

# Actualidades sobre bioquímica de la vitamina A

Providencia Rodríguez<sup>1</sup>, Darío Simarro Escandell<sup>2</sup>

**RESUMEN** Con el propósito de investigar los compuestos presentes en el hígado derivados del metabolismo, se inocularon intraperitonealmente ratas hembras de 8 semanas de nacida con [11,12<sup>3</sup>H]-acetato de retinol en concentraciones fisiológicas. Por técnicas cromatográficas se demostró la presencia de tres compuestos radioactivos, dos con características no polar (I y II) y un tercero polar (III). El compuesto I se identificó como palmitato de retinol, lo cual permite concluir que solamente se almacena en el hígado bajo esa forma. Utilizando técnicas de doble marcaje isotópico, con [3H]-retinol y [14C]-galactosa, ó [3H]-retinol y [32P]-fosfato, se demostró en el compuesto III la presencia de los tres isótopos. Por sus propiedades de hidrólisis ácida y alcalina en condiciones suaves, se concluyó que el derivado polar III es fosfato de retinil galactosa. Este compuesto podría ser el donador de restos galactosil en biosíntesis de glicoproteínas. *An Venez Nutr* 1992;5:69-74

**PALABRA CLAVE:** Vitamina A, carotenos, retinol.

## Estructura y función

Vitamina A es un nombre genérico, el cual se emplea para todos los compuestos diferentes a los carotenoides, los cuales muestran cualitativamente la actividad biológica del retinol.

En los últimos 10 años se ha empleado el término retinoides para incluir las formas naturales de vitamina A y análogos sintéticos que tengan o no actividad biológica del retinol. Algunos de los análogos sintéticos son menos tóxicos y más potentes que los naturales, mientras que otros son inactivos, indicando esto que hay ciertos requerimientos estructurales específicos para la actividad. La fuente primaria de vitamina A en humanos son los carotenoides, siendo los más abundantes en el suero;  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno, conocidos con el nombre de provitamina A (Gráfico 1). El retinol (Gráfico 1) en su forma trans, es el compuesto del cual derivan todos los que forman la vitamina A.

Estructuralmente, la molécula muestra tres hechos importantes:

- 1) Una cabeza hidrofóbica constituida por un anillo  $\beta$ -ionona.
- 2) Una cadena hidrocarbonada isoprenoide en este sistema de dobles enlaces conjugados pueden ocurrir isomerizaciones provocadas por la luz, enzimas o calor y así permitir un cambio en la estructura de la molécula y,

- 3) Un extremo polar constituido por un grupo alcohol primario que puede ser modificado enzimáticamente o químicamente y formar ésteres como palmitato, acetato o fosfato de retinol, derivados glicosilados como retinol fosfato azúcares; o ser oxidado a aldehído formando retinal, o a un compuesto más polar, el cual es ácido retinoico (Gráfico 2).

Es obvio que una molécula con tan variadas propiedades de sus componentes estructurales, puede intervenir en diferentes reacciones enzimáticas en el metabolismo (Gráfico 3). Algunas de estas reacciones pueden ocurrir en diferentes tipos de células como las que conducen a la formación de derivados glicosilados; mientras que otras pueden ser limitadas a células especializadas que contienen enzimas específicas para catalizar las reacciones.

Desde hace alrededor de 80 años, cuando se reportó a la vitamina A como un factor esencial para el crecimiento de ratas (1); la elucidación de su mecanismo de acción ha sido un problema dinámico para bioquímicos,

- 
1. Laboratorio de trombosis experimental. Centro de Biofísica y Bioquímica.
  2. Cátedra de Bioquímica. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Solicitar copia a Providencia Rodríguez, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apartado 21827, Caracas 1020A, Venezuela.
-

