

Universidade Federal da Bahia

Escola de Medicina Veterinária

Mestrado em Medicina Veterinária Tropical

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO ALCALÓIDE PIRROLIZIDÍNICO
MONOCROTALINA, EXTRAÍDO DA *CROTALARIA RETUSA*, E DA
DEHIDROMONOCROTALINA, SEU DERIVADO QUIMICAMENTE
ATIVO, EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE
RATOS WISTAR NEONATOS.**

RAFAEL DE ARAÚJO BARRETO

**Salvador – Bahia
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RAFAEL DE ARAÚJO BARRETO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO ALCALÓIDE PIRROLIZIDÍNICO MONOCROTALINA,
EXTRAÍDO DA *CROTALARIA RETUSA*, E DA DEHIDROMONOCROTALINA, SEU
DERIVADO QUIMICAMENTE ATIVO, EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS
CORTICAIS DE RATOS WISTAR NEONATOS.**

Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária Tropical, na área de Saúde Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Lima Costa

Salvador – Bahia

2005

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO ALCALÓIDE PIRROLIZIDÍNICO MONOCROTALINA,
EXTRAÍDO DA *CROTALARIA RETUSA*, E DA DEHIDROMONOCROTALINA, SEU
DERIVADO QUIMICAMENTE ATIVO, EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS
CORTICAIS DE RATOS WISTAR NEONATOS.**

RAFAEL DE ARAÚJO BARRETO

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária Tropical.

Salvador, ____ de junho de 2005

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Sílvia Lima Costa – ICS- UFBA
Orientadora

Profa. Dra. Cátia Suse Ribeiro - UNIME

Prof. Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira – EMEV- UFBA

ÍNDICE

LISTA DAS FIGURAS.....	vi
LISTA DAS ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1- A Toxicologia do gênero <i>Crotalaria</i>	04
2.1.1- Característica e distribuição de plantas do gênero <i>Crotalaria</i>	04
2.1.2- Toxicidade das espécies de <i>Crotalaria</i>	06
2.1.3- Alcalóides pirrolizidínicos: componentes farmacologicamente ativos nas espécies de <i>Crotalaria</i>	09
2.1.3.1- Características químicas e biológicas dos alcalóides pirrolizidínicos.....	09
2.1.3.2- Metabolismo dos alcalóides pirrolizidínicos.....	10
2.1.3.3- A monocrotalina: principal componente ativo da <i>Crotalaria retusa</i>	11
2.2- As células gliais do SNC.....	15
2.2.1- Características e funções dos astrócitos: principal população de células gliais no SNC	17
2.2.2- Culturas de células gliais como modelos de estudos neurotoxicológicos.....	19
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
<i>Comparação dos efeitos da monocrotalina e da dehidromonocrotalina sobre cultura de astrócitos corticais de ratos neonatos</i>	21
RESUMO.....	21
SUMMARY.....	23
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A <i>Crotalaria retusa</i>	05
FIGURA 2 - Equínos intoxicados com <i>C. retusa</i>	08
FIGURA 3 - Representação esquemática dos mecanismos de toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos	12
FIGURA 4 – A monocrotalina e dehidromonocrotalina	14
FIGURA 5 – As células do SNC	16
FIGURA 6 – Principais funções dos astrócitos	18
FIGURA 7 - Teste do MTT em células tratadas com MCT	33
FIGURA 8 - Teste de toxicidade pelo teste do MTT em células tratadas com a DHMC durante 24 h	34
FIGURA 9 - Teste de toxicidade pelo teste do MTT em células tratadas com a DHMC durante 72h	35
FIGURA 10 - Fotomicrografia óptica de culturas primárias de astrócitos em condições controle (meio de cultura ou veículo DMSO 0,5%) ou expostos à MCT (0,1-500 µM), por um período de 72 h, e corados pelo método de Rosenfeld	38
FIGURA 11 - Fotomicrografia óptica de culturas primárias de astrócitos em condições controle (meio de cultura ou veículo DMF 1%) ou expostos à DHMC (0,1-500 µM), por um período de 72 h, e corados pelo método de Rosenfeld	39
FIGURA 12 - Fotomicrografia da análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP e da cromatina nuclear com o agente intercalante Hoechst 33258 em astrócitos em condições controle (DMSO 0,5%) ou expostos à MCT (0,1-500 µM), por 72 h	42
FIGURA 13 - Fotomicrografia da análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP e da cromatina nuclear com o agente intercalante Hoechst 33258 em astrócitos em condições controle (DMF 1%) ou expostos à DHMC (0,1-500 µM), por 72 h	43
FIGURA 14 - Análise por Western immunoblotting da expressão da proteína do citoesqueleto GFAP em astrócitos em condições controle (DMSO 0,5%) ou tratadas com diferentes concentrações da MCT (0,1 a 500 µM) por 72 h.	44
FIGURA 15 - Análise por Western immunoblotting da expressão da proteína do citoesqueleto GFAP em astrócitos em condições controle (DMF 1%) ou tratadas com diferentes concentrações da DHMC (0,1 a 500 µM) por 72 h.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AP - Alcalóides pirrolizidínicos

BSA - Albumina Sérica Bovina

DHMC - Dehidromonocrotalina

DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMF - Dimetil Formamida

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

EGTA - Ácido etileno glicol tetracético

GFAP - Proteína ácida do gliofilamento

KOH - Hidróxido de potássio

MCT - Monocrotalina

MTT - 3-(dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio

PBS - Tampão fosfato salino

SDS - Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

TBS-T - Tampão tris salino com Tween 20

TBS - Tampão tris salino

UI - Unidade internacional

UV - Ultravioleta

BARRETO, RA. **Análise dos efeitos do alcalóide pirrolizidínico monocrotalina, extraído da *crotalaria retusa*, e da dehidromonocrotalina, seu derivado quimicamente ativo, em cultura primária de astrócitos corticais de ratos Wistar neonatos.** Salvador, Bahia, 2005. 80p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2005.

RESUMO

Casos de intoxicações das plantas do gênero *Crotalaria* (Leguminosae) em humanos, e principalmente em animais, tem sido amplamente descritos, e geram principalmente lesões hepáticas, ainda que o comprometimento do SNC tenha sido também descrito em animais mais sensíveis, como equídeos. Esta toxicidade é atribuída ao alcalóide pirrolizidínico (AP) monocrotalina (MCT), que quando metabolizada pelos citocromos P450, gera o composto ativo dehidromonocrotalina (DHMC). Esse estudo, após uma ampla revisão sobre os aspectos toxicológicos da MCT, objetivou comparar os efeitos diretos *in vitro* da MCT, extraída de *C. retusa*, e da DHMC, gerada por oxidação exógena, sobre cultura primária de astrócitos. Foram testadas concentrações entre 0,1 a 500 μ M da MCT e DHMC no período de 24 e 72h. O teste do MTT revelou que a MCT não mostrou toxicidade em astrócitos, porém a DHMC reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 1 μ M desde 24h, amplificando essa ação após 72h de tratamento. A coloração pancrômica de Rosenfeld permitiu evidenciar que os astrócitos tratados com 0,1 μ M MCT pôr 72h, apresentaram o corpo celular contraído e desenvolveram finos prolongamentos de tamanho variável; este efeito foi aumentado com o aumento da concentração de MCT, e verificado em até cerca de 80% das células tratadas com 500 μ M MCT. Células expostas a DHMC pôr 72h também alteraram sua morfologia: mais de 30% dos astrócitos tratados com 0,1 ou 1 μ M DHMC apresentaram um aumento do corpo celular, acompanhado de aumento e espessamento dos processos celulares; parte da celular tratadas com 10 ou 100 μ M, apresentaram uma forma atípica de losango, revelando uma perda da morfologia característica; a DHMC a 500 μ M induziu uma diminuição do corpo celular e retração dos processos. Modificações na expressão da GFAP, proteína majoritária do citoesqueleto de astrócitos, induzidas pela MCT ou pela DHMC, foram verificadas por marcação imunocitoquímica (ICQ) e por western blot, especialmente após 72h de tratamento: a MCT induziu, de forma dose dependente, uma modificação na distribuição da GFAP, que ficou mais localiza na região peri-nuclear, e uma redução de cerca de 40% nos níveis de

expressão dessa proteína em todas as concentrações testadas, quando comparado às células não tratadas ou em presença do veículo DMSO (0,5%); baixas concentrações de DHMC (0,1 ou 1 μ M) induziram um aumento qualitativo da marcação da GFAP, com aumento do corpo celular e uma forte tendência em formar processos, acompanhado de um aumento dos níveis de expressão desta proteína (22-40%); estas modificações também foram evidenciadas a 10 ou 100 μ M DHMCT, entretanto uma maior proporção de células (60-70%) apresentaram uma marcação fraca desta proteína, mais restrita à região peri-nuclear; astrócitos expostos a 500 μ M DHMCT apresentam uma diminuição qualitativa na marcação da GFAP, que apresentou-se difusa no corpo celular, estando mais forte somente em algumas poucas células (\pm 15%) com processos celulares; e uma grande redução (50%) nos níveis de expressão da GFAP após 72 h de tratamento com 10, 100 ou 500 μ M DHMC também foi observada. A coloração da cromatina nuclear com Hoechst-33258 revelou que a presença de astrócitos com núcleos picnóticos ou múltiplos nas culturas tratadas com 100-500 μ M MCT. Por outro lado, uma proporção importante (\pm 30%) dos astrócitos nas culturas expostas a 100 ou 500 μ M DHMC, apresentaram cromatina condensada e fragmentada, o que pode ser um indicativo de apoptose. Uma redução significativa (\pm 20%) na expressão de GFAP e na viabilidade das células após 72h nos controles tratados 1% DMF foi também observada o que sugere que o veículo de dissolução da DHMC pode ter amplificado os efeitos observados. Os resultados obtidos neste estudo sugerem uma ação direta da MCT e da DHMCT em astrócitos corticais de ratos, induzindo ou uma gliose reacional ou uma diminuição da viabilidade das células, e ainda que estes compostos podem estar envolvido nos quadros de intoxicação por crotalarias. Estudos complementares, no entanto, deverão ser desenvolvidos para esclarecer sobre como estes efeitos são desencadeados em astrócitos e sua possível relação com os danos no SNC observados e com aparecimento de sinais clínicos em animais intoxicados.

Palavras-chave: astrócitos, monocrotalina, glia, alcalóides pirrolizidínicos

BARRETO, RA. **Comparison of the *in vitro* effects of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, and dehydromonocrotaline on rat astrocyte primary culture.** Salvador, Bahia, 2005. 80p. Dissertation (Master of Science in Tropical Veterinary Medicine) - School of Veterinary Medicine, Federal University of Bahia, 2005.

SUMMARY

Monocrotaline (MCT) is a pyrrolizidine alkaloid (PA) of large occurrence in plants of *Crotalaria* genus (leguminosae) and causes intoxication in humans and mainly in animals. This alkaloid, after activation by enzymes from cytochrome P450 complex, primarily produces hepatotoxic effects. However, more susceptible animals to its intoxication, such as horses, may present nervous clinical signs. Dehydromonocrotaline (DHMC) is the main active metabolite of MCT, and this compound has already been dosed in the CNS of experimentally intoxicated rats. In this study we discussed the main toxicological aspect of MCT, and we compared the direct *in vitro* effects of MCT, extracted from *C. retusa*, and of DHMC on astrocyte primary culture. Concentrations ranging from 0.1 to 500 μM of MCT and DHMC were tested by 24 and 72 h. According to the MTT test, MCT was not toxic to astrocytes. On the other hand, DHMC was toxic to these cells above 1 μM since 24 h, increasing this toxicity to all concentration tested for 72 h in a dose dependent manner. The Rosenfeld stain showed that astrocytes treated with 0.1 μM MCT for 72 h shrank their cell body and developed thin extending processes of different sizes; this effect was amplified with an increase of MCT concentration and reached about 80% of the cells treated with 500 μM MCT. Cells exposed to DHMC also changed their morphology: about 30% of astrocytes treated with 0.1 or 1 μM DHMC showed an enlargement of cell body and extending processes; some of the cells treated with 0.1 or 1 μM DHMC lost the characteristic astrocyte morphology; 500 μM DHMC induced a shrink of cell body and its extending processes. Changes in expression of the astrocyte cytoskeleton protein GFAP were observed by immunocytochemistry and by western immunoblot, specially after 72h of treatment: MCT induced, in a dose-dependent manner, changes in GFAP distribution, occurring closer to the nuclei, and decreased approximately 40% of its GFAP expression in all ranging concentration when compared to non-treated cells or control condition (0.5% DMSO); low concentrations of DHMC (0.1 or 1 μM) induced a qualitative increase in GFAP stain, with an enlargement of cell body and a strong tendency on forming extending processes, along

with an increase in the expression levels of this protein (22-40%); these alterations were also observed at 10 or 100 μM DHMC, although a greater proportion of cells (60-70%) presented a weak stain of this protein, restricted to the area closer of nuclei; astrocytes exposed to 500 μM DHMC presented a qualitative decrease in GFAP stain, distributed over the cell body but stronger in few cells ($\pm 15\%$) with extending processes; a strong decrease ($\pm 50\%$) in GFAP expression levels was also observed on astrocytes after exposure to 10, 100 or 500 μM DHMC. The nuclear chromatin stain by Hoechst-33258 dye revealed condensed or multiple nuclei in astrocytes treated with 100-500 μM MCT. On the other hand, an important proportion ($\pm 30\%$) of astrocytes exposed to 100 or 500 μM DHMC, showed a condensed and fragmented chromatin, which may be an indicative of apoptosis. A marked decrease ($\pm 20\%$) in GFAP expression and viability of cells exposed to 1 % DMF was also observed after 72 h exposure, which may suggest that the DHMC vehicle may have been amplifying the observed effects. Our results suggests a direct action of the alkaloids MCT and DHMC on cortical rat astrocytes, inducing or a reactive gliosis or a decrease in cell viability. Moreover, these compounds may be directly involved in the neurological clinical signs sometimes showed by *Crotalaria* intoxication. However, complementary studies must be developed to turn clear how these effects are triggered on astrocytes and if there is any relation between the damages observed in CNS and the developing of neurological clinical signs in intoxicated animals.

Keywords: astrocytes, monocrotaline, glia, pyrrolizidine alkaloid

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Gênero *Crotalaria* pertence à família Leguminosae e compreende cerca de 600 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo a maioria tóxica para humanos e animais (WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987). No Brasil já foi relatada a ocorrência de aproximadamente 40 espécies de *Crotalaria*, que são popularmente conhecidas como xique-xique ou guizo-de-cascavel (TOKARNIA et al, 2000). Por serem invasoras, essas plantas são facilmente encontradas em plantações de grãos e em pastagens, sendo muitas vezes consumidas pelos animais nos períodos de escassez de alimentos (HOEHNE, 1939; TOKARNIA et al, 2000), podendo causar perdas econômicas devido a intoxicação do gado (MATTOCKS, 1986). Outro fator de risco à saúde pública deve-se à exposição da população humana a essas plantas através da medicina popular (ATAL & SAWHNEY, 1973).

A causa primária de intoxicação por plantas do gênero *Crotalaria* está na ingestão de suas sementes, sementes estas que, muitas vezes, contaminam safras de grãos, constituindo assim um problema de saúde animal e humana, principalmente em países em desenvolvimento (STEGELMEIER et al., 1999). A intoxicação por crotalárias normalmente é expressa como uma doença crônica, onde os sinais clínicos geralmente ocorrem semanas a meses após a planta ter sido ingerida (SHUBAT et al., 1989; CHEEKE, 1998), entretanto existe uma grande diferença na susceptibilidade à intoxicação entre as espécies animais. Espécies mais sensíveis à intoxicação por *Crotalaria*, como os equinos, quando intoxicados apresentam um quadro clínico de mal estado geral, anorexia, atordoamento, ataxia, irritabilidade, bocejos, espasmos musculares, cabeça baixa, agressividade, galope ou marcha sem rumo (GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 2004). Os achados de necrópsia são característicos de uma doença hepática crônica, onde o fígado encontra-se com uma consistência firme, podendo estar com o volume aumentado ou diminuído e apresentando um aspecto mosqueado (GIBBONS et al., 1953; GARDINER et al., 1965; SHUBAT et al., 1989).

Alcalóides pirrolizidínicos (AP) são as principais fitotoxinas que acometem doenças em humanos e animais e são os principais componentes farmacologicamente ativos nas espécies de *Crotalaria* (MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1990). Esses compostos constituem um grande grupo de moléculas de caráter básico que contêm nitrogênio em sua estrutura, normalmente formando um anel heterocíclico, o núcleo pirrolizidínico, e são amplamente disseminados tanto geograficamente quanto botanicamente (McLEAN, 1970; CHEEKE & SHULL, 1985; PRAKASH et al., 1999).

Muitos desses alcalóides são hepatotóxicos, entretanto alguns apresentam efeitos pneumotóxicos, neurotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos entre as mais diversas espécies animais (CHEEKE, 1998; PRAKASH et al., 1999, YAN & HUXTABLE, 1995). Postula-se que para exercerem os efeitos tóxicos, os AP necessitam ser ativados pelo sistema enzimático citocromo P450 dos hepatócitos, que ativam esses compostos a dehidroalcalóides ou pirróis (MATTOCKS, 1986). Esses compostos, por sua vez, funcionam como agentes alquilantes de macromoléculas celulares, formando adutos que iniciam uma toxicidade aguda ou crônica (CULVENOR et al., 1962).

A monocrotalina (MCT) é o principal AP encontrado nas plantas do gênero *Crotalaria*, sendo originariamente isolada por NEAL e colaboradores (1935) a partir de sementes de *Crotalaria sericea* e posteriormente isolada de sementes de *C. retusa* por ADAMS & ROGER (1939), onde ocorre nas mais altas concentrações, podendo chegar a até 12% (KUMARI et al., 1966). Embora seja um alcalóide primariamente hepatotóxico, lesões pulmonares são as primeiras alterações encontradas, no entanto, efeitos nefrotóxicos, cardiotóxicos, fetotóxicos e carcinogênicos também estão relacionados a esse alcalóide (MATTOCKS, 1986; THOMAS et al., 1996; RIBEIRO et al., 1993; CHEEKE, 1998; MEDEIROS et al., 2000).

A MCT é ativada no fígado pelo citocromo P450 família 3A (CYP 3A) a seu principal metabólito tóxico, a dehidromonocrotalina (DHMC) (COUET et al., 1996, KASAHARA et al., 1997). Como a maioria dos pirróis derivados de AP, a DHMC possui dois sítios eletrofilicos, agindo como um agente alquilante bifuncional capaz de fazer ligações covalentes do tipo DNA-DNA ou DNA-proteína (HINCKS et al., 1991; KIM et al., 1995, PEREIRA et al., 1998)

Eqüinos intoxicados com MCT, muitas vezes, apresentam sinais clínicos nervosos, o que tem sido associado a um quadro de encefalopatia hepática devido à impossibilidade de metabolização da uréia (CHEEKE, 1998). Por outro lado, metabólitos da MCT, como a DHMC, já foram encontrados e dosados em cérebros de ratos experimentalmente intoxicados, o que demonstra a capacidade dessas moléculas em atravessar a barreira hemato-encefálica (YAN & HUXTABLE, 1995).

