites instead of acting in signaling pathways. This may explain why higher concentrations of retinol did not induce an increase in MMP-2 activity (Figure 1.B).

Despite retinol and its derivatives, the retinoids, are recognized as key regulators of cell growth and

differentiation, their exact mechanisms of action remain unknown [44]. Retinol represents the most abundant retinoid in blood and can be converted to retinal and subsequently to retinoic acid by dehydrogenases. Retinoic acid is the most hormonally active retinoid and is not re-converted to retinol in biological systems [45]. Figure 1 shows that retinoic acid 1nM increased MMP-2 activity. Only DTT co-treatment reversed retinoic acid-induced MMP-2 activity, as indicated in Figure 2.A. Treatment with potent thiol reducer DTT was able to decrease MMP-2 activity lower than control group changing enzyme baseline, as discussed above. NAC, Trolox[®] and mannitol (Figure 2.A and C) were unable to reverse retinoic acid-dependent MMP-2 activity suggesting that ROS were not involved in this activation. Indeed, DCF assay shows that retinoic acid did not produce ROS in Sertoli cells (Figure 3). These results contrasted to findings with retinol treatment suggesting that these two retinoids acted through different pathways in MMP-2 induction. In addition, a curious data was notorious: in spite of retinoic acid induced ERK1/2 phosphorylation – similarly to retinol-induced ERK1/2 phosphorylation – the UO126 co-treatment was unable to reverse MMP-2 activity induced by retinoic acid treatment (Figure 4). In fact, authors have related that retinoic acid induced ERK1/2 phosphorylation [46,47] and Cañón (2004) demonstrated that retinoic acid played rapid effects on CREB phosphorylation by ERK activation in neuronal cells [48]. On the other hand, the fact of the co-treatment with UO126 did not alter retinoic acid-induced MMP-2 activity suggest that ERK1/2 pathway seems not to be the major pathway involved in this activation. The most important targets of retinoic acid are the retinoic acid receptors (RARs and RXR) which are nuclear receptors that regulate several genes in response to retinoic acid [45]. Watson (2004) demonstrated that an increased amount of RAR- α was involved in MMP-1 over-expression in cutaneous ageing [49]. In this way, MMP-2 activity induced by retinoic acid in Sertoli cells may be related to direct activation of RARs. However, more studies are necessary to elucidate this fact, as well as to investigate the reason by which higher concentrations of retinoic acid did not increase MMP-2 activity (Figure 1.A).

Altogether, these data support that retinol and retinoic acid induced MMP-2 by different pathways in cultured Sertoli cells. Morphogenesis of seminiferous tubules depends upon interactions among Sertoli cells, peritubular cells and ECM (which is secreted by both cells types). In the adult life, Sertoli cells undergo cyclic structural modifications corresponding to a variation of their functional state during the cycle of the seminiferous epithelium according to maturation level of the germinal cells, leading to alterations on ECM mainly mediated by MMPs

regulation [12–14,50]. Thus, alterations in MMP-2 activity can impair seminiferous homeostasis. Longin (2002) suggested that MMP-2 was involved in FSH-induced changes in Sertoli cells [14] and El Ramy (2005) identify increased MMP-2 in Sertoli cells activity treated with FGF2, showing this treatment mediating interactions between peritubular and Sertoli cells [12]. Figure 5 shown that both retinoic acid and retinol changed morphological aspect of Sertoli cell cultures. Decreased density observed in both treated groups after 24h of treatment agrees with a recent work that demonstrated that retinol induced ROS-dependent apoptosis in Sertoli cells [51]. In addition, our previous papers showed that retinol treatment induced cellular proliferation, [52] cell cycle progression [21] as well as ERK1/2-dependent focus formation in Sertoli cells, [22] all in a ROS-dependent manner. These can explain the over-monolayer growth observed after five days in cells treated with retinol. However, retinoic acid did not generate ROS and also was able to induce morphologic changes in Sertoli cell cultures. Thus, in some extent, MMP-2 activity can be involved in morphologic alterations induced by retinoic acid and retinol.