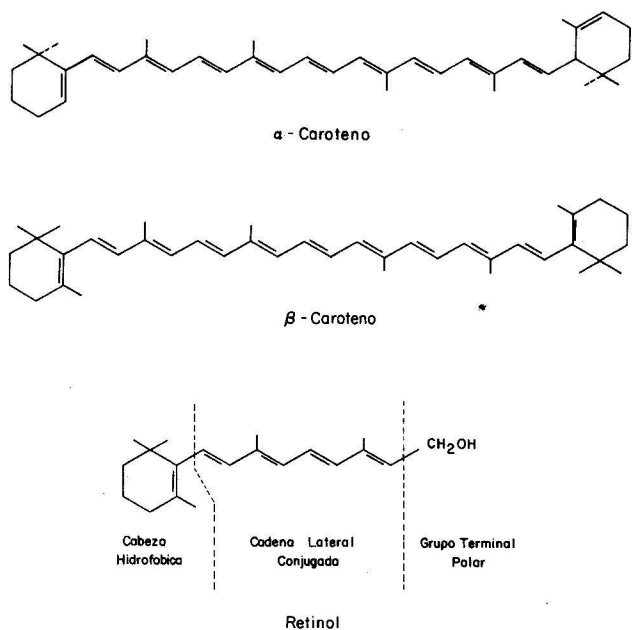


Gráfico 1. Estructura de carotenos y retinol.

fisiólogos, nutricionistas y biólogos celulares. El principal acercamiento experimental al mecanismo de acción de la vitamina A se ha basado en la observación de los cambios causados en animales experimentales o cultivos de tejidos por la deficiencia de la misma. Tales estudios han demostrado los requerimientos esenciales de la vitamina A para el crecimiento de vertebrados y para la prevención de la ceguera nocturna. Además, ha sido reconocido su papel como un importante factor en diferenciación de epitelios, mantenimiento de la capacidad reproductora y en la biosíntesis de glicoproteínas. De todas estas funciones de la vitamina A, solamente su función en el ciclo visual y en la biosíntesis de glicoproteínas han sido establecidas a nivel molecular.

### Biosíntesis y absorción

La vitamina A puede ingerirse con la dieta bajo la forma de  $\beta$ -caroteno o ésteres de retinol. Una significativa cantidad de  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides provitamina A son convertidos a retinol fundamentalmente en la mucosa intestinal después de ser absorbidos, pero también en alguna cantidad en el hígado y otros órganos (2). La cantidad relativa de carotenoides absorbida directamente y metabolizada a vitamina A en el intestino, varía de una manera particular para cada individuo. El proceso biosintético envuelve dos reacciones enzimática: a) una ruptura central en la molécula de  $\beta$ -caroteno catalizada por la enzima  $\beta$ -caroteno dioxigenasa, produciendo dos moléculas de retinal (3) y b) reducción del aldehído a retinol catalizada por la enzima retinaldehído reductasa (4). Los ésteres de retinol, ingeridos en la dieta son hidrolizados previamente por esterasas específicas y el retinol formado es absorbido por la mucosa intestinal (5).