Existem duas classes de células no sistema nervoso central (SNC): os neurônios e as células da glia. As células gliais, dentre outras funções, estão envolvidas principalmente nos fenômenos de detoxificação do SNC, manutenção da homeostasia e regulação dos níveis de pH. Essas células podem ser divididas em três grupos: a macroglia, da qual fazem parte os astrócitos e oligodendrócitos; a microglia; e as células endimárias. Os astrócitos estão envolvidos no

metabolismo cerebral, contribuindo ativamente para o aporte energético e para a resposta imune no SNC, representando cerca de metade de toda a população glial, enquanto os oligodendrócitos estão envolvidos na produção da bainha de mielina dos neurônios. A microglia por sua vez, é considerada um grupo de fagócitos mononucleares, representando a primeira linha de defesa contra injúrias. (RAINE, 1999, KANDEL, 2000). Após danos no SNC, os astrócitos reagem principalmente com hiperplasia, hipertrofia, acúmulo de glicogênio e desenvolvimento de fibrose pelo aumento da expressão da GFAP, sendo este fenômeno conhecido como gliose (ASCHNER, 1998).

Tendo em vista que células de origem glial podem ser facilmente acessíveis e manipuláveis, estas podem ser cultivadas como linhagens celulares e constituem modelos alternativos confiáveis para o estudo de propriedades e da resposta dessas células a agentes externos (LAL et al., 1996). Culturas primárias de astrócitos também podem ser utilizadas como modelos alternativos confiáveis em estudos sobre neurotoxicidade (COOCKSON et al., 1994), respostas imunomediadas do SNC (ASCHNER, 1998) e condições neurodegenerativas (VERNADAKIS & FLEICHER-LAMBROPOULOS, 2000).

Até o presente momento nenhum estudo foi realizado para avaliar a ação direta da monocrotalina ou do seu derivado pirrólico em células do SNC. Tendo em vista as propriedades farmacológicas desse alcalóide e do seu metabólito, e, devido à estreita relação entre a sua intoxicação e a presença de sinais clínicos neurológicos em espécies mais sensíveis, tornou-se importante avaliar seus efeitos diretos sobre células gliais. Neste estudo, avaliamos os efeitos diretos da MCT extraída da *Crotalaria retusa* e da DHMC em astrócitos, utilizando como modelo de estudo cultura primária de astrócitos corticais de ratos neonatos da linhagem Wistar. Foram avaliadas as propriedades citotóxicas dessas moléculas através de modificações morfológicas e bioquímicas observadas nas células gliais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A toxicologia do gênero *Crotalaria*

2.1.1- Característica e distribuição de plantas do gênero *Crotalaria*

As plantas do gênero *Crotalaria* pertencem à família Leguminosae (Fabaceae), e consistem em, aproximadamente, 600 espécies distribuídas principalmente em áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo a maioria tóxica para humanos e animais (WILLIAM & MOLYNEUX, 1987). Muitas plantas desse gênero são herbáceas (Figura 1), anuais ou perenes, havendo também espécies arbustivas. Como característica de reconhecimento, deve-se observar os frutos, os quais constituem-se de uma vagem quase vesiculosa, de casca membranácea rígida, nas quais as sementes, depois de maduras e secas, soltam-se quando movimentadas, produzindo assim um ruído de guizo de cascavel (*Crotalus*), razão pela qual lhe deram esse nome, pois *Crotalaria* em latim significa chocalho. As flores geralmente são amarelas, às vezes estriadas com vermelho, dispostas em ráceros vistosos. Outros nomes dados ao gênero são "xique-xique", "guizo-de-cascavel" e "chocalho-de-cascavel" (HOEHNE, 1939; TOKARNIA et al., 2000, <http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/leguminosas/crotalaria.html>).

As espécies de crotalárias são plantas rústicas que crescem bem em solos secos, arenosos, cascalhentos e mesmo em áreas arenosas de região costeira. Por serem plantas invasoras, são comumente encontradas em plantações de grãos e pastagens (CHEEKE, 1988). No Brasil, já foram descritas 40 espécies, presentes nos campos e bordas de pastos, servindo muitas vezes de suplemento alimentar para os animais no período de escassez de alimentos (HOEHNE, 1939; RIBEIRO et al., 1993;). Como forma de controle, podem ser praticamente eliminadas com roçadeira (rebrotam pouco), antes que formem sementes, as quais são os mecanismos de propagação. A planta morre na queimada, mas retorna por semente, que germina melhor após o fogo, já que a plântula encontra condições mais favoráveis na pastagem rala (<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/livros/plantastoxicas/19guizo.html>).

As crotalárias são principalmente usadas na adubação verde e cobertura de solos, pois além do alto potencial de produção de matéria seca, são plantas pouco exigentes que possuem grande potencial de fixação biológica de nitrogênio através de nódulos que formam em suas raízes em associação

A**B**

Figura 1 - A *Crotalaria retusa*

A: Vista da planta com flores ou frutos

(Fonte: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/212700.htm>);

B: Detalhe das vagens e flores da *Crotalaria retusa*

(Fonte: <http://www.grapheus.com/Plants/Plants-Crotalaria.htm>).

com bactérias do gênero *Rhizobium*, eficientes fixadoras do nitrogênio atmosférico (MENDONÇA et al., 1999). Entretanto, estudos mostram haver diferenças interespecíficas entre espécies de *Crotalaria* no que se refere à germinação, formação de nódulos na raiz, produção de matéria seca e captação de nitrogênio do ar (POLHIL 1982; DAIMON et al., 1995). Para a *C. juncea*, uma espécie de crescimento rápido muito usada como adubo verde em rotação com diversas culturas e no enriquecimento do solo, o aporte de nitrogênio ao sistema solo/planta fica estimado entre 100 e 300 kg N/ha/ano (<http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/leguminosas/crotalaria.html>). SAMBA e colaboradores (2002) relatam que o aporte de nitrogênio para a *C. retusa*, é de cerca de 250 Kg N/ha/ano.

2.1.2- Toxicidade das espécies de *Crotalaria*

Plantas do gênero *Crotalaria* também são de grande interesse devido às perdas econômicas causadas por intoxicação do gado e à exposição da população humana, que usa muitas dessas plantas na medicina popular. Algumas espécies de crotalárias são usadas em áreas rurais de países tropicais e subtropicais para tratamento de resfriados, febre, dores reumáticas e distúrbios estomacais (ATAL & SAWHNEY, 1973). De um modo geral, a toxicidade de plantas está associada ao consumo das folhas; no entanto, o mesmo não é observado para a *Crotalaria*, cuja causa primária de intoxicação é devido à ingestão de sementes. A contaminação de grãos como trigo, sorgo, café, com sementes de crotalárias, continua a ser um problema de saúde animal e humana principalmente em países em desenvolvimento (STEGELMEIER et al., 1999), a exemplo do ocorrido na Índia e Afeganistão no início dos anos 70, quando centenas de pessoas morreram devido a um surto de doença veno-oclusiva relacionado à ingestão de grãos contaminados com sementes de *Crotalaria retusa* (MATTOCKS, 1986).

Estudos realizados em diversos países descrevem casos de intoxicação por *Crotalaria* em equinos (GIBBONS et al., 1953; GARDINER et al., 1965; ARZT & MOUNT, 1999; PITT & MCKENZIE, 2002), bovinos (BARRI & ADAM, 1981; WINTER et al., 1990), suínos (PECKHAM et al. 1974; McGRATH & DUNCAN, 1975), caprinos (BARRI & ADAM, 1984) e aves (HOOPER & SCALAN, 1977; NORTON & O'ROURKE, 1979; ALFONSO ET AL, 1993). Segundo BARRI & ADAM (1981), as variedades tóxicas mais conhecidas são *Crotalaria retusa*, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria crispata*, *Crotalaria dura* e *Crotalaria globifera*.

No Brasil, durante a década de 1990, foram descritos casos de intoxicação espontânea em animais por *Crotalaria* spp em diferentes estados brasileiros. No Estado de Minas Gerais, foi descrito um surto de intoxicação em eqüinos por *C. juncea* (NOBRE et al., 1994). No Mato Grosso do Sul e em Minas Gerais, foram descritas intoxicações por *Crotalaria* spp em bovinos (LEMOS & BARROS, 1998) e, na Paraíba, foram documentados casos de intoxicação por *C. retusa* em ovinos (DANTAS et al., 1999), eqüídeos e bovinos (NOBRE et al., 2004). Na tentativa de caracterizar a doença, intoxicações experimentais também têm sido reproduzidas no Brasil com *C. anagiroides* em bovinos (TOKARNIA & DÖBEREINER, 1983), com *C. spectabilis* em murinos e caprinos (MEDEIROS et al., 1994) e com *C. spectabilis* em suínos (SOUZA et al., 1997, TORRES et al., 1997).

A doença crônica é a forma usual da intoxicação e os sinais clínicos ocorrem semanas a meses após a planta ter sido ingerida. (SHUBAT et al., 1989; CHEEKE, 1998). No entanto, existe uma grande diferença de susceptibilidade à intoxicação por crotalárias entre as espécies animais. Eqüinos intoxicados por *Crotalaria retusa* apresentam um quadro clínico de anorexia, atordoamento, mal estado geral, irritabilidade, bocejos, espasmos musculares, perda da coordenação, cabeça baixa, agressividade e galope sem rumo (GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 2004) (Figura 2), sendo esta possivelmente a espécie animal mais sensível. Um quadro de sintomatologia semelhante foi também relatado na intoxicação de eqüinos por outras espécies de *Crotalaria* (ROSE et al, 1957; ARZT & MOUNT, 1999; PITT & MCKENZIE, 2002).

Os achados de necropsia são característicos de uma doença hepática crônica, e danos hepáticos semelhantes à cirrose são características do envenenamento por *Crotalaria* em eqüinos e bovinos. O fígado encontra-se firme, aumentado ou diminuído de volume e com aspecto mosqueado (GIBBONS et al., 1953; GARDINER et al., 1965; SHUBAT et al., 1989; NOBRE et al., 1994; ARZT & MOUNT, 1999). Nos pulmões, as principais alterações observadas são edema e congestão com áreas consolidadas no parênquima (GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 1994).

Histologicamente, as principais alterações descritas são observadas no fígado e incluem hepatomegalocitose, fibrose, necrose, vacuolização de hepatócitos, hemorragia e, em alguns casos, proliferação de ductos biliares (GIBBONS et al., 1953; GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 1994; ARZT & MOUNT, 1999). Os pulmões podem apresentar alveolite fibrosante difusa, com espessamento de septos interalveolares, edema e infiltrado inflamatório mononuclear e, principalmente, macrófagos pigmentados (GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 1994).

A**B**

Figura 2 - **A**: Equino mostrando protusão da língua causada por lesões no núcleo do XII par craniano devido intoxicação por *C. retusa*; **B**: Equino com depressão pressionando a cabeça contra obstáculos (Fonte: Nobre et al., 2004).

2.1.3- Alcalóides pirrolizidínicos: componentes farmacologicamente ativos nas espécies de *Crotalaria*

2.1.3.1- Características químicas e biológicas dos alcalóides pirrolizidínicos

Os alcalóides pirrolizidínicos (AP) são a maior classe de toxinas derivadas de plantas que acometem humanos e animais (MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1990) e constituem um grande grupo de moléculas de caráter básico que contém nitrogênio (N) em sua estrutura, normalmente formando um anel heterocíclico, o núcleo pirrolizidínico. Esses alcalóides são normalmente amargos ao paladar, farmacologicamente ativos e funcionam como defesa química das plantas contra herbívoros (CHEEKE & SHULL, 1985; PRAKASH et al., 1999). Os AP são amplamente disseminados em todo o mundo, tanto geograficamente quanto botanicamente (McLEAN, 1970; MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1989) e, atualmente, são conhecidos cerca de 350 dos mesmos, identificados em 6.000 espécies de plantas de até 13 famílias. Estima-se que até 3% das plantas que florescem apresentam AP tóxicos (STEGELMEIER et al., 1999). As principais fontes são plantas das Famílias Boraginaceae (todos os gêneros), Compositae (subfamílias Senecionae e Eupatoriae) e Leguminosae (Gênero *Crotalaria*). Dentre essas Famílias, os AP são encontrados principalmente nas espécies *Senecio* (Compositae), *Heliotropium* (Boraginaceae) e *Crotalaria* (Leguminosae) (PRAKASH et al., 1999).

Os AP causam inúmeros problemas de saúde devido à sua ingestão por uso medicinal, alimentar ou acidental. Gêneros alimentícios humanos tais como leite, mel, grãos, ervas medicinais e suplementos alimentares, muitas vezes, estão contaminados com AP ou por sementes de plantas que os contém (HUXTABLE, 1980; MOLYNEUX & JAMES, 1990; BETZ et al., 1994; PRAKASH et al., 1999; STEENKAMP et al., 2000). Estudos mostram que AP também podem ser encontrados em leite de vaca (DICKINSON et al., 1976) e de cabras (GOEGER et al., 1982), o que representa um risco ainda pouco avaliado à saúde humana.

Muitos destes alcalóides são hepatotóxicos e muitos outros são pneumotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, fetotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (CHEEKE, 1998; PRAKASH et al., 1999, YAN & HUXTABLE, 1995; RIBEIRO et al., 1993). De acordo com CHEEKE (1988), a toxicidade dos AP está relacionada com a sua estrutura, onde núcleos diésteres cíclicos são os mais tóxicos,

diésteres não-cíclicos são de toxicidade intermediária e monoésteres são os menos tóxicos. AP hepatotóxicos possuem uma dupla ligação na posição 1 e 2 e uma cadeia lateral esterificada. Uma inibição da proliferação de diversos tipos de células expostas a AP, tais como células endoteliais arteriais e epiteliais renais de bovino, tem sido descrita tanto *in vivo* quanto *in vitro*, muitas vezes acompanhada de megalocitose, que é definida pelo gigantismo nuclear e citoplasmático, o que se postula estar relacionado a uma ação antimitótica (MATTOCKS, 1986; KIM et al., 1993; THOMAS et al., 1996; TAYLOR et al., 1997; LAPPIN et al., 1998).

2.1.3.2- Metabolismo dos alcalóides pirrolizidínicos

Tem-se postulado que o AP em si é quimicamente inerte, sendo que, uma vez ingerido, a maior parte dele é excretada inalterada e a parte remanescente é metabolizada no fígado principalmente pelos hepatócitos da região centro-lobular (zona 3), onde ocorre a mais alta atividade metabolizadora de xenobióticos (CHEEKE, 1988). A ativação requer a oxidação (desidrogenação) catalisada pelas monoxigenases de função mista, os citocromos P450, que convertem os AP a dehidroalcalóides (ou pirróis). Em humanos, tanto a reação de ativação quanto, a formação de N-óxido, uma rota de detoxificação, são catalisadas pelos citocromos CYP 3A4 (MIRANDA et al., 1991), enquanto que, em ratos, parece não haver correlação entre esses metabólitos e a enzima específica, sugerindo reações independentes (MATTOCKS, 1986). CULVENOR e colaboradores (1962) propuseram que a alquilação de componentes celulares é o mecanismo pelo qual estas moléculas exercem seus efeitos, fato já demonstrado em trabalhos posteriores. Essas moléculas, por sua vez, por serem eletrofílicas (com carência de elétrons), têm a capacidade de reagir com componentes nucleofílicos (com excesso de elétrons) dos tecidos, tais como ácidos nucleicos e proteínas, formando adutos capazes de iniciar uma toxicidade aguda ou crônica. (MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1989; HINCKS et al., 1991; PEREIRA et al., 1998). Alguns adutos destes alcalóides são persistentes no tecido animal, porém outros podem ser liberados tardiamente, causando danos após um longo tempo da ingestão inicial (WILLIAM & MOLYNEUX, 1987; PRAKASH et al., 1999).

As diferenças na resistência à intoxicação, entre as espécies já observadas, parecem ser, primariamente, uma consequência da diferença do metabolismo hepático dos AP. Espécies susceptíveis como eqüinos, bovinos e murinos apresentam altas taxas de produção de pirróis, enquanto que pequenos herbívoros como ovinos, caprinos e coelhos são altamente resistentes, o que

pode estar relacionado com baixa taxa de produção de metabólitos reativos ou à alta taxa de atividade de enzimas detoxificantes (CHEEKE, 1988).

Os pirróis têm quatro caminhos possíveis para metabolismo posterior à absorção: hidrólise a 6,7-dihidro-7-hidroxi-1-hidroximetil-5H-pirrolizina (DHP), alquilação de macromoléculas celulares, conjugação com o glutathione (GSH) no fígado para formar 7-glutationil-6,7-dihidro-1-hidroximetil-5H-pirrolizina (GSDHP) ou liberação na circulação. A distribuição dos metabólitos por essas vias determina tanto o local no qual a toxicidade é expressa, quanto o grau da toxicidade (YAN & HUXTABLE, 1995) (Figura 3). Por exemplo, as decomposições a DHP e GSDHP que são produtos pouco tóxicos, quando comparados aos pirróis, podem ser consideradas como indicadores de detoxificações. Os pirróis, por sua vez, se liberados na corrente sanguínea, poderão reagir com a parede dos vasos, causando doenças veno-oclusivas, hipertrofia cardíaca direita, hipertensão arterial pulmonar, entre outros danos cardiovasculares.

Pirróis possuem afinidade pelo grupamento sulfidril (tiol), dessa forma, dietas suplementadas com o aminoácido cisteína têm mostrado alguma proteção contra a toxicose, devido ao estímulo da síntese de glutathione, representando uma via de eliminação (CHEEKE, 1988; YAN & HUXTABLE, 1995; COULOMBE et al., 1999).