References

- [1] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology* 2003;15:247–254.
- [2] Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling* 2002;14:879–897.
- [3] Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;477:7–21.
- [4] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases-Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 2003;92:827–839.
- [5] Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biological Chemistry* 2003;384:863–872.
- [6] McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 2001;13:534–540.
- [7] Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Cancer therapy-Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 2001;295:2387–2392.
- [8] Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001;17:463–516.
- [9] Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radical Biology and Medicine* 2004;37:768–784.
- [10] Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity-Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Molecular Biotechnology* 2002;22:51–86.
- [11] Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment-Opinion-Validating matrix metalloproteinases as drug targets and

- anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:227–239.
- [12] El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S, Magueresse-Battistoni B. Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *Journal of Endocrinology* 2005;187:135–147.
- [13] Longin J, Guillaumot P, Chauvin VA, Morera AM, Magueresse-Battistoni B. MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *Journal of Cell Science* 2001;114:2125–2134.
- [14] Longin J, Magueresse-Battistoni B. Evidence that MMP-2 and TIMP-2 are at play in the FSH-induced changes in Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002;189:25–35.
- [15] Palace VP, Khaper N, Qin QI, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26:746–761.
- [16] Dal Pizzol F, Klamt F, Frota MLC, Moraes LF, Moreira JCF, Benfato MS. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Radical Research* 2000;33:677–687.
- [17] de Oliveira RB, Klamt F, Castro MAA, Polydoro M, Zanotto-Filho A, Gelain DP, Dal Pizzol F, Moreira JCF. Morphological and oxidative alterations on Sertoli cells cytoskeleton due to retinol-induced reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005;271:189–196.
- [18] Moreira JCF, Dal Pizzol F, Von Endt D, Bernard EA. Effect of retinol on chromatin structure in Sertoli cells: 1,10-phenanthroline inhibit the increased DNase I sensitivity induced by retinol. *Medical Science Research* 1997;25:635–638.
- [19] Dal Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, Bernard EA, Moreira JCF. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Free Radical Research* 2001;34:395–404.
- [20] de Oliveira RB, Pasquali MAB, Zanotto-Filho A, Dalmolin RJS, Gelain DP, Gottfried C, Rodrigues JL, Klamt F, Moreira JCF. Can electrons travel through actin microfilaments and generate oxidative stress in retinol treated Sertoli cell? *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007;301:33–45.
- [21] Klamt F, Dal Pizzol F, Roehrs R, de Oliveira RB, Dalmolin RJS, Henriques JAP, de Andrades HHR, Ramos ALLD, Saffi J, Moreira JCF. Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation induced by Vitamin A supplementation. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2003;539:117–125.
- [22] Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, de Oliveira RB, Dal Pizzol F, Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Moreira JCF. Retinol induces the ERK 1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. *Cellular Signalling* 2006;18:1685–1694.
- [23] Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein As An Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology* 1992;5:227–231.
- [24] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265–275.
- [25] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004;68:320–344.
- [26] Newton R, Cambridge L, Hart LA, Stevens DA, Lindsay MA, Barnes PJ. The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1 β -dependent PGE 2 release via mechanistically distinct processes. *British Journal of Pharmacology* 2000;130:1353–1361.
- [27] Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeseer WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:18623–18632.
- [28] Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: Activation mechanism revealed. *Science* 1999;284:1667–1670.
- [29] Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA Damage by Vitamin A and Its Derivative via Superoxide Generation. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:2003–2008.
- [30] Klamt F, Dal Pizzol F, Ribeiro NC, Barnard EA, Benfato MS, Moreira JCF. Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000;208:71–76.
- [31] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239–247.
- [32] Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling* 1999;11:1–14.
- [33] Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou YZ, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100:1813–1821.
- [34] Biswas S, Chida AS, Rahman I. Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling. *Biochemical Pharmacology* 2006;71:551–564.
- [35] Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current Opinion in Cell Biology* 2005;17:183–189.
- [36] Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *Journal of Chromatography B* 2002;781:481–496.
- [37] Goldstein S, Czapski G. Mannitol as an OH Scavenger in Aqueous Solutions and in Biological Systems. *International Journal of Radiation Biology* 1984;46:725–729.
- [38] Davis RJ. Mapks-New Jnk Expands the Group. *Trends in Biochemical Sciences* 1994;19:470–473.
- [39] Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 1997;9:180–186.
- [40] Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han JH, Kahari VM. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21:2373–2383.
- [41] Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:657–672.
- [42] Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochemical Journal* 1998;333:581–589.
- [43] Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappa B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cellular Signalling* 2006;18:2238–2251.
- [44] Klamt F, de Oliveira MR, Moreira JCF. Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 2005;1726:14–20.
- [45] Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica*

- Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids 1999;1440:139–162.
- [46] Bost L, Caron L, Marchetti I, Dani C, Marchand-Brustel Y, Binetruy B. Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochemical Journal* 2002;361:621–627.
- [47] Yen A, Roberson MS, Varvayanis S, Lee AT. Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP) extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Research* 1998;58:3163–3172.
- [48] Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A. Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell* 2004;15:5583–5592.
- [49] Watson REB, Ratnayaka JA, Brooke RCC, Yee-Sit-Yu S, Ancian P, Griffiths CEM. Retinoic acid receptor alpha expression and cutaneous ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 2004;125:465–473.
- [50] Ulisse S, Rucci N, Piersanti D, Carosa E, Graziano FM, Pavan A, Ceddia P, Arizzi M, Muzi P, Cironi L, Gnessi L, D'Armiento M, Jannini EA. Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in rat prepubertal Sertoli cells. *Endocrinology* 1998;139:741–747.
- [51] Klamt F, Dal-Pizzol F, Gelain DP, Dalmolin RJS, de Oliveira RB, Bastiani M, Horn F, Moreira JCF. Vitamin A treatment induces apoptosis through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Cell Biology International* 2007; In press.
- [52] Dal Pizzol F, Klamt F, Dalmolin RJS, Bernard EA, Moreira JCF. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated sertoli cells. *Free Radical Research* 2001;35:749–755.

PARTE III

Discussão

A atividade das MMPs é regulada em diversos níveis e a perda do controle de suas atividades leva a uma quebra na homeostase tecidual. Problemas na regulação da atividade das MMPs pode mudar a funcionalidade tecidual e parece ser deletério em sistemas biológicos (Visse e Nagase, 2003). Nelson e Melendez (2004) propuseram um processo oxidativo de ativação da pro-MMP1 (Nelson e Melendez, 2004). MMPs são secretadas como um zimogênio inativo e o seu domínio catalítico contém uma região altamente conservada contendo um íon zinco, ligado à região propeptídica da enzima por um resíduo de cisteína. Essa conformação é necessária para manter a enzima em sua forma inativa. Espécies reativas podem modificar oxidativamente o resíduo tiol ligado ao íon zinco, tornando um intermediário instável de MMP-1 susceptível à clivagem por um processo autocatalítico e, por fim, ativando a enzima. A clivagem proteolítica constitui um importante mecanismo de ativação do zimogênio. Levando em conta que o resíduo de cisteína da região propeptídica ligado ao íon zinco é altamente conservado, e que o processo geral de ativação dos diferentes membros da família das MMPs é semelhante, a ativação por oxidação pode regular diversas MMPs (Morgunova et al., 1999; Nelson e Melendez, 2004).

Nosso grupo de pesquisa, bem como outros autores, tem demonstrado que o tratamento com retinol 7 μ M pode induzir estresse oxidativo em diferentes sistemas celulares (Klamt et al., 2003; Murata e Kawanishi, 2000). Nossos resultados do ensaio de oxidação de DCFH-DA mostraram que 7 μ M de retinol gera espécies reativas de oxigênio a partir de 10 min de tratamento, e que o co-tratamento com Trolox[®], um análogo sintético de vitamina E, diminui a produção de ROS. Além disso, tanto o co-tratamento com Trolox[®] como com NAC, que atua como antioxidante *per se*, além de

estimular a síntese de GSH, foram capazes de reverter a atividade da MMP-2 induzida por tratamento com retinol 7 μM a níveis de controle. O co-tratamento com DTT, um potente antioxidante de tiois que protege os grupamentos sulfidril de proteínas contra oxidação, diminuiu a atividade da enzima abaixo dos níveis do controle. Juntos, esses resultados sugerem que espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no aumento da atividade da MMP-2 induzida por tratamento com retinol em células de Sertoli cultivadas. Controversamente, o co-tratamento com manitol, um conhecido sequestrador (*escavenger*) de radical hidroxil, foi incapaz de reverter o aumento da atividade da enzima. Esse resultado contrasta com estudos anteriores que mostraram o manitol prevenindo alguns efeitos oxidativos do retinol (Gelain et al., 2006; Klamt et al., 2000).

Em condições metabólicas normais, de 1 a 2% do oxigênio consumido pela célula é convertido em $\text{O}_2^{\cdot-}$ nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, outros sistemas celulares, como hipoxantina/xantina oxidase e NADPH oxidase, produzem ROS. A maioria das ROS geradas nesses sistemas celulares são apenas moderadamente reativas (*i.e.* $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) (Kamata e Hirata, 1999). Em níveis fisiológicos, as espécies reativas podem executar importantes funções na regulação de rotas de sinalização (Finkel, 2003) agindo em proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, modificando domínios redox sensíveis (Aikawa et al., 1997). O mais importante domínio redox sensível presente em proteínas são os resíduos de cisteína, que podem ser modulados por alterações no seu estado de oxidação, agindo como sensores redox celulares (Biswas et al., 2006). Recentemente tem se discutido que ROS regulam diversos genes, modulando processos como proliferação celular e crescimento, bem como a maquinaria de morte e vida celular, agindo como segundo mensageiro em cascatas de sinalização (Kamata e Hirata, 1999).