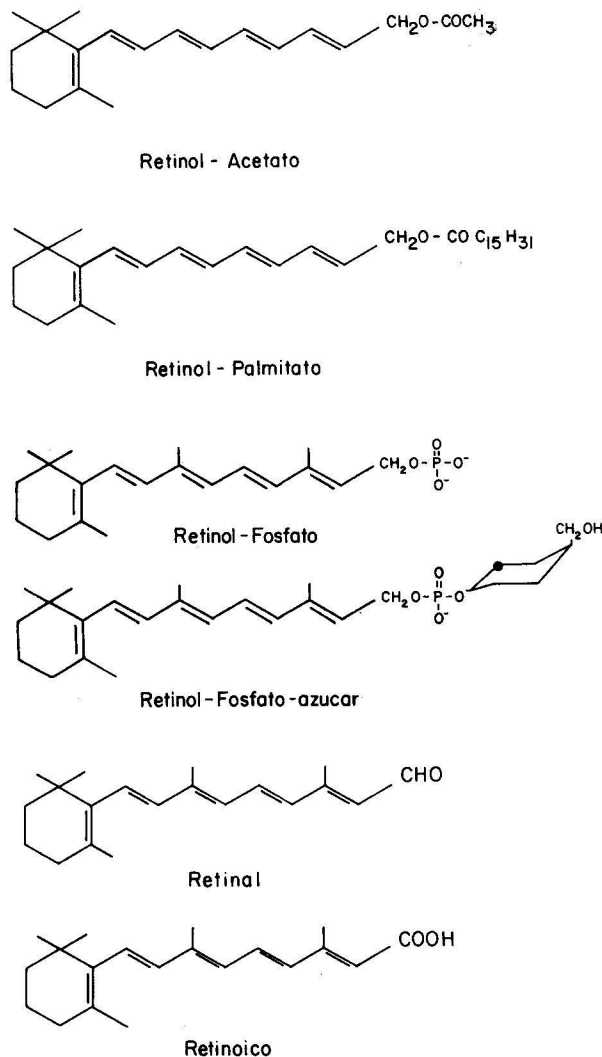


Gráfico 2. Modificaciones del grupo alcohol primario del retinol.

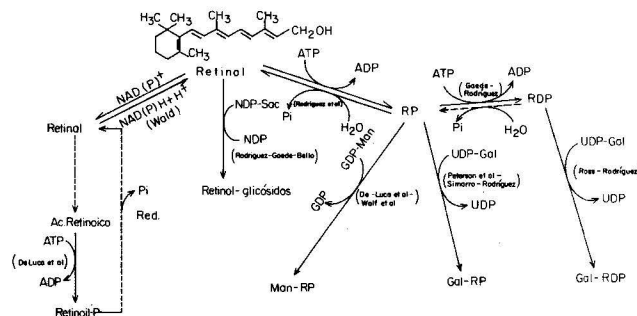


Gráfico 3. Reacciones enzimáticas del retinol en el proceso visual y la formación de derivados glicosilados del retinol. Trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), nucleótido de azúcar (NDP-Sac), difosfato de nucleótido (NDP), fosfato inorgánico (Pi), retinol monofosfato (RP), retinol difosfato (RDP), guanosindifosfato manosa (GDP-Man), uridindifosfato galactosa (UDP-Gal).

El retinol libre absorbido o sintetizado del caroteno, debe ser esterificado con ácidos grasos de cadena larga. Los ésteres de retinol así formados luego son incorporados a la linfa en forma de quilomicrones (6); del sistema linfático pasan a la sangre y son removidos de la circulación por el hígado. En este órgano, ocurre hidrólisis de los ésteres de retinol y de nuevo esterificación, preferiblemente con ácido palmítico y almacenados dentro del hepatocito. Sin embargo, la presencia de acetato de retinol almacenado en hígado, también ha sido reportado (6,7). La vitamina A es movilizada del hígado a los tejidos periféricos por un sistema de transporte finamente regulable, donde ejerce su acción. El sistema de transporte está formado por dos proteínas del plasma, la proteína enlazante de retinol (RBP) y la prealbúmina; el retinol se une específicamente a la RBP y ésta forma un complejo proteína-proteína con la prealbúmina.