2.1.3.3- A monocrotalina: principal componente ativo da *Crotalaria retusa*

As sementes da *Crotalaria*, em particular da *C. retusa*, são ricas em seu principal componente tóxico, o alcalóide pirrolizidínico monocrotalina (MCT) (ADAM & ROGER, 1939; CULVENOR & SMITH, 1957; ATAL & SAWHNEY, 1973). A MCT é um alcalóide pirrolizidínico diéster macrocíclico de 11 elementos com peso molecular de 325.36, cuja fórmula é $C_{16}H_{23}O_6N$. A MCT foi originariamente isolada por NEAL e colaboradores (1935) a partir de sementes de *Crotalaria sericea* e posteriormente isolada de sementes de *C. retusa* por ADAMS & ROGER (1939), onde ocorre nas mais altas concentrações, podendo chegar a até 12% (KUMARI et al., 1966). A MCT é considerada um alcalóide primariamente hepatotóxico, embora lesões pulmonares são as primeiras alterações encontradas (THOMAS et al., 1998). Efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, fetotóxicos e carcinogênicos também estão relacionados a esse alcalóide, além de apresentar uma atividade mutagênica e antitumoral *in vitro* em diversos tipos celulares (MATTOCKS, 1986; THOMAS et al., 1996; RIBEIRO et al., 1993; CHEEKE, 1998;

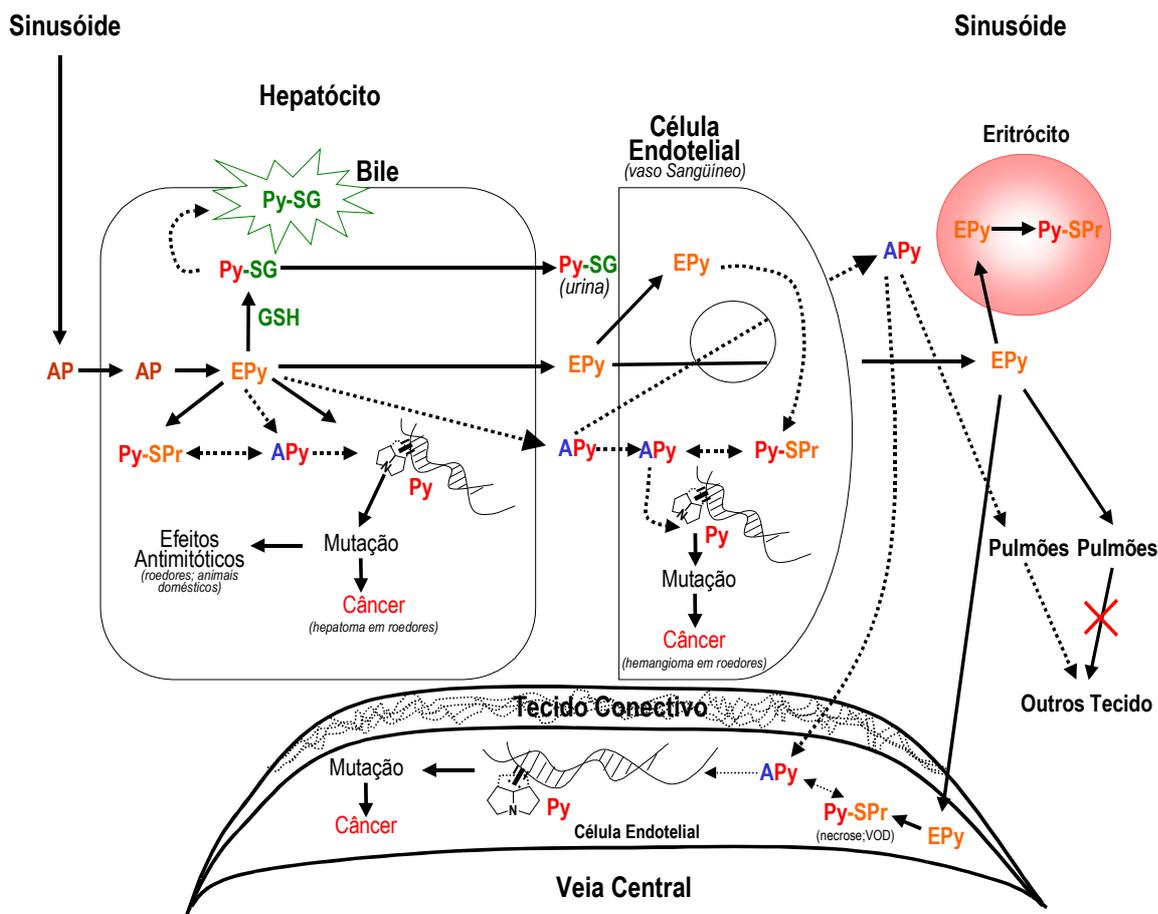


Figura 3- Representação esquemática dos mecanismos de toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos (AP): EPy, éster de pirrol; APy, álcool de pirrol; GSH, glutatión; Py-SG, conjugado pirrol-glutation; Py-SPr, pirrol ligado ao tiol de uma proteína. As linhas pontilhadas indicam que o Apy é um metabólito produzido em menor quantidade, responsável pelos efeitos crônicos, devido à sua baixa reatividade e meia-vida longa (Fonte: PRAKASH et al., 1999).

MEDEIROS et al., 2000). Equinos intoxicados com MCT, muitas vezes, apresentam sinais clínicos nervosos, o que tem sido associado a um quadro de encefalopatia hepática devido à impossibilidade de metabolização da uréia seguido de hiperamonemia. Por outro lado, metabólitos da MCT já foram encontrados e dosados em cérebros de ratos experimentalmente intoxicados, o que demonstra a capacidade destas moléculas em atravessar a barreira hemato-encefálica (YAN & HUXTABLE, 1995). Segundo WILLIAM & MOLYNEUX (1987), a dose letal mediana (DL 50) da MCT em ratos adultos é de 125 a 500 mg/Kg em aplicação intra-peritoneal.

A MCT é ativada no fígado, pelo citocromo P450 família 3A (CYP 3A), a seu principal metabólito tóxico, a dehidromonocrotalina (DHMC) (COUET et al., 1996, KASAHARA et al., 1997) (Figura 4). Em humanos tal reação dá-se mais precisamente pela ação do CYP 3A4 nos hepatócitos, enquanto que em ratos a reação é catalisada pelo CYP 3A1 (MIRANDA et al., 1991). Como a maioria dos pirróis derivados de AP, a DHMC possui dois sítios eletrofilicos, agindo como um agente alquilante bifuncional capaz de fazer ligações covalentes do tipo DNA-DNA ou DNA-proteína (HINCKS et al., 1991; KIM et al., 1995, PEREIRA et al., 1998). Estudos *in vitro* mostram que a DHMC induz formação de adutos com DNA, inibe a proliferação celular e causa alterações morfológicas, físicas e funcionais em células endoteliais arteriais pulmonares de suínos (REINDEL et al., 1991), humanos (WILSON et al., 2000) e células pulmonares de ratos (REINDEL & ROTH, 1991). Células endoteliais arteriais pulmonares de bovinos tratadas com DHMC por 48h respondem tornando-se megalocíticas, uma característica da toxicidade de AP (TAYLOR et al., 1997). LAPPIN e colaboradores (1998) demonstraram que a DHMC inibe a fase do ciclo celular G2-M em células endoteliais arteriais de bovino em concentração de 5 µg/ml, entretanto, THOMAS e colaboradores (1996) descrevem que, sob concentração de 20 µg/ml do pirrol, tais células sofrem inibição da mitose na fase S, bem como apoptose. A apoptose, ou morte celular programada, também tem sido um achado freqüente nesses tipos celulares expostos à MCT e seu derivado pirrólico, tanto *in vivo* (JONES & RABINOVITCH, 1996) quanto *in vitro* (THOMAS et al., 1998).

Estudos realizados previamente em nosso laboratório revelaram que células tumorais da linhagem GL-15 são capazes de reagir à MCT, sugerindo uma ação direta desta molécula em células de origem glial (BARRETO et al, 2004). As células gliomatosas reagiram de forma distinta conforme a concentração de MCT adotada: nas concentrações mais baixas, foi verificada uma modificação morfológica, com um aumento do corpo celular (megalocitose) e emissão de processos; nas concentrações mais altas, uma importante proporção das células entraram em apoptose.

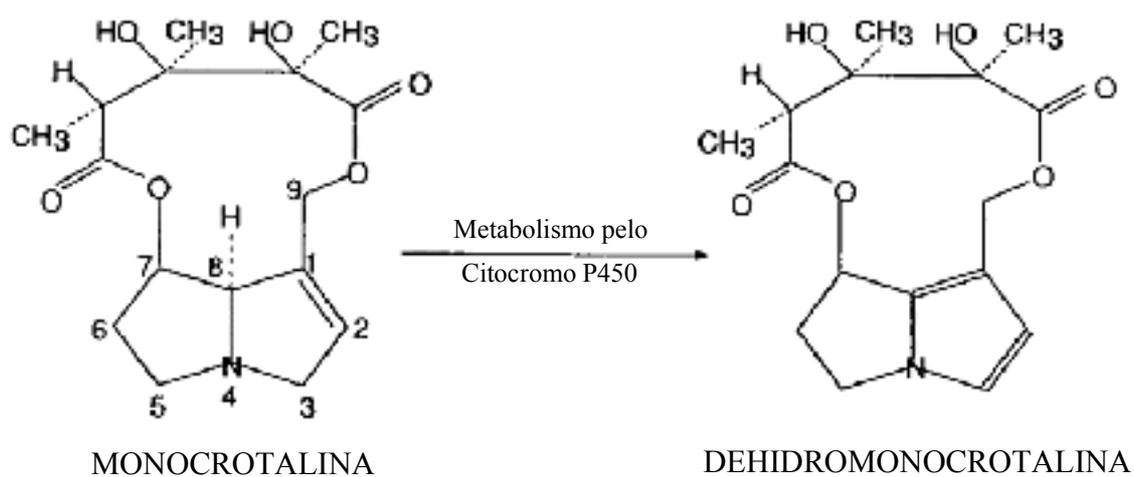


Figura 4 - Estrutura química do alcalóide pirrolizidímico monocrotalina e da dehidromonocrotalina, seu principal metabólito. Ativação pelo citocromo P450 (Fonte: Pereira et al., 1998).

2.2- As células gliais do SNC

O SNC é composto basicamente por duas classes principais de células: os neurônios e as células da glia ou neurógli. Os neurônios são distintos da glia pelos seus processos polarizados especializados, os axônios e dendritos, os quais podem propagar potenciais de ação, fazer junções sinápticas com outros neurônios e células e formar locais de liberação para neurotransmissores (MOREST & SILVER, 2003). Foi Virchow que, em 1846, primeiramente reconheceu no SNC a existência de um componente intersticial frágil, não-nervoso, composto de células estreladas ou fusiformes, morfologicamente distintas dos neurônios, a quem deu o nome de glia, que em latim significa "cola". Até início do século XX não se sabia que estes elementos intersticiais consistiam de diversos tipos celulares (PETERS et al., 1991).

De acordo com KANDEL (2000), as células gliais estão em número superior aos neurônios cerca de dez a cinquenta vezes no SNC de vertebrados, e circundam o corpo celular, axônio e dendritos dos mesmos, favorecendo a sinalização. Entretanto, não se pode afirmar se elas estão envolvidas no processo de transmissão do impulso nervoso. Sabe-se ainda que as células gliais estão envolvidas na captação do neurotransmissor excitatório glutamato da fenda sináptica e que apresentam outras funções vitais, tais como regulação do pH e balanços iônicos locais, sustentação dos neurônios, ou podem, ainda, separar e isolar grupos neuronais e conexões sinápticas umas das outras. Essas células são também importantes por serem capazes de fagocitar debris celulares após danos ou morte neuronal.

São reconhecidos três grupos extensos de células gliais: (i) as células gliais verdadeiras ou macroglia, das quais fazem parte os astrócitos e oligodendrócitos; (ii) a microglia; e (iii) as células ependimárias (Figura 5). A neurógli e as células ependimárias diferem dos neurônios por não possuírem axônios e dendritos, contatos sinápticos e, além disso, retêm a habilidade de dividirem-se no decorrer da vida, particularmente em resposta a injúrias (PETERS et al., 1991; MOREST & SILVER, 2003).

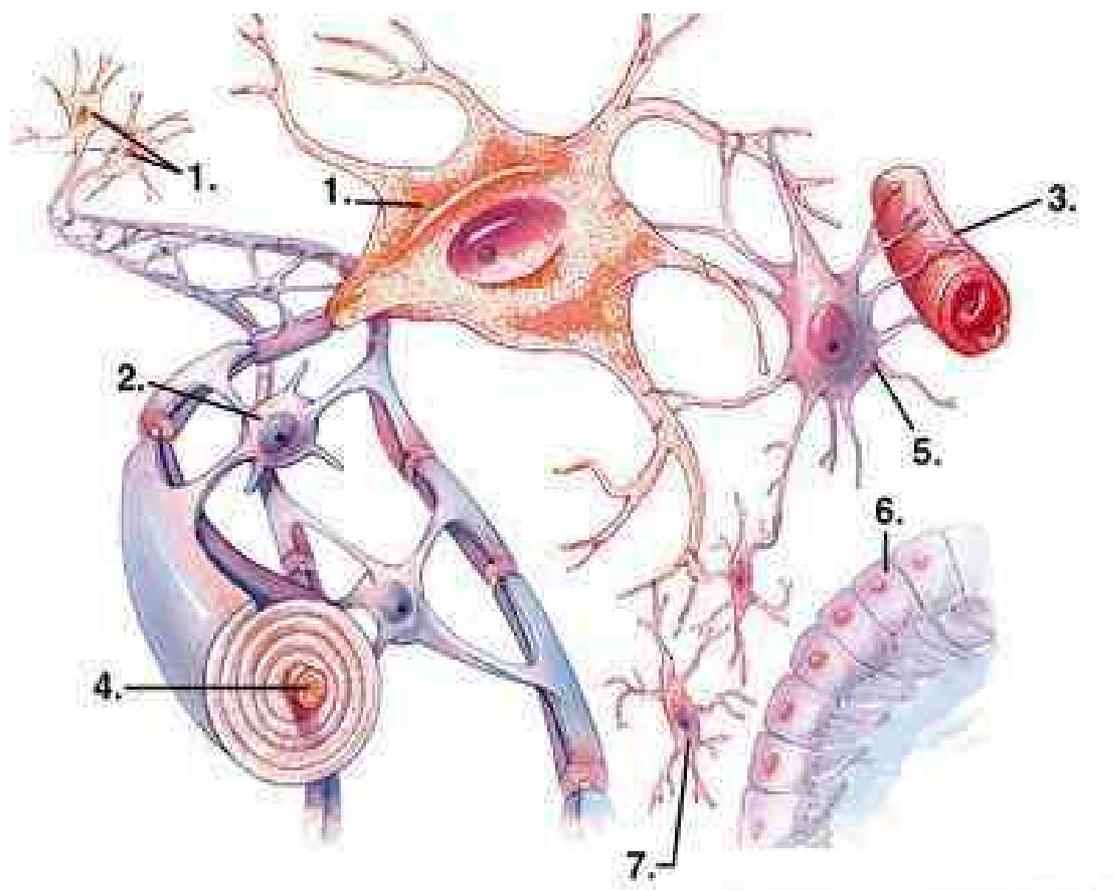


Figura 5 - Tipos de células do SNC : (1) neurônios; (2) oligodendrócitos; (3) capilar; (4) axônio (5) astrócito; (6) células endoteliais; (7) microglia.

Fonte: <http://www.mhhe.com/biosci/ap/holeessentials/student/olc/matching0298.html?q1=neuron>

2.2.1- Características e funções dos astrócitos: principal população de células gliais no SNC

As células gliais constituem cerca de 90% das células do cérebro humano e estas, particularmente os astrócitos, são importantes por fornecerem suporte nutricional e estrutural para neurônios e por participarem de outras funções, tais como detoxificação, fagocitose e funções imunes (TARDY, 1991; MONTGOMERY, 1994; KANDEL, 2000) (Figura 6).

Os astrócitos constituem cerca da metade de toda a população glial, e são geralmente denominados de astrócitos protoplasmáticos, presentes na substância cinzenta, e de astrócitos fibrosos, presentes na substância branca (KRIEGSTEIN & GÖTZ, 2003). Esta nomenclatura está baseada nas diferenças morfológicas, não se conhecendo diferenças funcionais marcantes entre esses dois subtipos celulares. Os componentes estruturais dos astrócitos protoplasmáticos e fibrosos são idênticos e as diferenças são apenas quantitativas (LENT, 2001).

De acordo com CAJAL (1995), os astrócitos possuem inúmeros prolongamentos que emergem do corpo celular e que ramificam-se profusamente, formando uma densa arborização. Esses prolongamentos ocupam os meandros dos espaços interneurais, envolvendo sinapses e nós de Ranvier onde capturam neurotransmissores na fenda sináptica através de transportadores específicos, ou outros produtos do fluido extracelular, o que constitui um dos principais mecanismos de detoxificação cerebral (CLEMENT et al., 1998; GARWOOD et al., 1999; COSTA et al., 2002; NADARAJAH, 2003). Os astrócitos formam também verdadeiras capas envoltórias dos capilares sanguíneos no SNC, constituindo revestimento interno da parede das cavidades intercerebrais e das meninges. Estas especializações morfológicas dos astrócitos formam a base física da barreira hemato-encefálica. A complexa conexão realizada pelos processos e corpos celulares dos astrócitos ressalta seu envolvimento e importância no metabolismo cerebral.

Além de suas características morfo-funcionais, os astrócitos maduros têm sido identificados mais recentemente pela expressão de uma proteína do filamento intermediário do citoesqueleto, que lhes é exclusiva, a chamada proteína ácida do gliofilamento, ou GFAP. Essa proteína do gliofilamento foi descoberta por Larry Eng há mais de 30 anos durante o estudo do curso de formação de placas em pacientes com esclerose múltipla e pode ser detectada através de anticorpos específicos (ENG et al., 2000). Segundo CAJAL (1995), os filamentos compostos pela GFAP são os responsáveis pela forma típica que estas células assumem, entretanto a função exata dessa proteína nos astrócitos

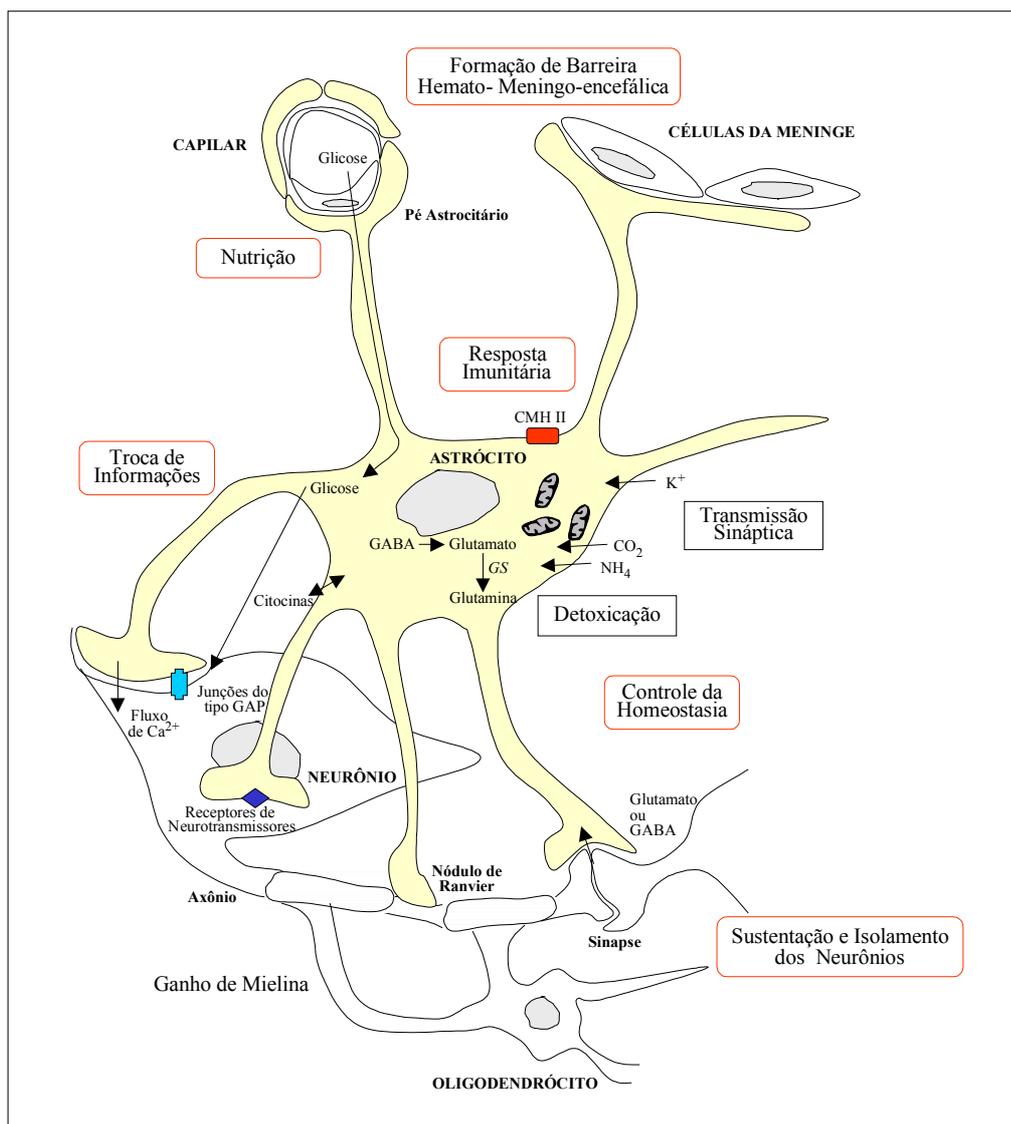


Figura 6 - Representação esquemática das diferentes funções dos astrócitos no SNC e de suas interações (Fonte: TARDY, 1991).

não é clara, já que camundongos geneticamente modificados para ausência de GFAP, crescem e se reproduzem normalmente (PEKONY et al., 1995).