Uma das mais importantes espécies reativas as quais agem na sinalização redox é o peróxido de hidrogênio, que é altamente difusível no ambiente celular e pode ser espontânea ou enzimaticamente ser gerado a partir de $O_2^{\cdot-}$ (Rhee et al., 2005). Entretanto, tanto $O_2^{\cdot-}$ como o H_2O_2 podem ser convertidos a OH^{\cdot} por reação de Fenton ou de Haber-Weiss (Cheng et al., 2002). OH^{\cdot} parece ser inapropriado para agir como segundo mensageiro em rotas de sinalização devido ao fato de ser um radical altamente reativo de curta meia-vida que, uma vez gerado, rapidamente reage com moléculas biológicas, levando a danos oxidativos irreversíveis (Cheng et al., 2002). O fato de um bem estabelecido *escavenger* de radical hidroxil, como o manitol (Goldstein e Czapski, 1984), não ter revertido a atividade da MMP-2 induzida por retinol, sugere que outra espécie reativa que não este radical, está atuando no aumento observado da atividade da enzima. O tratamento com retinol parece gerar $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , como mostrado anteriormente em trabalhos que observaram o aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Dal Pizzol et al., 2001a). Além disso, trabalhos anteriores mostraram que o quelante de ferro 1,10-fenantrolina, reverteu o dano oxidativo induzido por retinol (Dal Pizzol et al., 2000), sugerindo que a reação de Fenton está envolvida no dano oxidativo induzido por retinol. Entretanto, o aumento da atividade da MMP-2 induzido por retinol aqui observado parece ser independente do radical hidroxil, apesar deste provavelmente estar sendo gerado, já que o co-tratamento com manitol não reverteu o aumento da atividade enzimática. De fato, pelas razões discutidas acima, a participação do danoso OH^{\cdot} iria de encontro com a idéia aqui defendida, de que o processo do aumento da atividade da enzima observado está ocorrendo através da ativação de uma via de sinalização redox-sensível.

As cinases extracelulares reguladas por sinal 1 e 2 (ERK1/2) são membros da superfamília das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK). Essas cinases são importantes proteínas regulatórias através das quais sinais extracelulares são traduzidos em eventos intracelulares (Davis, 1994; Robinson e Cobb, 1997). Essas cinases são sabidamente ativadas por ROS, como o peróxido de hidrogênio (Boonstra e Post, 2004; Clerk et al., 1998). As MAPK atuam na ativação de fatores de transcrição que são relacionadas à expressão de diversos genes, dentre eles, os genes das MMPs (Westermarck et al., 2001). Gelain (2006) demonstrou que o tratamento com retinol induz a fosforilação de CREB, mediada pela ativação oxidativa de ERK1/2 (Gelain et al., 2006). CREB, uma vez ativado por fosforilação da Ser-133, modula os genes de regulação do ciclo celular e apoptose entre outros fatores de transcrição, como diferentes membros da família AP-1, entre outros. Um dos genes aos quais CREB tem sido associado é o *MMP2* (Overall e Lopez-Otin, 2002). No presente trabalho, nós confirmamos dados anteriores que mostraram que o tratamento com retinol 7 μM é capaz de ativar ERK1/2. De uma forma geral, ERKs são principalmente envolvidas em processos anabólicos, como divisão celular e crescimento (Clerk et al., 1998; Kefaloyianni et al., 2006). A fim de verificar se a ativação da MMP-2 induzida por retinol aqui observada está relacionada à ativação de ERK1/2, nós co-tratamos as células com o inibidor UO126, um clássico inibidor de ERK1/2, o qual impede MEK1/2 de agir na fosforilação de ERK1/2, bloqueando assim a cascata de sinalização (Favata et al., 1998). Nós evidenciamos que o co-tratamento com o inibidor reverteu totalmente o aumento na atividade da MMP-2 induzido por retinol, indicando que a rota da ERK1/2 está envolvida no processo. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o tratamento com retinol 7 μM aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais ativam a rota de sinalização das ERK1/2, aumentando a atividade da MMP-2 em

células de Sertoli cultivadas. Seria racional pensar que concentrações maiores de retinol poderiam aumentar a produção de ROS e, conseqüentemente, aumentar a atividade da MMP-2. Entretanto, elevadas concentrações de ROS podem danificar os sistemas celulares por reagirem inespecificamente com biomoléculas, ao invés de agir em rotas de sinalização. Isso pode explicar o porquê de não termos encontrado um aumento na atividade da MMP-2 em concentrações mais altas de retinol, reforçando mais uma vez a hipótese da ativação da MMP-2 induzida por retinol via uma rota redox sensível.