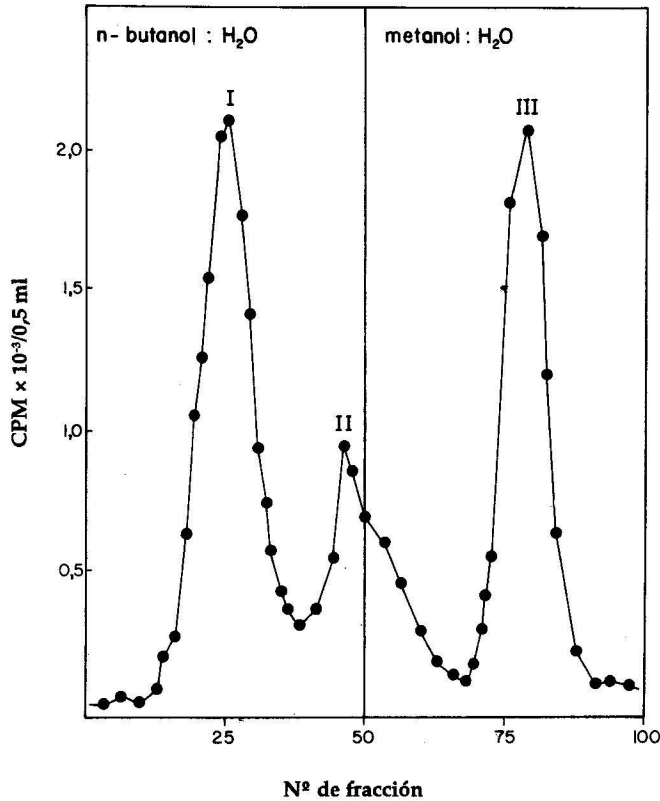
### Vitamina A y biosíntesis de glicoproteínas

El concepto de que el retinol y el ácido retinoico están envueltos directamente en la biosíntesis de glicoproteínas fue sugerido de los hallazgos de que la deficiencia de la vitamina en animales experimentales provocó una disminución del 79% en la cantidad de manosa unida covalentemente en glicoproteínas del hígado. Este valor alcanzó 95%, en casos de deficiencia severa de la vitamina (8). Por el contrario, experimentos en los animales con dietas en exceso de vitamina A mostraron un aumento de 610% en la incorporación de manosa en las glicoproteínas (9). Un efecto menos marcado de las deficiencias de la vitamina, se encontraron con otros azúcares, debido a esto se ha pensado que aparentemente es un efecto específico para el proceso de glicosilación de algunas glicoproteínas. Otros autores han reportado evidencias de que la deficiencia de vitamina A en animales, afectó la síntesis de glicoproteínas específicas en diferentes órganos, tales como intestino, tráquea y córnea (10). Igualmente, una glicosilación deficiente de  $\alpha_1$ -macroglobulina aislada del suero de ratas alimentadas con una baja ingesta de vitamina A, también ha sido reportada (10). Tales efectos de la vitamina A sobre la biosíntesis de glicoproteínas puede explicar la variedad de anomalías en el metabolismo celular en estados deficientes de la vitamina, puesto que las glicoproteínas son constituyentes naturales de las membranas celulares y cumplen funciones biológicas importantes como son la adhesión y multiplicación celular y receptores de hormonas. La diferenciación de epitelios y el mantenimiento de la capacidad reproductora son actividades biológicas de la vitamina A, que podrían explicarse a nivel molecular por su efecto sobre el grado de glicosilación de las glicoproteínas. Desde 1970, fue propuesto que el retinol puede funcionar en su forma fosforilada como transportador de restos glicosilos en la biosíntesis de glicoproteínas (11-14).

Rosso y col. demostraron la síntesis "in vitro" de retinol fosfato manosa a partir de retinol fosfato y GDP-manosa catalizada por microsomas de hígado de ratas (15). Peterson y col. (16) reportaron la síntesis de retinol fosfato galactosa (RPM-gal), en incubaciones de una fracción de membranas de mastocitoma en presencia de retinol fosfato y UDP-galactosa. Estos compuestos glicosilados de retinol, serían los intermediadores donadores de restos manosil y galactosil respectivamente en las reacciones de glicosilación de la síntesis de glicoproteínas.