Após danos no sistema nervoso, os astrócitos invariavelmente proliferam, sofrem extensiva hipertrofia do núcleo, do corpo e dos processos celulares e desenvolvem fibrose pelo aumento da expressão da GFAP, sendo este estado conhecido como gliose ou astrogliose reativa (MONTGOMERY, 1994; ASCHNER, 1998). Entretanto, esse processo não é estereotípico, podendo variar em extensão, tempo de desenvolvimento, grau de hipertrofia ou hiperplasia e outras propriedades, dependendo da natureza da lesão e da área específica afetada do SNC (MEAD & PENTREATH, 1998). Os tipos de assentamento e distribuição das novas fibras gliais variam de acordo com a natureza da lesão primária, podendo ser focal, nos casos em que a arquitetura básica do tecido é preservada, deixando uma cicatriz glial, ou pode ser uma resposta difusa, quando a arquitetura básica do tecido é destruída lentamente pelo processo patológico, formando uma malha distribuída ao acaso (JUBB & KENNEDY, 1974).

As inter-relações entre células neurais não só contribuem para o desenvolvimento, função e capacidade reparativa do cérebro, mas também podem participar na sua deterioração devido à senescência ou doença (DAVIES et al., 2000). Segundo RUTKA & SMITH (1993), os astrócitos podem reagir e proliferar após injúria cerebral e ter a mais alta predisposição à transformação maligna. Nos danos, bem como no desenvolvimento intacto do cérebro, o crescimento de axônios ocorre na presença de astrócitos, que servem-lhes como guia (CLEMENT et al., 1998; GARWOOD et al., 1999; COSTA et al., 2002; NADARAJAH, 2003).

2.2.2- Culturas de células gliais como modelos de estudos neurotoxicológicos

Segundo COOKSON e colaboradores (1994), astrócitos derivados do córtex de ratos ou de camundongos neonatos e cultivados *in vitro* constituem modelos confiáveis no estudo do potencial tóxico de compostos químicos. Estas culturas são utilizadas há décadas e derivam de ratos ou camundongos de até dois dias, sendo cultivadas em meio específico ao longo de 20 dias, quando adquirem sua forma característica, com densa arborização (BOOHER & SENSENBRENNER, 1972).

Modificações nos astrócitos podem ser usadas como marcadores para vários tipos de danos no SNC. Em particular, a gliose reativa ou astrogliose ocorre devido a danos físicos, exposição a substâncias tóxicas, tais como 5,7-dihidroxitriptamina (FRANKFURT et al., 1991) ou ácido caínico (RATABOUL et al., 1989), e também em alguns estágios de doença no SNC (NORTON et al., 1992). A astrogliose, entre outras alterações, é usualmente reconhecida *in vitro* pela hiperplasia e hipertrofia dos astrócitos, bem como pelo acúmulo do principal componente específico dos seus filamentos intermediários, a proteína GFAP (COOKSON & PENTREATH, 1994).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Comparação dos efeitos do alcalóide pirrolizidínico monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, e de seu derivado ativo dehidromonocrotalina em cultura primária de astrócitos corticais de rato.

Barreto RA, Hughes JB, Souza CS, Silva VDA, Silva AR, Velozo ES, Batatinha MJM, Costa MFD, Cunha SD, El-Bachá RS, Costa SL

RESUMO

Casos de intoxicações por plantas do gênero *Crotalaria* (Leguminosae) em humanos, e principalmente em animais, tem sido amplamente descritos, e geram principalmente lesões hepáticas, ainda que o comprometimento do SNC tenha sido também descrito em animais mais sensíveis, como equídeos. Esta toxicidade é atribuída ao alcalóide pirrolizidínico (AP) monocrotalina (MCT), que quando metabolizada pelos citocromos P450, gera o composto ativo dehidromonocrotalina (DHMC). Esse estudo objetivou comparar os efeitos diretos *in vitro* da MCT, extraída de *C. retusa*, e da DHMC, gerada por oxidação exógena, sobre cultura primária de astrócitos. Foram testadas concentrações entre 0,1 a 500 μ M da MCT e DHMC no período de 24 e 72h. O teste do MTT revelou que a MCT não mostrou toxicidade em astrócitos, porém a DHMC reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 1 μ M desde 24h, amplificando essa ação após 72h de tratamento. A coloração pancreômica de Rosenfeld permitiu evidenciar que os astrócitos tratados com 0,1 μ M MCT por 72h, apresentaram o corpo celular contraído e desenvolveram finos prolongamentos de tamanho variável; este efeito foi aumentado com o aumento da concentração de MCT, e verificado em até cerca de 80% das células tratadas com 500 μ M MCT. Células expostas a DHMC pôr 72h também alteraram sua morfologia: mais de 30% dos astrócitos tratados com 0,1 ou 1 μ M DHMC apresentaram um aumento do corpo celular, acompanhado de aumento e espessamento dos processos celulares; parte das células tratadas com 10 ou 100 μ M, apresentaram uma forma atípica de losango, revelando uma perda da morfologia característica; a DHMC a 500 μ M induziu uma diminuição do corpo celular e retração dos processos. Modificações na expressão da GFAP, proteína majoritária do citoesqueleto de astrócitos, induzidas pela MCT ou pela DHMC, foram verificadas por marcação imunocitoquímica (ICQ) e por western blot, especialmente após 72h de tratamento: a MCT induziu, de forma dose dependente, uma modificação na distribuição da GFAP,

que ficou mais localizada na região peri-nuclear, e uma redução de cerca de 40% nos níveis de expressão dessa proteína em todas as concentrações testadas, quando comparado às células não tratadas ou em presença do veículo DMSO (0,5%); baixas concentrações de DHMC (0,1 ou 1 μ M) induziram um aumento qualitativo da marcação da GFAP, com aumento do corpo celular e uma forte tendência em formar processos, acompanhado de um aumento dos níveis de expressão desta proteína (22-40%); estas modificações também foram evidenciadas a 10 ou 100 μ M DHMC, entretanto uma maior proporção de células (60-70%) apresentaram uma marcação fraca desta proteína, mais restrita à região peri-nuclear; astrócitos expostos a 500 μ M DHMC apresentam uma diminuição qualitativa na marcação da GFAP, que apresentou-se difusa no corpo celular, estando mais forte somente em algumas poucas células (\pm 15%) com processos celulares; e uma grande redução (50%) nos níveis de expressão da GFAP após 72 h de tratamento com 10, 100 ou 500 μ M DHMC também foi observada. A coloração da cromatina nuclear com Hoechst-33258 revelou a presença de astrócitos com núcleos picnóticos ou múltiplos nas culturas tratadas com 100-500 μ M MCT. Por outro lado, uma proporção importante (\pm 30%) dos astrócitos nas culturas expostas a 100 ou 500 μ M DHMC, apresentaram cromatina condensada e fragmentada, o que pode ser um indicativo de apoptose. Uma redução significativa (\pm 20%) na expressão de GFAP e na viabilidade das células após 72h nos controles tratados 1% DMF foi também observada o que sugere que o veículo de dissolução da DHMC pode ter amplificado os efeitos observados. Os resultados obtidos neste estudo sugerem uma ação direta da MCT e da DHMC em astrócitos corticais de ratos, induzindo ou uma gliose reacional ou uma diminuição da viabilidade das células, e ainda que estes compostos podem estar envolvidos nos quadros de intoxicação por crotalárias. Estudos complementares, no entanto, deverão ser desenvolvidos para esclarecer sobre como estes efeitos são desencadeados em astrócitos e sua possível relação com os danos no SNC observados e com aparecimento de sinais clínicos em animais intoxicados.

Palavras-chave: astrócitos, monocrotalina, glia, alcalóides pirrolizidínicos

Comparison of the effects of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, and of its active metabolite dehydromonocrotaline on rat cortical astrocyte primary culture.

Barreto RA, Hughes JB, Souza CS, Silva VDA, Silva AR, Velozo ES, Batatinha MJM, Costa MFD, Cunha SD, El-Bachá RS, Costa SL

SUMMARY

Monocrotaline (MCT) is a pyrrolizidine alkaloid (PA) of large occurrence in plants of *Crotalaria* genus (leguminosae) and causes intoxication in humans and mainly in animals. This alkaloid, after activation by enzymes from cytochrome P450 complex, primarily produces hepatotoxic effects. However, more susceptible animals to its intoxication, such as horses, may present nervous clinical signs. Dehydromonocrotaline (DHMC) is the main active metabolite of MCT, and this compound has already been dosed in the CNS of experimentally intoxicated rats. In this study we compared the direct *in vitro* effects of MCT, extracted from *C. retusa*, and of DHMC on astrocyte primary culture. Concentrations ranging from 0.1 to 500 μM of MCT and DHMC were tested by 24 and 72 h. According to the MTT test, MCT was not toxic to astrocytes. On the other hand, DHMC was toxic to these cells above 1 μM since 24 h, increasing this toxicity to all concentration tested for 72 h in a dose dependent manner. The Rosenfeld stain showed that astrocytes treated with 0.1 μM MCT for 72 h shrank their cell body and developed thin extending processes of different sizes; this effect was amplified with an increase of MCT concentration and reached about 80% of the cells treated with 500 μM MCT. Cells exposed to DHMC also changed their morphology: about 30% of astrocytes treated with 0.1 or 1 μM DHMC showed an enlargement of cell body and extending processes; some of the cells treated with 0.1 or 1 μM DHMC loosed the characteristic astrocyte morphology; 500 μM DHMC induced a shrank of cell body and its extending processes. Changes in expression of the astrocyte cytoskeleton protein GFAP were observed by immunocytochemistry and by western immunoblot, specially after 72h of treatment: MCT induced, in a dose-dependent manner, changes in GFAP distribution, occurring closer to the nuclei, and decreased approximately 40% of its GFAP expression in all ranging concentration when compared to non-treated cells or control condition (0.5% DMSO); low concentrations of DHMC (0.1 or 1 μM) induced a qualitative increase in GFAP stain, with an enlargement of cell body and a strong tendency on forming extending processes, along with an increase in the expression levels of this protein (22-40%); these alterations were also observed at 10 or 100 μM DHMC, although a greater proportion of cells (60-

70%) presented a weak stain of this protein, restricted to the area closer of nuclei; astrocytes exposed to 500 μ M DHMC presented a qualitative decrease in GFAP stain, distributed over the cell body but stronger in few cells ($\pm 15\%$) with extending processes; a strong decrease ($\pm 50\%$) in GFAP expression levels was also observed on astrocytes after exposure to 10, 100 or 500 μ M DHMC. The nuclear chromatin stain by Hoechst-33258 dye revealed condensed or multiple nuclei in astrocytes treated with 100-500 μ M.MCT. On the other hand, an important proportion ($\pm 30\%$) of astrocytes exposed to 100 or 500 μ M DHMC, showed a condensed and fragmented chromatin, which may be an indicative of apoptosis. A marked decrease ($\pm 20\%$) in GFAP expression and viability of cells exposed to 1 % DMF was also observed after 72 h exposure, which may suggest that the DHMC vehicle may have been amplifying the observed effects. Our results suggests a direct action of the alkaloids MCT and DHMC on cortical rat astrocytes, inducing or a reactive gliosis or a decrease in cell viability. Moreover, these compounds may be directly involved in the neurological clinical signs sometimes showed by *Crotalaria* intoxication. However, complementary studies must be developed to turn clear how these effects are triggered on astrocytes and if there is any relation between the damages observed in CNS and the developing of neurological clinical signs in intoxicated animals.

Keywords: astrocytes, monocrotaline, glia, pyrrolizidine alkaloid

INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Crotalaria* pertencem à família Leguminosae e crescem abundantemente em zonas tropicais e subtropicais. Por serem plantas invasoras, as Crotalárias são facilmente encontradas em plantações de grãos e em pastagens (CHEEKE, 1988). No Brasil já foram encontradas em torno de 40 espécies, sendo muitas vezes consumidas pelos animais principalmente nos períodos de escassez de alimentos (HOEHNE, 1939; TOKARNIA *et al*, 2000). Plantas do gênero *Crotalaria* também são de grande interesse devido às perdas econômicas causadas por intoxicação do gado e devido à exposição da população humana, que usa muitas dessas plantas na medicina popular (ATAL & SAWHNEY, 1973; MATTOCKS, 1986). Essas plantas são ricas em alcalóides pirrolizidínicos (AP), as principais toxinas derivadas de plantas que acometem humanos e animais (MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1990).

AP constituem um grande grupo de moléculas de caráter básico que contém nitrogênio em sua estrutura, normalmente formando um anel heterocíclico, o núcleo pirrolizidínico, e são amplamente disseminados tanto geograficamente quanto botanicamente (McLEAN, 1970; CHEEKE & SHULL, 1985; PRAKASH *et al.*, 1999). Muitos destes alcalóides são hepatotóxicos, e muitos outros são pneumotóxicos, neurotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (CHEEKE, 1998; PRAKASH *et al.*, 1999, YAN & HUXTABLE, 1995). Entretanto, postula-se que para exercerem os efeitos tóxicos, os AP necessitam ser ativados pelo sistema enzimático citocromo P450 dos hepatócitos, que ativam esses compostos aos chamados dehidroalcalóides ou pirróis (MATTOCKS, 1986). Esses compostos por sua vez funcionam como agentes alquilantes de macromoléculas celulares, formando adutos que iniciam uma toxicidade aguda ou crônica (CULVENOR *et al.*, 1962). A monocrotalina (MCT) é o principal AP encontrado nas plantas do gênero *Crotalaria*, e, embora seja um alcalóide primariamente hepatotóxico, efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, fetotóxicos e carcinogênicos também estão relacionados a esse alcalóide (MATTOCKS, 1986; THOMAS *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 1993; CHEEKE, 1998; MEDEIROS *et al.*, 2000). Equinos intoxicados com MCT muitas vezes apresentam sinais clínicos nervosos, o que tem sido associado a um quadro de encefalopatia hepática devido à impossibilidade de metabolização da uréia seguido de hiperamonemia. Por outro lado, metabólitos da MCT já foram encontrados e dosado em cérebros de ratos experimentalmente intoxicados, o que demonstra a capacidade destas moléculas em atravessar a barreira hemato-encefálica (YAN & HUXTABLE, 1995).

As células gliais, principalmente os astrócitos, são fundamentais para o desenvolvimento, homeostasia e detoxificação do SNC (LETOURNEL-BOULLAND et al., 1994). Além disso, estas células são conhecidas por suas funções de aporte energético e resposta imune no SNC contra agentes químicos, infecciosos ou traumatismos (ASCHNER, 1998). Já foi demonstrado que astrócitos reagem a danos químicos ou físicos por sofrerem ativação, um fenômeno conhecido como astrogliose (EDDLESTON & MUCKE, 1993; COOKSON & PENTREATH, 1994; LEFRANÇOIS et al., 1997; MEAD & PENTREATH, 1998; COSTA et al., 2002). Culturas primárias de astrócitos são largamente empregadas para avaliar suas funções em desordens do SNC (ASCHNER, 1998; SANFELIU et al., 1999), e astrócitos derivados do córtex de ratos ou de camundongos neonatos e cultivados *in vitro* constituem um modelo confiável para o estudo de propriedades e resposta a agentes externos (COOKSON et al., 1994).

Até o presente momento nenhum estudo foi realizado para avaliar a ação direta da monocrotalina ou do seu derivado pirrólico em células do SNC. Tendo em vista as propriedades farmacológicas desse alcalóide, e, devido à estreita relação entre a sua intoxicação e a presença de sinais clínicos neurológicos em espécies mais sensíveis, tornou-se importante avaliar seus efeitos diretos sobre células gliais. Neste estudo, avaliaram-se os efeitos diretos da MCT extraída de *Crotalaria retusa* e da DHMC, utilizando como modelo de estudo cultura primária de astrócitos obtidos a partir do córtex cerebral de ratos neonatos da linhagem Wistar. Foram avaliadas as propriedades citotóxicas dessa moléculas através de modificações morfológicas e bioquímicas observadas nas células gliais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da MCT e DHMC.