Apesar do retinol e seus derivados, os retinóides, serem reconhecidos como moléculas chave na regulação do crescimento e diferenciação celular, o exato mecanismo da sua ação permanece pouco conhecido (Klamt et al., 2005). O retinol representa o mais abundante retinóide presente no sangue, podendo ser convertido a retinal e, subseqüentemente, a ácido retinóico, através ação de desidrogenases. O ácido retinóico é o retinóide mais hormonalmente ativo, não sendo reconvertido a retinol em sistemas biológicos (Napoli, 1999). Nossos resultados mostraram que o tratamento com ácido retinóico 1 nM aumenta a atividade da MMP-2 em células de Sertoli cultivadas. Entretanto, ao contrário do tratamento com retinol, o tratamento com AR não gerou ROS, segundo o ensaio de oxidação de DCFH-DA. NAC, Trolox[®] e manitol não reverteram o aumento da atividade da MMP-2 induzido por ácido retinóico, sugerindo que ROS não estão envolvidos no processo de aumento da atividade induzidos por esse forma de vitamina A. Somente co-tratamento com DTT reverteu a atividade da MMP-2 induzida por ácido retinóico. O potente antioxidante DDT provavelmente atua mantendo reduzido o resíduo de cisteína o qual mantém a enzima em seu estado inativo, inibindo sua ativação. De fato, o grupo o qual recebeu somente o tratamento com DTT, teve a atividade da enzima diminuída abaixo dos níveis de controle.

Esses resultados contrastam com os encontrados para o tratamento com retinol, sugerindo que esses dois retinóides agem através de diferentes rotas na ativação da MMP-2 em células de Sertoli cultivadas. Além disso, apesar do AR induzir a fosforilação de ERK1/2 – de forma similar à indução de ERK1/2 promovida pelo tratamento com retinol – o co-tratamento com o inibidor UO126 não reverteu a atividade da MMP-2 induzida por tratamento com AR. É bem descrito que ácido retinóico é capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 (Bost et al., 2002; Yen et al., 1998). Cañón (2004) demonstrou que o ácido retinóico exerce um rápido efeito na fosforilação de CREB pela ativação de ERK em células neuronais (Canon et al., 2004). Por outro lado, o fato do co-tratamento com UO126 não ter alterado atividade da MMP-2 induzida por AR sugere que a cascata de sinalização das ERK1/2 parece não ser a principal rota envolvida nessa ativação.

Os alvos celulares mais importantes do ácido retinóico são os receptores RARs e RXRs, os quais são receptores nucleares que regulam diversos genes em resposta a retinóides (Napoli, 1999). Watson (2004) demonstrou que uma quantidade aumentada de RAR- α está envolvida em uma expressão aumentada de MMP-1 no envelhecimento cutâneo (Watson et al., 2004). Dessa forma, a atividade da MMP-2 induzida por ácido retinóico em células de Sertoli cultivadas pode estar relacionado com uma ativação direta dos RARs. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar esse fato, bem como investigar as razões pelas quais concentrações mais altas de ácido retinóico não aumentam a atividade da MMP-2.

No presente trabalho, nós mostramos que tanto o tratamento com retinol quanto o tratamento com ácido retinóico alteram o aspecto morfológico de culturas de células de Sertoli. A diminuição de densidade observada após 24 horas no grupo tratado com retinol vem ao encontro de um recente trabalho de nosso grupo, o qual mostrou indução

à apoptose induzida por tratamento com retinol, dependente de ROS, em células de sertoli cultivadas (Klamt et al., 2007). A diminuição na densidade da cultura observada pós 24 horas de tratamento com RA sugere que tal tratamento provoque morte celular. Entretanto, uma análise mais profunda se faz necessária para averiguar tal afirmação.