En consecuencia de todo esto, si los compuestos intermediarios son sintetizados "in vitro" deben existir bajo condiciones fisiológicas en animales, por lo tanto es de importancia investigar la posibilidad de la síntesis "in vivo" de tales compuestos. Para ello, diseñamos experimentos con el fin de demostrar la presencia del RPM-gal en hígado de ratas alimentadas con dietas normales. La inyección de una dosis fisiológica de acetato de retinol (10  $\mu$ gr) adicionado de 5  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-acetato de retinol como marcador; y la determinación posterior a diferentes tiempos de la radioactividad presente en extractos del hígado (cloroformo: metanol 3:2), demostraron que la incorporación óptima del retinol en el hígado fue en un lapso de 45 min., después de administrado por vía intraperitoneal (13). La naturaleza polar de los compuestos derivados del retinol, se analizó por cromatografía del extracto hepático en columna de celulosa eluída con n-butanol saturado con agua (compuestos apolares) y metanol: agua (compuestos polares). Los resultados demostraron la presencia de tres compuestos (I, II, III) diferenciados por su polaridad según su elución de la columna (Gráfico 4). El análisis posterior de los derivados I, II y III por cromatografía en capa fina con diferentes sistemas de solventes de distintos grados de polaridad reveló que el compuesto I es palmitato de retinol, el III es un compuesto con migración idéntica a los derivados glicosilados de retinol y el compuesto II no pudo ser identificado con los sistemas de solventes empleados (resultados no mostrados). Es de hacer notar que en nuestras condiciones experimentales el retinol fue reesterificado en el hígado exclusivamente al ester palmitato para su almacenamiento, no habiéndose demostrado la presencia del acetato de retinol como había sido reportado anteriormente por otros autores (6,7).

La presencia de galactosa en los compuestos formados a partir de retinol se investigó mediante el mismo procedimiento experimental anterior, pero inoculando el retinol junto con 10  $\mu$ gr de galactosa adicionado de 5  $\mu$ Ci de [ $^{14}$ C]-galactosa como marcador, o sea, experimentos de doble marcaje. Los resultados demostraron una baja incorporación de la radioactividad de la galactosa en el compuesto I derivado del retinol, siendo el compuesto III significativamente marcado con [ $^{14}$ C] de galactosa. Al no existir radioactividad de [ $^{14}$ C] en el compuesto II, nos

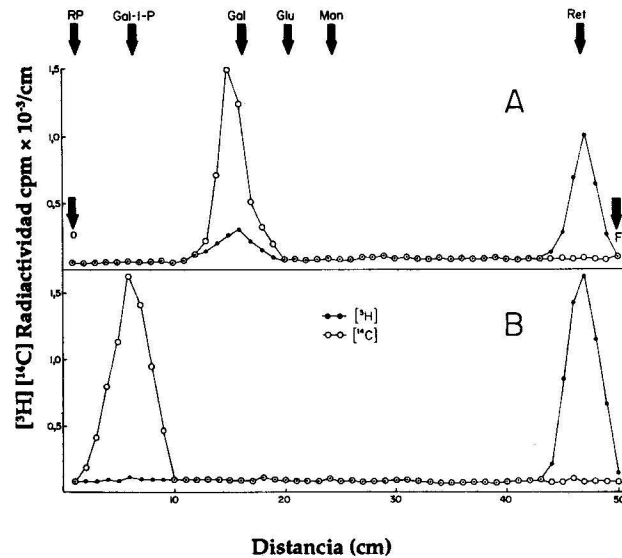


**Gráfico 4.** Cromatografía en columna de celulosa del extracto de hígado de ratas inoculadas con acetato de retinol. Las ratas fueron inoculadas con una mezcla de  $10 \mu\text{g}$  y  $5 \mu\text{Ci}$  de acetato de  $^3\text{H}$ -retinol y sacrificadas 45 min. después. Los hígados se homogenizaron en 7 vol. de cloroformo:metanol (3:2) y centrifugados a 2.500 rpm. El sobrenadante fue concentrado bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$  hasta un volumen de 2 ml y cromatografiado en una columna de celulosa CF-11 Whatman ( $26 \times 1,7 \text{ cm}$ ). Se colectaron fracciones de 2 ml y fueron ensayadas para la radioactividad presente.

permite excluirlo como un derivado de la galactosa (resultados no mostrados).