A MCT foi isolada a partir do extrato aquoso liofilizado de sementes de *crotalaria retusa* segundo método de CULVENOR & SMITH (1957) modificado, onde hexano foi utilizado no lugar de éter de petróleo e as possíveis formas N-óxido não foram convertidas à sua base livre. A obtenção da DHMC foi realizada através da técnica preconizada por MATTOCKS (1989). Brevemente, 20 mg do alcalóide foi pesado e dissolvido em 5 ml de clorofórmio. A essa solução adicionou-se então 5 ml de uma solução clorofórmica contendo 25 mg de tetracloro 1,2-bezoquinona (o-cloranil), o agente oxidante. Decorridos 2 minutos, essa mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos com 1 ml de uma solução resfriada de 70% de KOH e 2% de boridreto de sódio, sendo este último o agente redutor da reação. A fase orgânica foi então separada num funil de separação, e, após desidratação com sulfato de sódio (Na₂SO₄) e adsorção com carvão ativado, a fase clorofórmica foi recristalizada em rotavaporizador, resultando no dehidroalcalóide praticamente puro. A caracterização da MCT foi realizada por ressonância magnética nuclear do ¹³C e ¹H, além de espectro infravermelho. A DHMC foi confirmada por ressonância magnética nuclear do ¹H.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar neonatos, obtidos do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA). O procedimento esteve em acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Cultura Primária de Astrócitos e Tratamentos

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas de acordo com método de COOKSON & PENTREATH (1994) modificado. Ratos neonatos foram decapitados e seus hemisférios cerebrais foram expostos e isolados assepticamente. A paquimeninge e vasos sanguíneos foram retirados do córtex com auxílio de tesouras e pinças e, em seguida, este foi passado em uma membrana de Nitex estéril de 75µm φ. O córtex foi dissecado mecanicamente com uma tesoura e as células foram suspensas em meio Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 100 UI/ml penicilina G, 100 µg/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 0,011 g/L piruvato e 10% soro

fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY). As células foram semeadas em placas de cultura de poliestireno (Cultilab, SP, Brasil) de 35 mm ϕ a uma densidade inicial de 5×10^5 células/placa e de 100 mm ϕ à uma densidade de 3×10^6 células/placa, cultivadas em câmara úmida com 5% CO₂ a 37 °C ao longo de 15 dias. A cada 48 h o meio de cultura em mesmas condições foi trocado. Como determinado pela imunocitoquímica usando anticorpo anti-GFAP, mais de 95% das células da placa foram positivas para GFAP (GFAP⁽⁺⁾). A MCT foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) obtendo-se uma solução-mãe à concentração de 100 mM, conservada ao abrigo da luz à -20 °C. A DHMC foi obtida após reação acima descrita e dissolvida em dimetilformamida (DMF) na razão de 20 mg/ml pouco tempo antes do tratamento das células. Para o tratamento das células durante 24 e 72 h, a MCT e DHMC foram diluídas em meio de cultura suplementado em concentrações exponenciais finais entre 0,1 a 500 μ M, já que essas concentrações abrangem aquelas adotadas em outros estudos *in vitro* com AP, em outros sistemas celulares. O volume final de DMSO não ultrapassou 0,5% do volume final de meio de cultura, e o volume de DMF ficou em 1% do volume final do meio de cultura.

Avaliação da Citotoxicidade pelo teste do MTT

Após desenvolvimento, os astrócitos cultivados em placas de 100 mm ϕ foram replaqueados em placas de 96 poços, utilizando-se uma solução de tripsina (EC 3.4.21.4) 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, a uma densidade inicial de 2×10^4 células/placa de 96 poços. Após nova adesão às placas, estas células foram expostas à MCT e DHMC por 24 e 72 h, a fim de avaliar a citotoxicidade destas moléculas. Para avaliar a viabilidade celular foi realizado o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O teste do MTT (HANSEN et al., 1989) baseia-se no princípio da conversão do substrato amarelo pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas em cristais de formazan, de cor violácea. Três horas antes do término do tempo de exposição, o meio de cultura tratado contendo a MCT ou DHMC foi removido e substituído por uma solução de MTT (100 μ l/poço) a uma concentração final de 1 mg/ml diluído em DMEM sem suplementação (Sigma, St Louis, MO). Para a completa dissolução dos cristais de formazan, após as três horas em contato com o MTT, foi acrescido um volume de 100 μ l/poço de um tampão contendo 20% SDS, 50% DMF, pH 4,7, mantendo-se as placas por 12 h a 37 °C. A absorbância óptica de cada amostra foi medida usando um espectrofotômetro BIO-RAD 550PLUS em um comprimento de onda de 492 nm. Os experimentos foram realizados em no mínimo triplicata e os resultados apresentados como a porcentagem da viabilidade (média \pm desvio padrão) em relação ao controle.

Avaliação de alterações morfológicas

Imunocitoquímica e coloração pancrômica de Rosenfeld

Modificações morfológicas foram observadas analisando as células através da coloração de Rosenfeld e através de imunocitoquímica para a proteína majoritária do citoesqueleto de células maduras, a GFAP.

Todas as células, controle e tratadas, foram lavadas três vezes com PBS, fixadas e permeabilizadas com metanol gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. As células fixadas foram incubadas por 1 hora com anticorpo policlonal de coelho ou monoclonal de camundongo anti-GFAP (1/500 em PBS, Boehringer, Mannheim, Alemanha). Anticorpo conjugado com tetrametilrodamina isotiocianato de caprino anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo (Biomakor, 1/250 em PBS, Israel) foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ambos procedimentos sob agitação lenta. A integridade da cromatina ou a fragmentação/condensação nuclear foi analisada corando a cromatina das células fixadas com o corante fluorescente intercalante do DNA, Hoechst 33258 (Sigma, St Louis, MO). Uma solução de Hoechst 33258 foi preparada em PBS, a uma concentração final de $5\text{ }\mu\text{g/ml}$, e deixadas em contato com as células por 10 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura. Em seguida, as células foram analisadas por microscopia fluorescente (Olympus AX70).

As células fixadas foram também coradas segundo protocolo estabelecido por ROSENFELD (1947). O corante foi adicionado às placas previamente fixadas com metanol gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em volume suficiente para cobrir completamente o tapete celular. Decorridos 3 minutos, adicionou-se um pouco de água à solução corante, deixando agir por 20 minutos em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas, secas e analisadas por microscopia óptica.

Análise da expressão da GFAP

Western blot

Os efeitos da MCT e DHMC também foram avaliados por western blotting (WB). Para extração e quantificação de proteínas totais, as células foram cultivadas em placas de 35 mm ϕ ao longo de 15 dias. Após atingirem confluência, as células foram moduladas com MCT ou DHMC em concentrações exponenciais que atingiram 0,1 a 500 μ M durante 24 e 72 h. Após o tempo de exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e retiradas da placa com um tampão de lise Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, contendo 2% (p/v) SDS, 2 mM EGTA, 4 M uréia, 0,5% (v/v) Triton X-100 suplementado com 1 μ l/ml de um cocktail de inibidores de proteases (Sigma, St. Louis, MO). A suspensão protéica foi homogeneizada com um poterizador do tipo "Potter Thomas". A quantificação protéica foi obtida por kit DC de dosagem de proteínas totais (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), segundo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) modificado. Para análise da GFAP, 5 μ g de proteínas totais foram separadas por eletroforese (200 V por 45 minutos) por método descontínuo utilizando-se um gel de empilhamento a 4% e um gel de migração a 10% de acrilamida-bisacrilamida 30% (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilideno fluoretada (PVDF), por uma hora a 100 V. O bloqueio de sítios inespecíficos das membranas foi realizado com uma solução de Tris salino 20 mM em pH 7,5 contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) e 1% de BSA, por uma hora à temperatura ambiente. Para a análise da expressão de proteínas de astrócitos tratados com a MCT e DHMC, as membranas foram incubadas por uma hora, sob agitação lenta, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal de camundongo anti-GFAP (1:5000, Boehringer, Mannheim). Após lavagem em TBS-T, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:10000, Promega Corporation, WI, USA), por 30 minutos sob as mesmas condições. Para a análise da expressão de proteínas de astrócitos tratados com a DHMC, as membranas foram incubadas com o mesmo anticorpo primário anti-GFAP, e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:10000, Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). Bandas imunorreativas foram visualizadas usando o substrato do kit Protoblot II AP System (Promega Corporation, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram escaneadas e a análise densitométrica das bandas imunorreativas foi realizada utilizando o software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), e os resultados foram expressos em percentual de Unidades Densitométricas Arbitrárias em relação ao controle não tratado. Como controle do depósito de proteínas foram realizadas eletroforeses idênticas cujos géis foram corados com nitrato de prata, segundo protocolo estabelecido por BLUM (1989). Esta análise foi realizada em pelo menos três experimentos independentes, e os resultados correspondem a um experimento representativo.

Análises Estatísticas

Para comparação entre dois grupos, foi realizado teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para comparar efeito dose resposta, foi realizado teste one way-ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Viabilidade celular como determinado pelo teste do MTT.

Os efeitos da MCT e DHMC sobre a viabilidade celular foram avaliados pelo teste do MTT. A MCT não demonstrou toxicidade em cultura primária de astrócitos corticais de ratos em nenhuma das concentrações testadas ao longo de 24 h de exposição, sendo esta a mesma observação para o tratamento controle (0,5% DMSO). Nesse tempo de exposição a viabilidade percentual expressa em relação ao controle esteve em torno de 100% para todos os tratamentos (Figura 7A). A análise da viabilidade celular após 72 h de exposição à MCT (Figura 7B) também não evidenciou toxicidade significativa, embora um percentual de 10% a menos de viabilidade em relação ao controle tenha sido registrado na concentração 0,1 μ M e de 10% a mais tenha sido observado a 1 μ M.

Em relação aos efeitos citotóxicos da DHMC nessas células após 24 horas, pôde-se observar que não houve alteração da viabilidade celular após 24h de exposição ao controle (1% DMF) quando comparado com células não tratadas (Figura 8A). O tratamento com DHMC na concentração de 0,1 μ M por 24 horas também não induziu alteração significativa no percentual de viabilidade em relação ao controle, embora uma alteração de 10% pra menos tenha sido registrado. (Figura 8B). Por outro lado, houve uma diminuição significativa da viabilidade celular nas demais concentrações. DHMC a 1 μ M causou uma redução de 25% em relação ao controle. DHMC a 10 μ M reduziu a viabilidade celular em 30%, enquanto que DHMC 100 μ M e 500 μ M a reduziram em 40% e 35%, respectivamente, quando comparada ao controle (Figura 8B). Após 72h de tratamento, observou-se que o controle (1%DMF) induziu uma toxicidade nos astrócitos, reduzindo a viabilidade celular em 30% em relação às células não tratadas (Figura 9A). Ainda, comparando os tratamentos em relação ao controle após 72h de exposição (Figura 9B), foi observado que a DHMC induziu uma diminuição significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle, entretanto não houve evidência de um efeito dose-resposta.

Modulação da morfologia de astrócitos analisada através da coloração pancreômica de Rosenfeld

Para demonstrar alterações na morfologia de astrócitos em resposta ao alcalóide MCT e ao pirrol DHMC, foi realizada uma coloração pelo método de ROSENFELD (1947) nas culturas primárias de astrócitos corticais de rato. A análise por microscopia óptica das células coradas revelou que a maioria dos astrócitos não tratados ou expostos ao veículo DMSO (0,5%) e à MCT na concentração mais baixa (0,1 μM) apresentaram uma forma estrelada típica, com as células apresentando alguns finos processos celulares. A coloração dos astrócitos pode também evidenciar que a MCT em concentrações entre 1-500 μM foi capaz de induzir mudanças na morfologia nestas células, especialmente verificadas após 72 h de tratamento (Figura 10). Os astrócitos tratados com 1 μM MCT, por 72 h, apresentaram uma leve tendência a contrair o corpo celular e a desenvolverem prolongamentos. Este efeito foi ampliado em função do aumento da concentração de MCT adotada (dose-dependente), sendo observado em um grande número de astrócitos tratados com 100 μM MCT ($\pm 45\%$) e na maioria das células tratadas com 500 μM MCT ($> 80\%$), que apresentaram o citoplasma totalmente contraído e finos processos celulares de tamanho variável (Figura 10 F e G, respectivamente).

Mudanças morfológicas nos astrócitos tratados com concentrações crescentes do pirrol DHMC (0,1-500 μM) e seu veículo de diluição (1% DMF) foram também melhor evidenciadas após 72 h de tratamento (Figura 11). As células expostas durante 24 h ao veículo DMF não revelaram qualquer mudança na morfologia (dado não mostrado), no entanto, a exposição mais prolongada a este composto foi capaz de induzir uma reação dos astrócitos, com uma proporção significativa das células ($\pm 28\%$) apresentando uma diminuição do corpo celular e forma atípica (Figura 11 B). Igualmente, foram observadas modificações na morfologia dos astrócitos expostos à DHMC, especialmente após 72 h de tratamento, as quais variaram em função da concentração adotada: uma proporção significativa de astrócitos ($>30\%$) tratados com as concentrações mais baixas de DHMC (0,1 e 1 μM) tenderam a apresentar um aumento do corpo celular, acompanhado de aumento e espaçamento dos processos celulares (Figura 11 C e D, respectivamente); por outro lado, nas culturas de astrócitos tratados com as concentrações intermediárias de 10 e 100 μM pôde ser verificado tanto células ainda apresentando alguns finos processos quanto células atípicas em forma de losango, revelando uma perda da morfologia caracteristicamente astrocitária (Figura 11 E e F,

respectivamente); finalmente, a maioria (> 85 %) das células nas culturas de astrócitos tratadas com a concentração mais alta de DHMC (500 μ M) apresentaram uma diminuição do corpo celular e retração dos processos (Figura 11 G).

Modificações na expressão da proteína do citoesquelto GFAP

Imunocitoquímica

Para demonstrar a expressão de GFAP em astrócitos e a reatividade ao alcalóide MCT e ao pirrol DHMC, uma marcação imunocitoquímica foi realizada nas culturas primárias de astrócitos corticais de rato. A análise da distribuição intracelular da GFAP através de microscopia em fluorescência, revelou que este filamento intermediário está distribuído de forma homogênea em mais de 90 % dos astrócitos não tratados (dado não mostrado) ou submetidos a condição controle (0,5% DMSO) durante todo o experimento (Fig. 12 A), e são considerados como GFAP positivos (GFAP⁽⁺⁾). Por outro lado, a imunomarcação evidenciou que quando os astrócitos foram tratados com concentrações crescentes de MCT, houve uma distribuição da GFAP mais peri-nuclear e nos processos celulares, caracterizando um fenótipo mais bipolar das células com o corpo celular contraído e longos processos celulares. Este fenômeno pode ser verificado desde 24 h de tratamento com a MCT (dado não mostrado), no entanto, foi mais evidente após 72 h de tratamento nas concentrações mais altas de MCT (10-500 μ M) (Figura 12 G; H; I). Ainda, a contra coloração da cromatina nuclear com o agente intercalante Hoechst 33258 pôs em evidência uma sub-população de células que apresentou-se negativa quanto à expressão da GFAP (GFAP⁽⁻⁾), representando 13 a 32% do total de células contadas (Figura 12 E, J, L); células com o núcleo contraído (picnótico) e formação de núcleos múltiplos também foram verificadas (Figura 12 F, L).

A análise ICQ da GFAP nas culturas primárias de astrócitos corticais de rato tratados com o pirrol DHMC, revelou que o veículo DMF (1%) não induziu modificações no perfil de expressão desta proteína após 24 h de tratamento (dado não mostrado), no entanto, após 72 h de exposição, pôde ser verificado que cerca de 30% das células apresentaram uma imunomarcação fraca para a GFAP, e as células consideradas GFAP⁽⁺⁾ apresentavam uma marcação especialmente no corpo celular, que estava mais contraído, e nos processos celulares quando estes estavam presentes (Figura. 13 A). Esta análise também revelou que os astrócitos tratados com a DHMC nas concentrações mais baixas (0,1 e 1 μ M) apresentaram um aumento qualitativo da marcação da GFAP e uma alteração marcante

na morfologia, com aumento do corpo celular e uma forte tendência em formar processos desde 24 h de tratamento (dado não mostrado) e especialmente após 72 h de tratamento (Figura 13 B e C, respectivamente); estas modificações também foram evidenciadas em uma sub-população (30-40%) das células tratadas com a DHMC nas concentrações intermediárias (10-100 μM), porém uma maior proporção de células (60-70%) apresentaram uma marcação fraca desta proteína, mais restrita à região peri-nuclear (Figura 13 G e H, respectivamente). Por outro lado, a maioria dos astrócitos expostos à DHMC na concentração mais alta (500 μM) apresentam uma diminuição qualitativa na marcação da GFAP que apresentou-se difusa no corpo celular, estando mais forte somente em algumas poucas células ($\pm 15\%$) que ainda possuíam processos celulares (Figura 13 L).

A coloração da cromatina nuclear com o Hoechst 33258 de culturas irmãs nas mesmas condições de tratamento, revelou que não houveram maiores modificações nesta estrutura em astrócitos tratados durante todo o período experimental com a DHMC nas concentrações de 0,1-1 μM . No entanto, foi evidenciado que alguns astrócitos (10-15%) tratados com as concentrações mais altas de DHMC (100-500 μM) apresentavam cromatina condensada e fragmentada, o que pode ser um indicativo de apoptose (Figura 13 J; L; M).

Níveis de expressão de GFAP analisados por Western Blot

Visando analisar de forma semi-quantitativa as alterações nos níveis de expressão da proteína GFAP em astrócitos corticais de ratos, induzidas pela MCT e pela DHMC, foi realizada uma extração de proteínas totais e western blot. A exposição dessas células à MCT por 72 h revelou uma redução de aproximadamente 40% nos níveis de expressão dessa proteína em todas as concentrações testadas, quando comparado aos níveis expressos nos astrócitos em condições controle ou em presença do veículo DMSO (0,5 %) (Figura 14)

A análise por western blot da expressão da GFAP em astrócitos tratados com a DHMC ou com seu veículo DMF (1 %), revelou que após 72 h de tratamento, a DMF por si só induziu uma redução significativa ($\pm 20\%$) na expressão desta proteína. Por outro lado, esta análise também revelou que em comparação aos níveis de expressão das células não tratadas, este pirrol induz um aumento dos níveis de expressão da GFAP (22-40 %) quando adotado nas concentrações de 0,1 e 1 μM . Entretanto, um efeito oposto ocorreu quando a DHMC foi adotada nas concentrações de 10, 100 e

500 μM , havendo uma drástica redução, em torno de 50 %, nos níveis de expressão da GFAP (Figura 15).