Klamt (2000) demonstrou que o tratamento com retinol induziu a atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC) e esse efeito foi atenuado por *scavengers* de radicais livres (Klamt et al., 2000). A ODC é a enzima limitante da biosíntese das poliaminas positivamente carregadas, as quais exercem um papel chave na síntese de DNA, RNA e proteínas. Devido a sua importância para a célula, os níveis de ODC devem ser estritamente regulados. Aumento na atividade da ODC e elevados índices de poliaminas são notados sob estimulação de crescimento, bem como em células transformadas por vários oncogenes ou agentes virais, ocorrendo naturalmente em tumores. Dessa forma, a ODC é considerada uma enzima marcadora de proliferação celular (Kahana et al., 2005). Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com retinol induz a proliferação celular a qual pode ser revertida com a utilização de antioxidantes, como Trolox[®] e NAC (Dal Pizzol et al., 2001b). Em trabalho recente, nós demonstramos que o tratamento com retinol induz a progressão no ciclo celular, levando a formação de focos proliferativos através da geração de ROS (Klamt et al., 2003). Além disso, Gelain (2006) demonstrou que a formação de focos proliferativos induzidos por tratamento com retinol é revertida pela utilização de antioxidantes e UO126, indicando uma relação entre ROS, ERKs e proliferação celular (Gelain et al., 2006). O aumento na atividade da ODC e a ativação das ERK1/2 induzidos por tratamento com retinol parecem estar relacionados com um desbalanço entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes, mudando o destino celular, tornando proliferativa a não-proliferativa célula de Sertoli. Isso pode explicar o

crescimento acima da monocamada observado após cinco dias de cultura no grupo tratado com retinol.

Entretanto, o tratamento com ácido retinóico não gerou ROS, mas também foi capaz de induzir mudanças morfológicas nas culturas de células de Sertoli em um perfil semelhante ao observado no grupo tratado com retinol. A morfologia dos túbulos seminíferos depende da interação entre células de Sertoli, células peritubulares e matriz extracelular, a qual é secretada por ambos os tipos celulares. Durante a vida adulta, as células de Sertoli passam por modificações estruturais cíclicas as quais correspondem às variações de seu *status* funcional durante o ciclo do epitélio seminífero, de acordo com o nível de maturação das células germinativas, levando a alterações na matriz extracelular, em um processo mediado principalmente pela modulação da atividade das MMPs (El Ramy et al., 2005; Longin et al., 2001; Longin e Magueresse-Battistoni, 2002; Ulisse et al., 1998). Assim, alterações na atividade da MMP-2 podem danificar a homeostase dos túbulos seminíferos. Longin (2002) sugeriu que MMP-2 está envolvida nas mudanças morfológicas induzidas por FSH em células de Sertoli (Longin e Magueresse-Battistoni, 2002) e El Ramy (2005) identificou que a atividade aumentada de MMP-2 em células de Sertoli tratadas com FGF2, mostrando que tal tratamento medeia interações entre células peritubulares e células de Sertoli (El Ramy et al., 2005).

Com base nesses estudos, portanto, acreditamos que de certa forma o aumento da atividade da MMP-2 pode estar envolvido nas alterações morfológicas induzidas por retinol e ácido retinóico em culturas de células de Sertoli.

Conclusões

A partir dos dados obtidos na presente dissertação, podemos concluir que:

- Tanto o tratamento por 24 horas com retinol 7 μ M quanto o tratamento por 24 horas com ácido retinóico 1 nM foram capazes de aumentar a atividade da MMP-2 em células de Sertoli cultivadas;
- O tratamento com retinol 7 μ M foi capaz de aumentar a produção de ROS em células de Sertoli cultivadas, ao contrário do tratamento com ácido retinóico 1 nM;
- O aumento da atividade da MMP-2 induzido pelo tratamento com retinol 7 μ M parece ser dependente da produção de ROS, ao contrário do tratamento com ácido retinóico 1 nM;
- O aumento da atividade enzimática induzida pelo tratamento com retinol 7 μ M parece ser dependente ativação oxidativa de ERK1/2. Já o tratamento com ácido retinóico 1 nM parece induzir a atividade da MMP-2 por uma rota independente, sem o envolvimento de ROS;
- Ambos os tratamentos foram capazes de modificar o aspecto morfológico da cultura de células de Sertoli.

Referências

Aikawa,R, I Komuro, T Yamazaki, Y Z Zou, S Kudoh, M Tanaka, I Shiojima, Y Hiroi, Y Yazaki, 1997, Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats: *Journal of Clinical Investigation*, v. 100, p. 1813-1821.