Experimentos de doble marcaje con  $^{14}\text{C}$ -retinol y  $^{32}\text{P}$ -fosfato demostraron que sólo el compuesto III contenía radioactividad  $^{32}\text{P}$  (resultados no mostrados). Estos resultados permiten sugerir que el compuesto III, de naturaleza polar y el cual contenía los tres isótopos administrados, posiblemente sea RMP-gal.

La hidrólisis ácida y alcalina del compuesto III bajo condiciones suaves, permitió establecer definitivamente su composición. La cromatografía en papel con el solvente butanol: piridina: agua (60:40:30) de los productos de hidrólisis bajo condiciones ácidas revelaron la presencia de retinol y galactosa, y bajo condiciones alcalinas retinol y galactosa-1-fosfato (Gráfico 5). Estos resultados nos permiten concluir que el compuesto III es RMP-gal, ya que tiene en su estructura retinol, fosfato y galactosa. Además, en la cromatografía se puede observar que la galactosa inyectada a la rata no ha sido convertida a los otros azúcares corridos como patrones, ya que sólo se demuestra la presencia de galactosa. Este derivado de la



**Gráfico 5.** Registro de  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$  radioactividad de la cromatografía en papel de hidrolizados del compuesto III (Fig. 5). Una preparación "in vivo" del compuesto III doblemente marcado, fue aislado por cromatografía en celulosa (Fig. 5) y evaporado hasta sequedad. El compuesto se sometió a hidrólisis ácida con 1 ml de  $\text{HCl}$  0,1N durante 30 min. a  $97^\circ\text{C}$ . La hidrólisis alcalina se realizó en 1 ml de 1-propanol añadido de 1 ml de  $\text{Na OH}$  0,2N durante 25 min. a  $60^\circ\text{C}$ . Alícuotas de los hidrolizados ácidos (A) y alcalino (B) fueron cromatografiados por separado en papel Whatman Nº3 empleando como mezcla de solventes butanol: piridina: agua (60:40:30) durante 16 horas. La radioactividad fue registrada en las tiras del papel. Las posiciones de las flechas, indican el sitio donde migran patrones auténticos de retinol monofosfato (RMP,  $R_f = 0,04$ ); galactosa-1-fosfato (Gal-1-P,  $R_f = 0,196$ ); galactosa (Gal,  $R_f = 0,30$ ); glucosa (Glu,  $R_f = 0,40$ ); manosa (Man,  $R_f = 0,44$ ); retinol (Ret,  $R_f = 0,93$ ). Origen de la cromatografía (O); frente del solvente (F).

vitamina A, ha sido sintetizado mediante la inoculación de niveles fisiológicos del retinol, lo cual permite interpretaciones de eventos moleculares que tienen lugar en las glicosilaciones a nivel molecular en los tejidos. Esto es sumamente importante, porque muchos de los trabajos sobre el metabolismo de la vitamina A han sido realizados en animales con dosis altas (no fisiológicas), los cuales deben interpretarse con sumo cuidado, porque ya a esos niveles existe toxicidad de la vitamina A debido a su intención indiscriminada con las membranas celulares.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Srta. Elizabeth González su trabajo de secretaria y a la Sra. Dhuwya Otero la realización de los dibujos. Este trabajo fue financiado parcialmente por CONICIT, Proyecto S1-1986.

#### Referencias

1. McCollum EV, David M. The necessity of certain lipids in the diet during growth. *J Biol Chem* 1913;5:167-75.
2. Olson JA. Provitamin A function of carotenoids: The carotene into vitamina A *J Nutr* 1989;119:105-8.