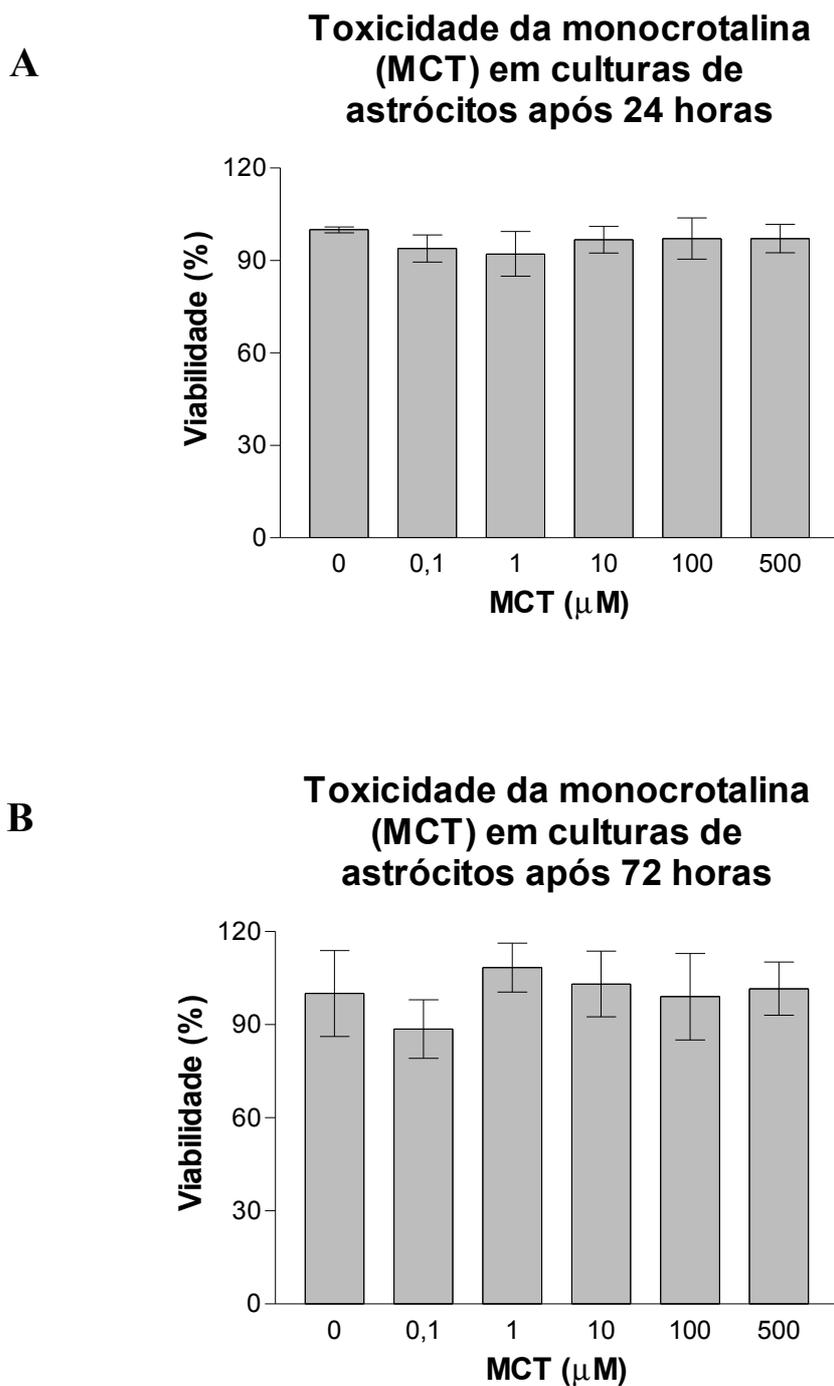


Figura 7 - Teste do MTT em células tratadas com MCT. **A**: Comparação entre os tratamentos e o controle DMSO após 24 h de exposição pelo teste One way ANOVA. Não houve significância. **B**: Comparação entre os tratamentos e o controle DMSO após 72 h de exposição pelo teste One way ANOVA. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Não houve significância em nenhum dos tempos.

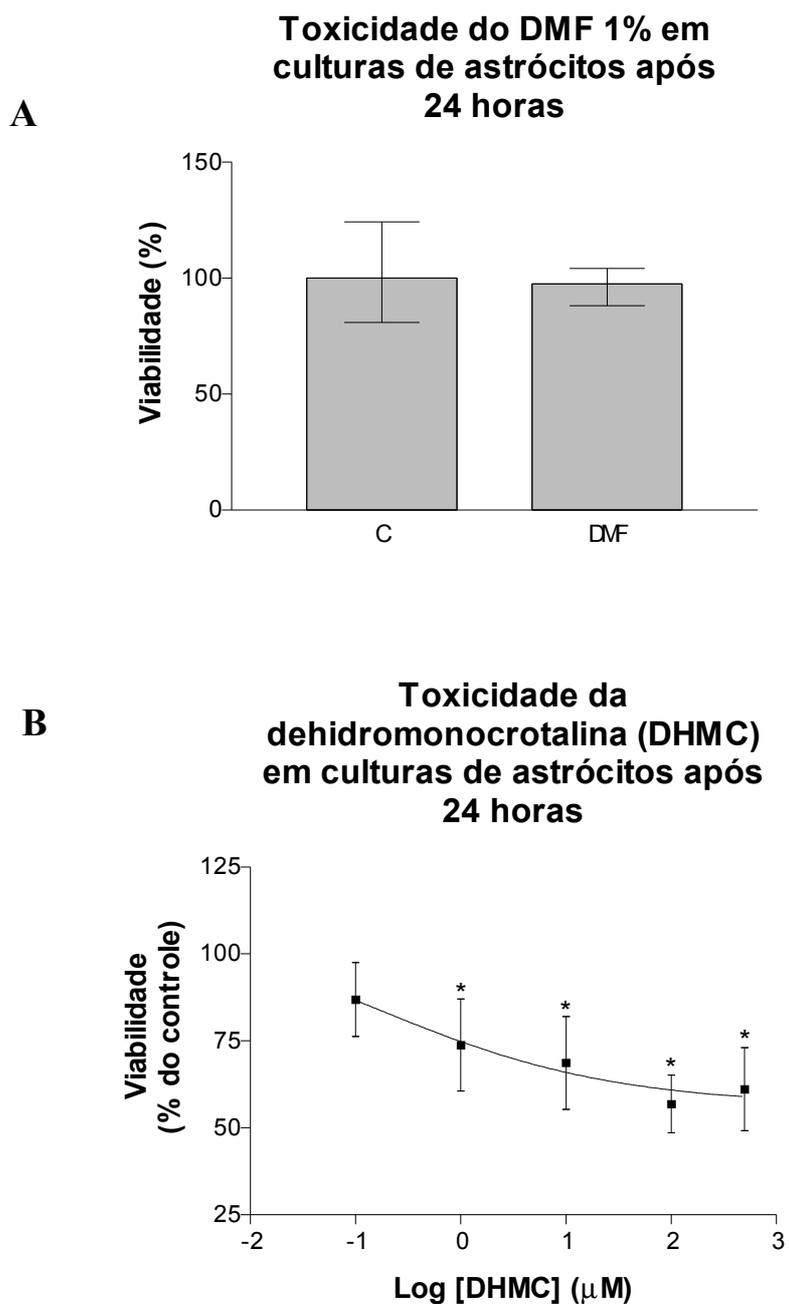


Figura 8 - Teste de toxicidade pelo teste do MTT em células tratadas com a DHMC durante 24 h. **A:** Comparação entre células não tratadas e o controle do solvente (DMF) através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Resultado expresso em mediana \pm percentis (25-75). Sem significância; **B:** Comparação entre os tratamentos com DHMC e o controle DMF pelo teste one way-ANOVA seguido do teste Student-Newmann-Keuls. O eixo da abcissa representa o logaritmo da concentração e o eixo da ordenada representa a viabilidade percentual em relação ao controle DMF. *, $p < 0,05$ comparado ao controle DMF.

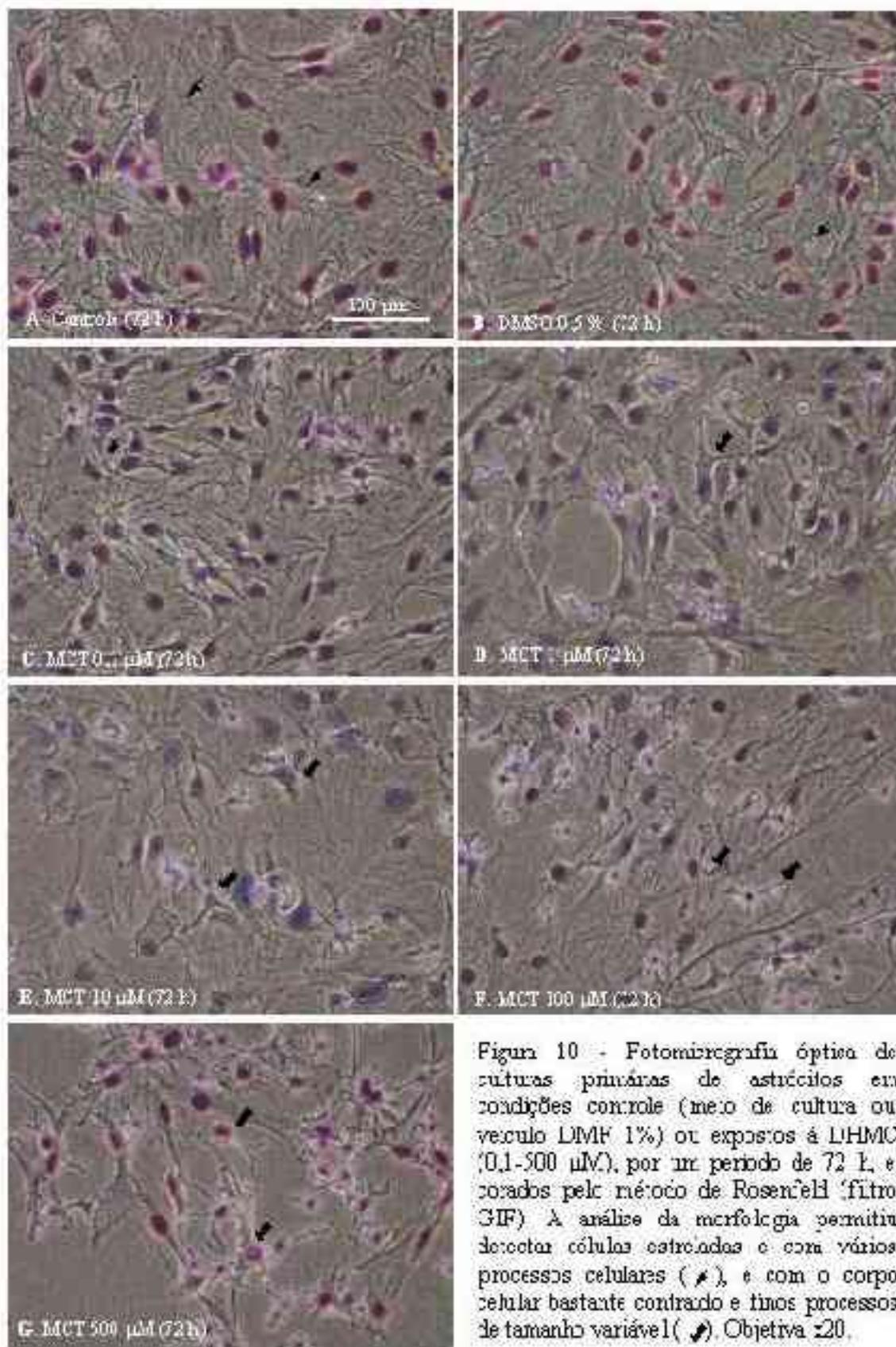


Fig
72
nã
0,
Al

Figura 10 - Fotomicrografia óptica de culturas primárias de astrócitos em condições controle (meio de cultura ou veculo DMF 1%) ou expostos à LHMC (0,1-500 μ M), por um período de 72 h, e corados pelo método de Rosenfeld (filtro GFP). A análise da morfologia permitiu detectar células esticadas e com vários processos celulares (\blackast), e com o corpo celular bastante contraído e finos processos de tamanho variável (\blackast). Objetiva $\times 20$.

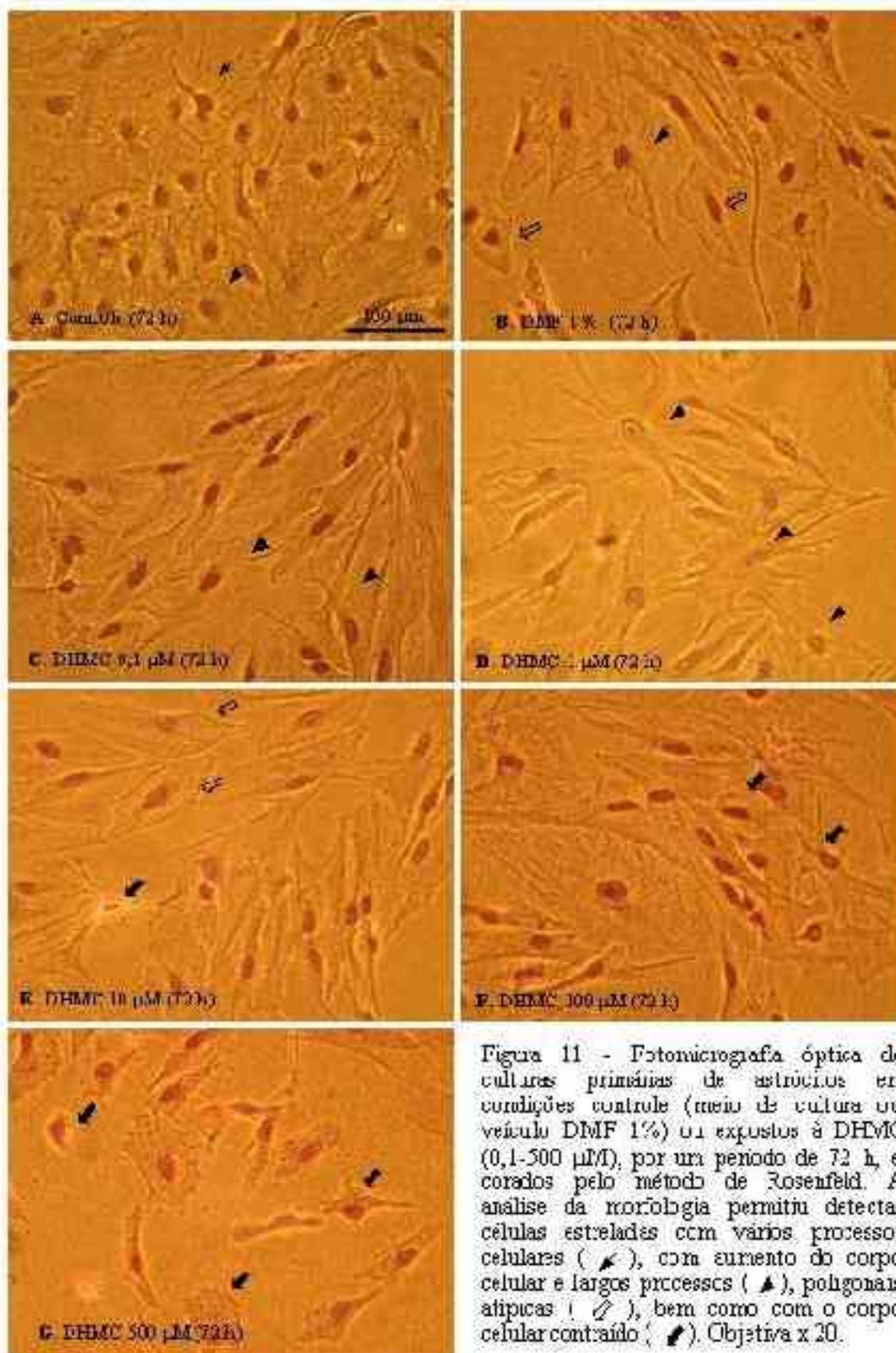


Figura 11 - Fotomicrografia óptica de culturas primárias de astrócitos em condições controle (meio de cultura ou veículo DMF 1%) ou expostos à DHEMC (0,1-500 µM), por um período de 72 h, e corados pelo método de Rosenfeld. A análise da morfologia permitiu detectar células estreladas com vários processos celulares (▲), com aumento do corpo celular e longos processos (▲), poligonais atípicas (◊), bem como com o corpo celular contraído (♣). Objetiva x 20.

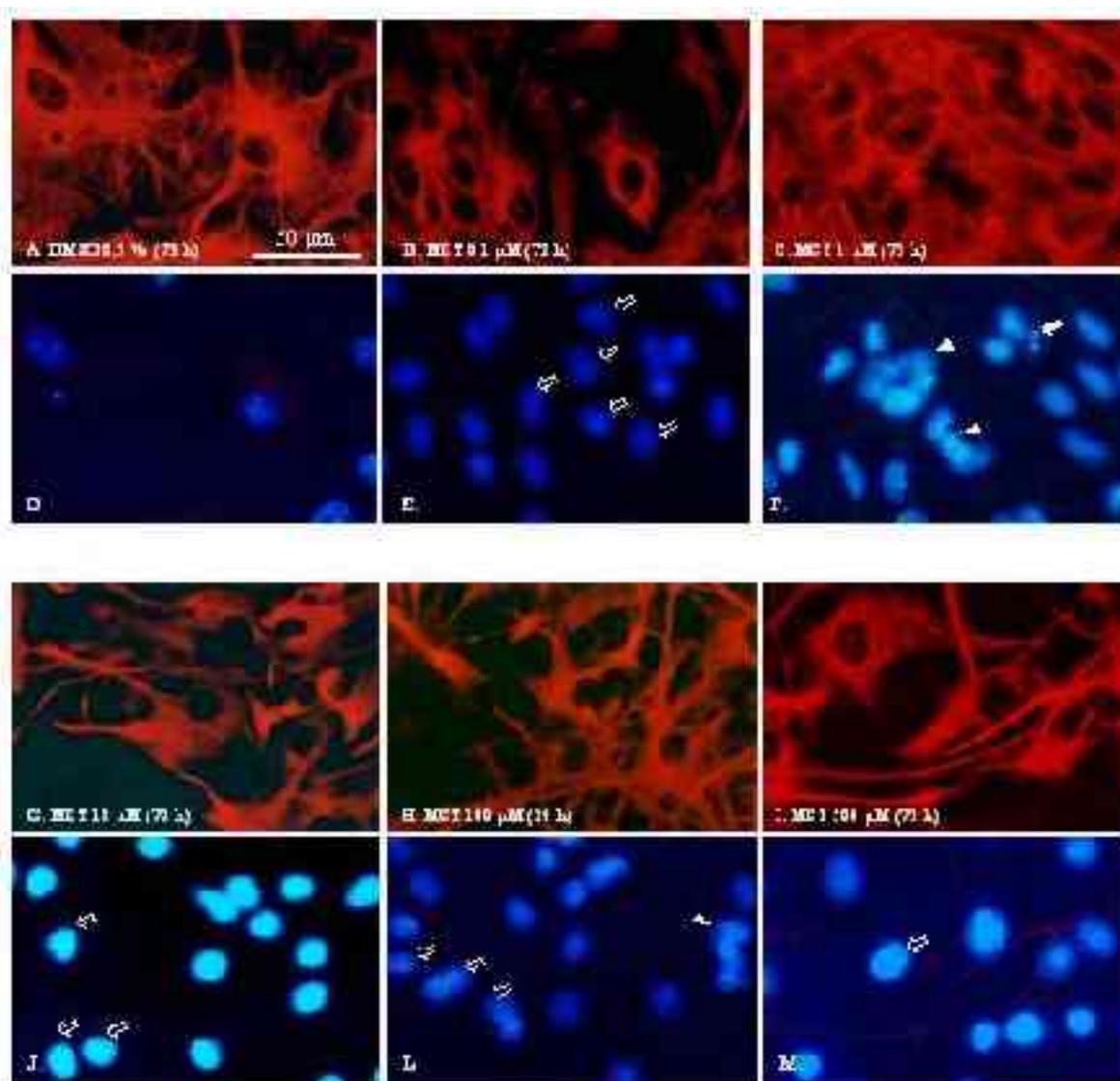


Figura 12 - Fotomicrografia da análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP em astrócitos em condições controle (DMSO 0,5%) ou expostos à MCT (0,1-500 μ M), por um período de 72 h, e da coloração da cromatina nuclear das mesmas células com o agente intercalante do DNA Hoechst 33258. A coloração da cromatina nuclear (D, E, F, J, L, M) permitiu evidenciar células negativas para a GFAP (\emptyset), bem como células com compactação da núcleo (\bullet), e com núcleos múltiplos (\blacktriangle). Objetiva x 20.