Biswas,S, A S Chida, I Rahman, 2006, Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling: *Biochemical Pharmacology*, v. 71, p. 551-564.

Bode,W, K Maskos, 2003, Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases: *Biological Chemistry*, v. 384, p. 863-872.

Boonstra,J, J A Post, 2004, Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells: *Gene*, v. 337, p. 1-13.

Bost,F, L Caron, I Marchetti, C Dani, Y Marchand-Brustel, B Binetruy, 2002, Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage: *Biochemical Journal*, v. 361, p. 621-627.

Canon,E, J M Cosgaya, S Sesucova, A Aranda, 2004, Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells: *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, p. 5583-5592.

Cheng,FC, J F Jen, T H Tsai, 2002, Hydroxyl radical in living systems and its separation methods: *Journal of Chromatography B*, v. 781, p. 481-496.

Clerk,A, A Michael, P H Sugden, 1998, Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes: *Biochemical Journal*, v. 333, p. 581-589.

Clifford,JL, D G Menter, M Wang, R Lotan, S M Lippman, 1999, Retinoid Receptor-dependent and -independent Effects of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide in F9 Embryonal Carcinoma Cells: *Cancer Research*, v. 59, p. 14-18.

Coussens,LM, B Fingleton, L M Matrisian, 2002, Cancer therapy - Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations: *Science*, v. 295, p. 2387-2392.

Dal Pizzol,F, F Klamt, M S Benfato, E A Bernard, J C F Moreira, 2001a, Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells: *Free Radical Research*, v. 34, p. 395-404.

Dal Pizzol,F, F Klamt, R J S Dalmolin, E A Bernard, J C F Moreira, 2001b, Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated sertoli cells: *Free Radical Research*, v. 35, p. 749-755.

Dal Pizzol,F, F Klamt, M L C Frota, L F Moraes, J Claudio, F Moreira, M S Benfato, 2000, Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells: *Free Radical Research*, v. 33, p. 677-687.

Davis,RJ, 1994, Mapks - New Jnk Expands the Group: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 19, p. 470-473.

de Oliveira, RB, F Klamt, M A A Castro, M Polydoro, A Zanotto, D P Gelain, F Dal Pizzol, J C F Moreira, 2005, Morphological and oxidative alterations on Sertoli cells cytoskeleton due to retinol-induced reactive oxygen species: *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 271, p. 189-196.

de Oliveira, R, M Bittencourt Pasquali, A Filho, R Dalmolin, D Gelain, C Gottfried, J Rodrigues, F + Klamt, J Moreira, 2007, Can electrons travel through actin microfilaments and generate oxidative stress in retinol treated Sertoli cell?: *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 301, p. 33-45.

El Ramy, R, A Verot, S Mazaud, F Odet, S Magre, B Magueresse-Battistoni, 2005, Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis: *Journal of Endocrinology*, v. 187, p. 135-147.

Favata, MF, K Y Horiuchi, E J Manos, A J Daulerio, D A Stradley, W S Feeser, D E Van Dyk, W J Pitts, R A Earl, F Hobbs, R A Copeland, R L Magolda, P A Scherle, J M Trzaskos, 1998, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 18623-18632.

Finkel, T, 2003, Oxidant signals and oxidative stress: *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, p. 247-254.

Gelain, DP, M Cammarota, A Zanotto, R B de Oliveira, F Dal Pizzol, I Izquierdo, L R M Bevilaqua, J C F Moreira, 2006, Retinol induces the ERK 1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells: *Cellular Signalling*, v. 18, p. 1685-1694.

Goldstein,S, G Czapski, 1984, Mannitol as an OH Scavenger in Aqueous Solutions and in Biological Systems: *International Journal of Radiation Biology*, v. 46, p. 725-729.

Haddad,JJ, 2002, Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors: *Cellular Signalling*, v. 14, p. 879-897.

Jackson,AL, L A Loeb, 2001, The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 477, p. 7-21.

Kahana,C, G Asher, Y Shaul, 2005, Mechanisms of protein degradation - An odyssey with ODC: *Cell Cycle*, v. 4, p. 1461-1464.

Kamata,H, H Hirata, 1999, Redox regulation of cellular signalling: *Cellular Signalling*, v. 11, p. 1-14.

Kefaloyianni,E, C Gaitanaki, I Beis, 2006, ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappa B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts: *Cellular Signalling*, v. 18, p. 2238-2251.