3. Goodman DS, Huang HS, Kanai M, Shiratori T. The enzymatic conversion of all-trans b-carotene into retinal. *J Biol Chem* 1967;242:3543-54.
4. Fidge NH, Smith FR, Goodman DS. Vitamin A and carotenoids. The enzymatic conversion of b-carotene into retinal in hog intestinal mucosa. *Biochem J* 1969;114:689-94.
5. Ganguly J. Absorption of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 1969;22:923-33.
6. Huang HS, Goodman DS. Vitamin A and carotenoids. Intestinal absorption and metabolism of <sup>14</sup>C-labeled vitamin A alcohol and b-carotene in the rat. *J Biol Chem* 1965;240:2839-44.
7. Goodman DS, Huang HS, Shiratori T. Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *J Lipid Res* 1965;6:390-6.
8. De Luca LM, Silverman-Jones CS, Barr RM. Biosynthetic studies on mannlipids and mannoproteins of normal and vitamin A depleted hamster livers. *Biochem Biophys Acta* 1975;409:342-59.
9. Hassell JR, Silverman-Jones CS, De Luca LM. The in vivo stimulation of mannose incorporation into mannosylretinylphosphate, dolichylmannosylphosphate and specific glycopeptides of rat liver by high doses of retinylpalmitate. *J Biol Chem* 1978;253:1627-31.
10. Kiorpes TC, Anderson RS, Wolf G. Effect of vitamin A deficiency on glycosylation of rat serum a<sub>1</sub>-macroglobulin. *J Nutr* 1981;11:2059-68.
11. De Luca LM, Rosso GC, Wolf G. The biosynthesis of a mannlipid that contains a polar metabolite of [<sup>15-<sup>14</sup>C</sup>] retinol. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;41:615-20.
12. Gaede K, Rodríguez P. Formation of retinol [a-b-<sup>32</sup>P] pyrophosphate with [r-<sup>32</sup>P] ATP catalysed by whole homogenates of rat thyroid. *Biochem Biophys Res Commun* 1973;54:76-81.
13. Rodríguez P, Ross C, Simarro D, Bello O. Synthesis of retinylidiphosphate galactose by rat liver microsomes from retinylidiphosphate and uridindiphosphate galactose. 1981; *Col Contr Papers. IV Int Symp on Carotenoids* 1981;32-34.
14. Caccam JF, Jackson JJ, Eylar EH. The biosynthesis of mannose-containing glycoproteins: A possible lipid intermediate. *Biochem Biophys Res Commun* 1969;35:505-10.
15. Roso GC, De Luca L, Warren CD, Wolf G. Enzymatic synthesis of mannosylretinylphosphate from retinylphosphate and guanosine diphosphate mannose. *J Lipid Res* 1975;16:235-43.
16. Peterson PA, Rask L, Helting L, Ostberg A, Fernstedt Y. Formation and properties of retinylphosphate galactose. *J Biol Chem* 1976;251:4986-95.

## Biochemistry of vitamin A: a contribution

**ABSTRACT** Female rats were injected intraperitoneally with a physiological dose of [11, 12 <sup>3</sup>H]-retinol acetate in order to investigate in the liver the presence of retinol derivatives. Chromatographic analysis revealed the presence of three radioactive compounds, two of them were non-polar (I and II) and the third was polar (III). The compound I was identified as retinyl palmitate, and we conclude that retinol was esterified with palmitate and stored in the liver. The compound II was not identified. In other experiments reported here, rats were injected with [<sup>3</sup>H]-retinol and [<sup>14</sup>H]-galactose or [<sup>3</sup>H]-retinol and [<sup>32</sup>P]-phosphate. The results demonstrated the presence of the three isotopes only in the compound III. On the base of mild acid and alkaline hydrolysis of the isolated compound III, we conclude that it is galactosyl retinyl phosphate. This compound formed under physiological conditions could function as a donor of galactosyl rest in glycoprotein biosynthesis. *An Venez Nutr* 1992;5:69-74

**KEY WORDS:** Vitamin A, retinoids, carotinoids, vitamin deficiency.