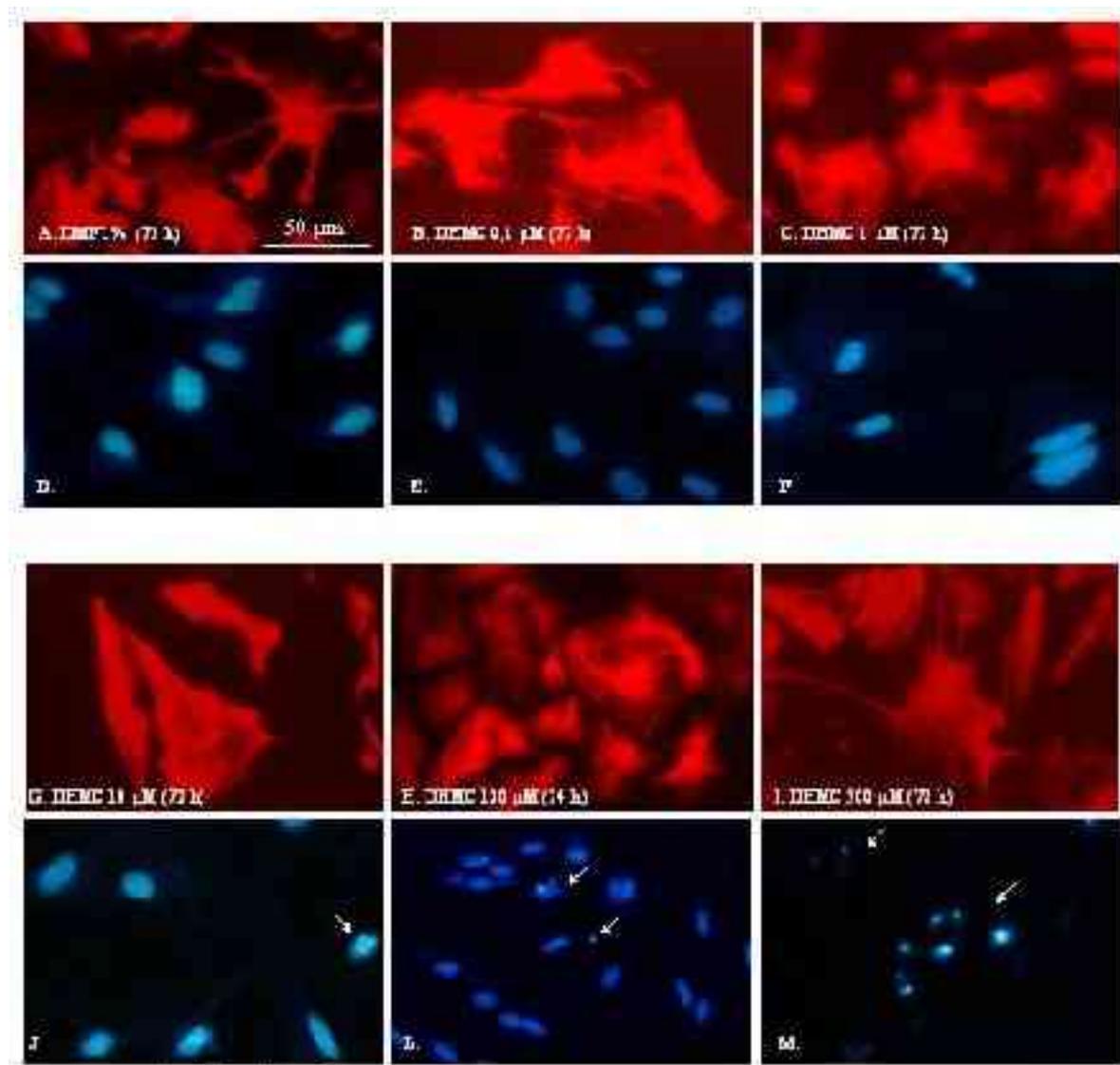


Figura 13 - Fotomicrografia da análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP em astrócitos em condições controle (DMF 1%) ou expostos à DHMC (0,1-500 μ M), por um período de 72 h, e da coloração da cromatina nuclear de culturas irmãs com o agente intercalante do DNA Hoechst 33258. A coloração da cromatina nuclear (**J**, **L** e **M**) permitiu evidenciar células com condensação e fragmentação da cromatina (\blacktriangleleft). Objetiva x 20.

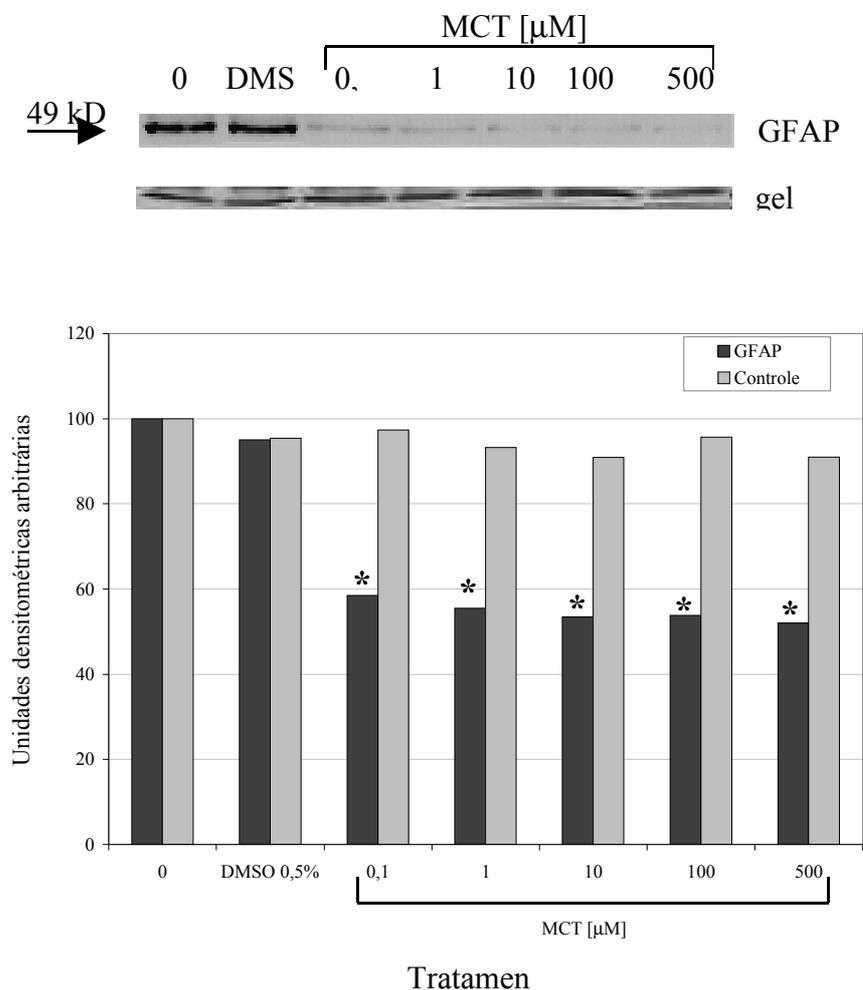


Figura 14 - Análise por Western immunoblotting da expressão da proteína do citoesqueleto GFAP em astrócitos em condições controle (DMSO 0,5%) ou tratadas com diferentes concentrações da MCT (0,1 a 500 μM) por 72 h. **A:** Imagem do imunoblot referentes à proteína GFAP de 49 kD; controle do depósito de proteínas feito pela coloração com nitrato de prata de um gel de eletroforese idêntico ao utilizado para o western immunoblotting da proteína GFAP, aqui representado pelas bandas referentes ao fundo de migração. **B:** Representação da análise densitométrica de um experimento representativo de tres; os resultados são expressos em percentual de Unidades Densitométrica em relação ao controle (100); (*) $p > 0,01$.

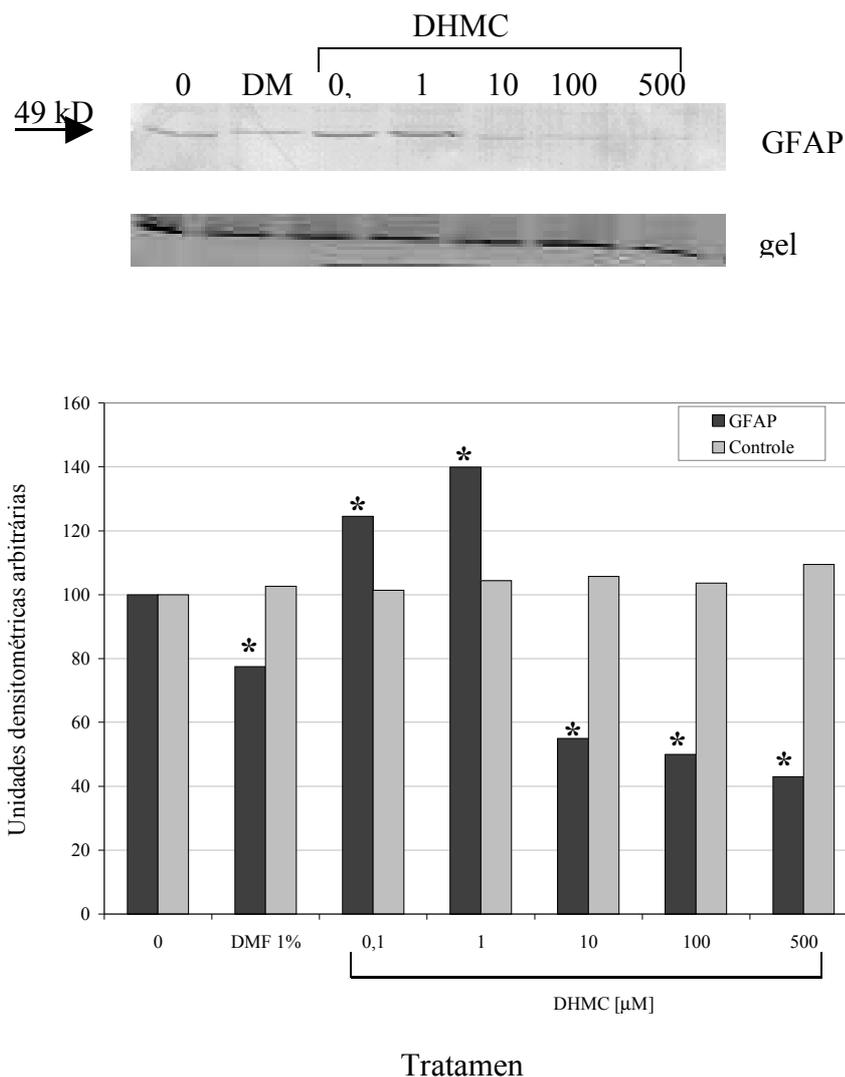


Figura 15 - Análise por Western imunoblotting da expressão da proteína do citoesqueleto GFAP em astrócitos em condições controle (DMF 1%) ou tratadas com diferentes concentrações da DHMC (0,1 a 500 μ M) por 72 h. **A:** Imagem do imunoblot referentes à proteína GFAP de 49 kD; controle do depósito de proteínas feito pela coloração com nitrato de prata de um gel de eletroforese idêntico ao utilizado para o western imunoblotting da proteína GFAP, aqui representado pelas bandas referentes ao fundo de migração. **B:** Representação da análise densitométrica de um experimento representativo de tres; os resultados são expressos em percentual de Unidades Densitométrica em relação ao controle (100); (*) $p > 0,01$.

DISCUSSÃO

Muitas plantas do gênero *Crotalaria* possuem o alcalóide pirrolizidínico (AP) monocrotalina (MCT) como seu principal composto tóxico. A MCT é um alcalóide primariamente hepatotóxico, entretanto, animais mais sensíveis à intoxicação por esse composto químico, como os eqüinos, podem apresentar sinais clínicos nervosos normalmente associados a um quadro de encefalopatia hepática (ROSE et al., 1957; JALAN et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado um comprometimento de astrócitos no núcleo caudato e no córtex de equídeos naturalmente ou experimentalmente intoxicados com *Crotalaria retusa*, sendo evidenciado uma hiperplasia e formação de núcleos vesiculares nessas células (NOBRE et al., 2004). Estudos para melhor compreensão dos efeitos biológicos e tóxico da MCT e seus metabólitos têm sido conduzido há algumas décadas (ADAMS & ROGERS, 1939; ROSE et al, 1957; SMITH and OSBORN, 1962; WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987; RIBEIRO et al.1993; YAN & HUXTABLE, 1995; MEDEIROS et al. 2000), entretanto, não se sabe se esse alcalóide pode exercer um efeito direto sobre células do SNC durante a patogênese da intoxicação. Postula-se que a MCT necessita ser ativada pelo complexo enzimático citocromo P450 dos hepatócitos antes de exercer seus efeitos tóxicos, gerando o composto eletrofílico dehidromonocrotalina (DHMC), capaz de alquilar macromoléculas celulares e, dessa forma, iniciar uma toxicidade aguda ou crônica. Resultados de um estudo preliminar *in vitro*, conduzido no nosso laboratório, sugerem que a MCT é capaz de induzir megalocitose e apoptose em células humanas de origem astrocitária, a linhagem GL-15 (BARRETO et al., submetido). Existem evidências cada vez mais fortes de que os astrócitos são fundamentais para a manutenção da homeostasia no SNC. Estas células podem funcionar como parceiros íntimos de neurônios adjacentes, provendo nutrientes e fatores neurotróficos, auxiliando na eficiência da transmissão sináptica, bem como agindo como um elemento de controle na captação de xenobióticos, ou influenciando nos efeitos cerebrais por estes causados após atravessarem a barreira hemato-encefálica (TRAVIS, 1994). Neste contexto, este estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos de uma exposição celular direta ao alcalóide MCT, extraído de *C. retusa*, e ao seu derivado quimicamente ativo, a DHMC, em cultura primária de astrócitos corticais de ratos.

As concentrações de MCT e DHMC adotadas neste estudo variaram entre 0,1 e 500 μM , e o tempo de tratamento das células variou entre 24 e 72 h. Estes parâmetros foram adotados em função deles

abrangerem aqueles adotados em outros estudos *in vitro* com alcalóides pirrolizidínicos, em outros sistemas celulares (THOMAS et al., 1998; KIM et al., 1999; WILSON et al., 2000; JI et al., 2002).

Nós observamos após 24 h e 72 h de tratamento, que a MCT não foi capaz de induzir uma citotoxicidade precoce em astrócitos, não sendo verificada qualquer alteração na atividade das desidrogenases mitocondriais destas células, mesmo na mais alta concentração (500 μM). Ainda, a análise da morfologia das células pela coloração pancrômica de Rosenfeld revelou que os astrócitos reagem à MCT com contração do citoplasma e afinamento dos processos celulares, um efeito mais evidente após 72 h da aplicação da droga, e que foi amplificado com o aumento da concentração de MCT. Para investigar os efeitos diretos do principal metabólito ativo da MCT em astrócitos corticais, o pirrol DHMC foi obtido através de oxidação da MCT extraída de *C. retusa*, e as células tratadas imediatamente após a obtenção e dissolução no veículo DMF, nas mesmas condições experimentais que a MCT. A análise da citotoxicidade pelo teste do MTT revelou que a DHMC, na mais baixa concentração (0,1 μM), não interferiu significativamente na viabilidade dos astrócitos, quando comparada com astrócitos em condições controle. No entanto, este pirrol, diferentemente da MCT, foi capaz de diminuir a viabilidade de astrócitos de forma dose-dependente, desde 24 h de tratamento nas demais concentrações. Em paralelo, alterações na morfologia dos astrócitos foram detectadas desde 24 h de exposição a doses crescentes de DHMC (dado não mostrado), sendo mais evidentes após 72 h de tratamento. Quando a DHMC foi adotada nas mais baixas concentrações (0,1 e 1 μM), estas modificações variaram dentro da população de células em cultura: uma subpopulação ($\pm 30\%$) dos astrócitos apresentou hipertrofia e outra subpopulação, mais representativa, apresentou contração do corpo celular. As modificações morfológicas observadas nos astrócitos tratados com concentrações intermediárias de DHMC (10 e 100 μM) foram mais homogêneas, a maioria das células apresentando morfologia atípica ou uma contração do corpo celular. No entanto, a maioria das células tratadas com a concentração mais alta de DHMC (500 μM) apresentaram o corpo contraído e encurtamento dos processos celulares, indicando uma maior citotoxicidade. Estes resultados corroboram com nossos estudos sobre ação da MCT em células de glioma de origem astrocitária da linhagem GL-15, que revelam que células gliais são capazes de responder diretamente à MCT (BARRETO et al., submetido) e revelam uma resposta heterogênea dose-dependente dos astrócitos corticais à DHMC. Um efeito similar da DHMC foi observado em células do endotélio arterial pulmonar, quando a presença de células megalocíticas foram detectadas a partir de 48 h de tratamento e em uma concentração que induziu citotoxicidade moderada (TAYLOR et al., 1997).

Já esta bem estabelecido que alterações em astrócitos podem ser usadas como marcadores para vários tipos de danos no sistema nervoso (COOKSON et al, 1994). Entre estas alterações, particularmente um conjunto de respostas hiperplásicas e hipertróficas conhecidas como gliose reativa (astrogliose) ocorre em resposta a danos físicos ou exposição a substâncias tóxicas e em alguns estados patológicos no sistema nervoso central (NORTON,1992). Um marcador consistente para a astrogliose é a acumulação de filamentos intermediários contendo a proteína específica de astrócitos, a GFAP. Inúmeros estudos têm mostrado que a expressão da GFAP é regulada positivamente (com aumento da expressão) após a exposição destas células a uma diversidade de compostos, a exemplo do ácido cainico (RATABOUL et al., 1989), acetato de chumbo (LUTHMAN et al., 1991) e trimetilina (O'CALLAGHAN & JANSEN, 1992). A análise por western immunoblot, dos extratos protéicos obtidos de culturas de astrócitos tratados com as mais baixas concentrações de DHMC (0,1 e 1 μ M) durante 72 h, revelou um aumento significativo nos níveis de expressão da GFAP. Este aumento na quantidade de GFAP foi refletido em um aumento qualitativo na imunomarcagem em uma importante sub-população de células hiperplásicas, como avaliado pela imunofluorescência, as células apresentando uma forte marcação da GFAP em todo o corpo celular e nos processos. Os resultados aqui apresentados não foram suficientes para esclarecer sobre o mecanismo (ou mecanismos) que induziram um aumento da GFAP. No entanto, as concentrações de DHMC que induziram um aumento da GFAP estão bem correlacionadas com uma toxicidade moderada, verificada através da medida da atividade das desidrogenases mitocondriais pelo teste do MTT. As mudanças morfológicas (hipertrofia) e fenotípicas (aumento da expressão de GFAP) aqui verificadas, são similares, de alguma forma, às alterações glióticas que têm sido descritas em estudos in vivo, como resultado de danos no SNC (EDDLESTON & MUCKE, 1993). Contudo, como a gliose reacional é um fenômeno complexo e heterogêneo que inclui alguns outros marcadores além da GFAP (NORTON et al., 1992; EDDLESTON & MUCKE, 1993), uma conclusão definitiva de que o pirrol DHMC induz astrogliose deve esperar que investigações complementares neste sistema sejam realizadas.