Klamt,F, F Dal Pizzol, D P Gelain, R S Dalmolin, d O Birnfeld, M Bastiani, F Horn, J C Fonseca Moreira, 2007, Vitamin A treatment induces apoptosis through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway: *Cell Biol.Int.*

Klamt,F, F Dal Pizzol, N C Ribeiro, E A Barnard, M S Benfato, J C F Moreira, 2000, Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator: *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 208, p. 71-76.

Klamt,F, F Dal Pizzol, R Roehrs, R B de Oliveira, R Dalmolin, J A P Henriques, H H R de Andrades, A L L D Ramos, J Saffi, J C F Moreira, 2003, Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation induced by Vitamin A supplementation: Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 539, p. 117-125.

Klamt,F, M R de Oliveira, J C F Moreira, 2005, Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria: Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, v. 1726, p. 14-20.

Longin,J, P Guillaumot, V A Chauvin, A M Morera, B Magueresse-Battistoni, 2001, MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation: Journal of Cell Science, v. 114, p. 2125-2134.

Longin,J, B Magueresse-Battistoni, 2002, Evidence that MMP-2 and TIMP-2 are at play in the FSH-induced changes in Sertoli cells: Molecular and Cellular Endocrinology, v. 189, p. 25-35.

McCawley,LJ, L M Matrisian, 2001, Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!: Curr.Opin.Cell Biol., v. 13, p. 534-540.

Moreira,JCF, F DalPizzol, D VonEndt, E A Bernard, 1997, Effect of retinol on chromatin structure in Sertoli cells: 1,10-phenanthroline inhibit the increased DNase I sensitivity induced by retinol: Medical Science Research, v. 25, p. 635-638.

Morgunova,E, A Tuuttila, U Bergmann, M Isupov, Y Lindqvist, G Schneider, K Tryggvason, 1999, Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: Activation mechanism revealed: Science, v. 284, p. 1667-1670.

Murata,M, S Kawanishi, 2000, Oxidative DNA Damage by Vitamin A and Its Derivative via Superoxide Generation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 2003-2008.

Napoli,JL, 1999, Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism: *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1440, p. 139-162.

Nelson,KK, J A Melendez, 2004, Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, p. 768-784.

Noe,V, B Fingleton, K Jacobs, H C Crawford, S Vermeulen, W Steelant, E Bruyneel, L M Matrisian, M Mareel, 2001, Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1: *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 111-118.

Overall,CM, 2002, Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity - Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites: *Molecular Biotechnology*, v. 22, p. 51-86.

Overall,CM, O Kleinfeld, 2006, Tumour microenvironment - Opinion - Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy: *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 227-239.

Overall,CM, C Lopez-Otin, 2002, Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era: *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 657-672.

Palace,VP, N Khaper, Q I Qin, P K Singal, 1999, Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 746-761.

Rhee,SG, S W Kang, W Jeong, T S Chang, K S Yang, H A Woo, 2005, Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins: Current Opinion in Cell Biology, v. 17, p. 183-189.

Robinson,MJ, M H Cobb, 1997, Mitogen-activated protein kinase pathways: Current Opinion in Cell Biology, v. 9, p. 180-186.

Roos,TC, F K Jugert, H F Merk, D R Bickers, 1998, Retinoid Metabolism in the Skin: Pharmacological Reviews, v. 50, p. 315-333.

Sternlicht,MD, Z Werb, 2001, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior: Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 17, p. 463-516.

Ulisse,S, N Rucci, D Piersanti, E Carosa, F M Graziano, A Pavan, P Ceddia, M Arizzi, P Muzi, L Cironi, L Gnessi, M D'Armiento, E A Jannini, 1998, Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in rat prepubertal Sertoli cells: Endocrinology, v. 139, p. 741-747.

Visse,R, H Nagase, 2003, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - Structure, function, and biochemistry: Circulation Research, v. 92, p. 827-839.

Wang,XD, 2005, Alcohol, vitamin A, and cancer: Alcohol, v. 35, p. 251-258.

Watson,REB, J A Ratnayaka, R C C Brooke, S Yee-Sit-Yu, P Ancian, C E M Griffiths, 2004, Retinoic acid receptor alpha expression and cutaneous ageing: Mechanisms of Ageing and Development, v. 125, p. 465-473.

Westermarck,J, S P Li, T Kallunki, J H Han, V M Kahari, 2001, p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1

and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression: *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, p. 2373-2383.

Yen, A, M S Roberson, S Varvayanis, A T Lee, 1998, Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP) extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest: *Cancer Research*, v. 58, p. 3163-3172.