Ainda que a indução de astrogliose pela DHMC seja sugerida pelo aumento da expressão da GFAP e hiperplasia dos astrócitos (também verificada pela coloração de Rosenfeld), um efeito citotóxico dose-dependente deste pirrol também foi evidente: a análise da atividade das desidrogenases mitocondriais, medida pelo teste do MTT, revelou claramente uma diminuição dose-dependente da atividade destas enzimas, e portanto da viabilidade, desde 24 h de tratamento nas culturas de astrócitos tratados com a DHMC. Nós também observamos que os astrócitos expostos à DHMC nas

concentrações a partir de 10 μM apresentaram uma redução significativa nos níveis de expressão da GFAP, verificados tanto pelo western immunoblot quanto pela marcação imunocitoquímica: as bandas imunorreativas para a GFAP apareceram com uma intensidade muito fraca na marcação do western blot, quando comparadas às condições controle; a ICQ revelou a proteína nos citoplasmas e nos processos nas células disformes, e restrita à região perinuclear naquelas células que apresentavam o corpo celular retraído. Este efeito foi mais evidente nas culturas expostas à mais alta concentração de DHMC (500 μM): as culturas apresentaram os menores valores de atividade de desidrogenases mitocondriais, indicando uma grande redução no número de células metabolicamente viáveis, e a maioria das células apresentaram um fenótipo sugestivo de citotoxicidade, caracterizado pela contração do corpo celular, encurtamento dos processos e diminuição da expressão da GFAP. Uma regulação negativa na expressão da proteína GFAP foi também verificada na análise pela técnica de western immunoblot dos extratos protéicos dos astrócitos tratados com a MCT em todas as concentrações, que foi especialmente evidente após 72 h de tratamento. A análise por marcação imunocitoquímica, por outro lado, permitiu evidenciar que a MCT induz um aumento significativo no número de células GFAP⁽⁻⁾, e uma modificação no padrão de distribuição da marcação nas células GFAP⁽⁺⁾, que ficou mais restrita à região perinuclear e nos longos e finos processos celulares. Respostas heterogêneas a agentes neurotróficos e/ou neurotóxicos também têm sido descritas em astrócitos corticais *in vitro* tratados com cloroquine ou 5-hidroxiopamina (COOKSON & PENTREATH, 1994) e com organotinas trimetilina, trietilina e tributilina (ROHL et al., 2001). Estes achados sugerem que fenômenos distintos podem estar sendo desencadeados nas células tratadas com o alcalóide na sua forma nativa (MCT) ou com o seu derivado DHMC.

A contra coloração da cromatina com agente intercalante Hoechst-33258, permitiu detectar o aparecimento de células com núcleos múltiplos nas culturas de astrócitos tratados com a MCT, especialmente nas concentrações de 1, 10 e 100 μM . Modificações nos núcleos, conhecidas como astrócitos Alzheimer tipo II (HASEL et al., 1999), foram também recentemente detectadas em intoxicações naturais e experimentais de equídeos com a *Crotalaria retusa* (NOBRE et al., 2004). No entanto, este fenômeno não foi verificado em astrócitos tratados com a DHMC, em nenhuma das concentrações adotadas e durante todo o tempo de experimentação. Por outro lado, uma proporção significativa de astrócitos nas culturas tratadas com as mais altas concentrações de DHMC (100 e 500 μM), apresentaram núcleos com a cromatina condensada ou fragmentados, sugerindo que a ação deste pirrol pode orientar as células para uma via apoptótica. Ainda que este efeito não tenha

sido detectado em astrócitos tratados com a MCT em nossas condições experimentais, nossos resultados corroboram com os nossos estudos realizados nas células gliais da linhagem GL-15, quando células em apoptose foram verificadas após tratamento com 500 μ M MCT (BARRETO et al., submetido). A indução de apoptose pela MCT foi também verificada em hepatócitos in vivo (COPPLE et al., 2004) e em estudos in vitro realizados em células hepáticas da linhagem L-02 tratadas com o alcalóide pirrolizidínico clivorina (JI et al., 2005) e em células endoteliais da artéria pulmonar tratadas com a DHMC (THOMAS et al., 1998). Como a apoptose é um processo complexo, altamente estruturado e especificamente regulado por vários genes (JACOBSON, 1997), estudos complementares são necessários a cerca dos mecanismos envolvidos neste processo que possam ser associados aos efeitos do alcalóide MCT e seu derivado pirrol DHMC em astrócitos.

Um dos elementos clássicos que tem sido descrito como característicos da intoxicação crônica por alcalóides pirrolizidínicos (APs) em animais é o desenvolvimento de células aumentadas, ou megalocitose, especialmente nos hepatócitos (BULL, 1955), o que tem sido considerado como o resultado de uma possível associação de efeitos distintos dos APs nestas células: um estímulo à regeneração após lesão do parênquima e a ação antimitótica dos pirróis produto do metabolismo de APs (MATTOKS, 1986). Tem sido sugerido que a formação de megalocitose é o resultado da ação do metabólito pirrólico (MATTOCKS, 1986). Acredita-se que o pirrol interrompe o ciclo celular induzindo danos em genes chaves que controlam a divisão celular, levando a um desvio mitótico e síntese continuada de DNA e proteínas (SAMUEL, 1975; SKILLETER & MATTOKS, 1988; PRAKASH et al., 1999). Uma outra importante propriedade que tem sido atribuída a produtos do metabolismo de APs, tal como o metabólito pirrol da MCT, é a capacidade que estas moléculas possuem em induzir ligações cruzadas entre moléculas de DNA e entre moléculas de DNA e proteínas (PETRY et al., 1984). Em um estudo desenvolvido por COULOMBE e colaboradores (1999), ficou claro que a DHMC pode ligar-se ao DNA e à proteína do citoesqueleto actina de células renais e de carcinoma de mama, propriedade correlacionada às atividades citotóxicas, antimitóticas e megalocítica de alcalóides pirrolizidínicos e seus metabólitos (HINCKS et al., 1991; KIM et al., 1993).

A presença de isoformas de citocromos P450 no SNC tem sido descrito em diferentes espécies, inclusive em ratos (GHERSI-EGEA et al., 1988; NICHOLSON & RENTON, 1999) e em células de glioblastoma de origem astrocitária (GENG & STROBEL, 1998). Ainda que a atividade dos citocromos P450 presentes no cérebro correspondam a 1-10% daquela verificada no fígado dos animais (STROBEL et al., 1995), tem sido demonstrado que a atividade desses sistemas

enzimáticos pode ser modulada, e está associada a vários fenômenos no SNC, tais como a neurotransmissão, neuroendocrinologia, e especialmente neurotoxicidade, participando amplamente na transformação de xenobióticos (WARNER & GUSTAFSSON, 1995; STROBEL et al., 1995; GENG & STROBEL, 1998, MINN et al., 2000). Tendo em vista que a DHMC, um metabólito facilmente oxidável e de meia vida curta em meio aquoso, já foi encontrado ligado ao tecido do cérebro de ratos experimentalmente intoxicados (YAN & HUXTABLE, 1995), pode-se sugerir que esse composto esteja sendo produzido no local onde dá-se essa ligação ao tecido. Entretanto, uma possível origem via metabolismo hepático não pode ser descartada, considerando que essa molécula atravessa livremente a barreira hemato-encefálica (HUXTABLE et al., 1996). Como em nossos achados as modificações morfológicas foram observadas de forma dose-dependente nos astrócitos expostos a MCT especialmente após 72 h, pode-se sugerir a hipótese de que a MCT estaria sendo metabolizada pelos citocromos P450 dos astrócitos corticais, e seus metabólitos reativos estariam desencadeando uma resposta celular expressa em modificações da morfologia. Estudos utilizando drogas dependente de metabolismo via citocromo P450, tal como o agente neurotóxico fenitoína, mostram uma capacidade de reduzir a viabilidade de astrócitos somente após 7 dias de tratamento (MEYER et al., 2001). No entanto, como já demonstrado em hepatócitos (PRAKASH et al., 1999), a MCT pode estar seguindo outras vias metabólicas nos astrócitos, seja a hidrólise pela ação de esterases, gerando o derivado retronecina, seja conjugação com o glutation, gerando o conjugado pirrol-glutaciona; a retronecina também pode ser oxidada pelo sistema P450 gerando o metabólito secundário reativo dehidroretronecina. Neste sentido, os efeitos observados nos astrócitos expostos à MCT podem também ser o resultado da ação adicional do conjunto de metabólitos gerados nestas células.

Ainda que danos em células gliais tenham sido descritos e indiretamente associados à intoxicação pela *C. retusa*, pouco se sabe como estas células reagem aos seus principais componentes tóxicos, e se estão envolvidos nos fenômenos neuropatológicos desencadeados. O conjunto dos resultados aqui expostos revela que astrócitos corticais de ratos respondem de forma direta ao alcalóide pirrolizidínico MCT com modificações fenotípicas (diferenciação) e regulação do seu principal componente do citoesqueleto, as proteínas dos filamentos intermediários GFAP. Este estudo permitiu igualmente demonstrar que astrócitos corticais respondem ao metabólito ativo DHMC de forma heterogênea em função da concentração a que são expostos, seja através de modificações que sugerem uma astrogliose (hiperplasia e aumento da expressão de GFAP), seja por perda da viabilidade quando fenômenos de citotoxicidade são desencadeados e podem estar conduzindo estas células para uma via apoptótica. Estudos complementares, no entanto, deverão ser desenvolvidos

para esclarecer sobre como estes efeitos são desencadeados em astrócitos e sua possível relação com os danos no SNC observados e com aparecimento de sinais clínicos em animais intoxicados.

REFERÊNCIAS

- Adams R, Rogers EF. The structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. *J Am Chem Soc* 1939; 61:2815-2819.
- Aschner M. Astrocytes as Mediators of Immune and Inflammatory Responses in the CNS. *Neurotoxicology* 1998; 19 (2):269-82.
- Atal CK, Sawhney RS. The pyrrolizidine alkaloids from Indian *Crotalaria*s, *Indian J Pharm* 1973; 35:1-12.
- Barreto RA, Hughes JB, Souza CS, Silva VDA, Silva AR, Velozo ES, Batatinha MJM, Costa MFD, El-Bachá RS, Costa SL. Células gliais da linhagem GL-15 respondem a uma exposição direta ao alcalóide pirrolizidínico monocrotalina. *Rev Bras Sau Prod Anim* [submetido].
- Blum H, Beier H, Grass HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8:93-99.
- Bull LB. The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids. *Aust Vet J* 1955; 31: 33-40.
- Cheeke, PR, Shull LR. Natural toxicants in feeds and poisonous plants. Westport (Conn): AVI Publishing Company, Inc; 1985.
- Cheeke PR. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J Anim Sci* 1988; 66:2343-2350.
- Cheeke PR. Natural toxicants in feeds, forages and poisonous plants. 2nd ed. Danville (OH): Interstate Publishers; 1998.
- Costa SL, Planchenault T, Charrière-Bertrand C, Mouchel Y, Fages C, Juliano S, et al. Astroglial Permissivity for Neurotrophic Outgrowth in Neuron-Astrocyte CoCultures Depends on Regulation of Laminin Bioavailability. *Glia* 2002; 37:105-13.
- Cookson MR, Pentreath VW. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxic In vitro* 1994; 8 (3):351-9.
- Copple BL, Rondelli CM, Maddox JF, Hoglen NC, Ganey PE, Roth RA. Modes of cell death in rat liver after monocrotaline exposure. *Toxicol Sci* 2004; 77(1):172-82.
- Coulomb RA Jr., Drew GL and Stermitz FR.. Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154: 198-202.
- Culvenor CCJ, Smith LW. The alkaloids of *Crotalaria retusa* L. *Aust J Chem* 1957; 10: 464-473.
- Culvenor CCJ, Dann AT, Dick AT. Alkylation as the mechanism by which the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids act on cell nuclei. *Nature* 1962; 195 (4841): 570-573.
- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes: implication for their role in neurological disease. *Neuroscience* 1993; 54:15-36.
- Geng J, Strobel HW. Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monooxygenase system in the rat glioma C6 cell line. *Brain Res.* 1998 Feb 16;784(1-2):276-83.
- Gherzi-Egea JF, Minn A, Siest G. A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sci* 1988; 42(24):2515-23.
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119:203-10.
- Hasel KM, Summers BA, De Lahunta A. Encephalopathy with idiopathic hyperammonaemia and Alzheimer type II astrocytes in equidae. *Equine Vet J* 1999; 31(6):478-82.

- Hincks JR, Kim HY, Segall HJ, Molyneux RJ, Stermitz FR, Coulombe RJ. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 111:90-98.
- Hoehne FC. Leguminosas papilionaceas: *Crotalaria e Lupinus*. In: Hoehne FC, editor. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. São Paulo: Graphycars, 1939. p.137.
- Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmac Ther* 1990, 47: 371.
- Huxtable RJ, Yan CC, Wild S, Maxwell S, Cooper R. Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. *Neurochem Res* 1996; 21(2):141-6.
- Jacobson M.D. (1997) Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Curr Biol*. 7(5):277-281.
- Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(8):1175-1181.
- Ji L, Zhao X, Chen L, Zhang M, Wang Z. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells. *Toxicol* 2002; 40:1685-1690.
- Ji LL, Zhang M, Sheng YC, Wang ZT. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induces apoptosis in human normal liver L-02 cells and reduces the expression of p53 protein. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(1): 41-6.
- Kim HY, Stermitz FR, Li JKK, Coulombe RA. Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 619-625.
- Lefrancois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J Neurosci*. 1997; 17 (11):4121-8.
- Letournel-Boulland ML, Fages C, Rolland B, Tardy M. Lipopolysaccharides (LPS) up-regulate the IL-1-mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary culture. *Euro. Cytokine Network* 1994; 5 (1):51-6.
- Luthman J, Olson L, Bjorklund H, Henschen A, Hoffer B, Oskarsson A. Combined lead acetate and disulfiram treatment-induced alterations of glial fibrillary acidic protein (GFA) immunoreactive astrocytes in brain smears. *Toxicology* 1991; 65(3): 333-46.
- Mattocks AR.. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal. In: Mattocks AR, Editor. *Chemistry and Toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. New York: Academic press;1986.
- Mattocks AR, Jukes R, Brown J. Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol* 1989;27(5):561-567.
- McLean EK. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharm Ver* 1970; 22: 429-483.
- Mead C, Pentreath VW. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. *Toxicol In vitro* 1998; 12:141-52.
- Medeiros RMT, Górnica SL, Guerra JL. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. *J Ethnopharmacol* 2000;69: 181-188.
- Meyer RP, Knoth R, Schiltz E, Volk B. Possible function of astrocyte cytochrome P450 in control of xenobiotic phenytoin in the brain: in vitro studies on murine astrocyte primary cultures. *Exp Neurol*. 2001 Feb;167(2):376-84.
- Minn A, El-Bachá RS, Bayol-Danizot C, Lagrange P, Suleman FG, Gradinaru D. Drug metabolism in the brain: benefits and risks. In: *The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS*. Begley DJ, Bradbury MW, Kreuter J, editors. New York, Marcel Dekker, Inc.:145-169; 2000.
- Nicholson TE, Renton KW. Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. *Brain Res* 1999; 827: 12-18.

- Nobre VMT, Riet-Correa F, Dantas AFM, Barbosa Filho JM, Tabosa IM, Vasconcelos JS. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semi-árido da Paraíba. *Peq Vet Bras* 2004; 24(3): 132-143.
- Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis. A review. *Neurochemical Research* 1992; 17:877-85.
- O'Callaghan JP, Jensen KF. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13(1):113-22.
- Petry TW, Bowden GT, Huxtable RJ, Sipes IG. Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res* 1984. 44 (4): 1505–1509.
- Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE & Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res* 1999; 5: 53-67.
- Rataboul P, Vernier P, Biguet NF, Mallet J, Poulat P, Privat A. Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat. *Brain Res Bull* 1989; 22(1):155-61.
- Ribeiro LR, Silva AR, Bautista AR, Costa SL, Sales LA, Rios AC, Salvadori DM. Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 1993; 300: 253-8.
- Rohl C, Gulden M, Seibert H. Toxicity of organotin compounds in primary cultures of rat cortical astrocytes. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(1):23-32.
- Rose AL, Gardner CA, McConnell J.D, Bull LB.. Field and experimental investigation of "walk about" disease of horses (Kimberley horse disease) in Northern Australia: *Crotalaria* poisoning in horses. *Aust Vet J* 1957; 33: 25-33.
- Sanfeliu C, Crisòfol R, Torán N, Rodrigues-Farré E, Kim SU. Use of human central nervous system cell cultures in neurotoxicity testing. *Toxicol In vitro* 1999; 13 (4-5):753-9.
- Samuel MV. Jago. Localization in the cell cycle of the antimetabolic action of the pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine and of its metabolite, dehydroheliotridine. *Chem Biol Interact* 1975; 10(3): 185-197.
- Skilleter DN, Mattocks AR, Neal GE. Sensitivity of different phases of the cell cycle to selected hepatotoxins in cultured liver-derived (BL9L) cell. *Xenobiotica* 1988; 18(6): 699-705.
- Smith FH, Osborne JC. Toxic effects of *Crotalaria* seed. *Vet med* 1962; 57: 237-237.
- Strobel HW, Kawashima H, Geng J, Sequeira D, Bergh A, Hodgson AV, Wang H, Shen S. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. *Toxicol Lett.* 1995 Dec;82-83:639-43.
- Taylor DW, Wilson DW, Lamé MW, Dunston SD, Jones AD, Segall HJ. Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 143:196-204.
- Thomas HC, Lamé MW, Wilson DW, Segall HJ. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141(1):319-29.
- Thomas HC, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ, Wilson DW. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 151: 236-244.
- Thomas HC, Lamé MW, Morin D, Dunston SK, Wilson DW, Segall HJ. Prolonged Cell-cycle arrest associated with altered cdc2 kinase in monocrotaline pyrrole-treated pulmonary artery endothelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1998; 19: 129-142.
- Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. In: Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV, editors. *Plantas Tóxicas do Brasil*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. p. 240-242.
- Warner M, Gustafsson JA. Cytochrome P450 in the brain: neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16 (3): 224-36.

Williams MC, Molyneux RJ. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed Sci* 1987;35: 476-481.

Wilson DW, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ. DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 69-80.

Yan CC, Huxtable RJ. The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and tricothamine, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. *Toxicol* 1995; 33: 627-634.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Danos em células gliais de equídeos intoxicados com MCT já foram descritos, o que tem sido associado a um quadro de encefalopatia hepática e conseqüente hiperamonemia. Entretanto, pouco se sabe como estas células reagem a esse alcalóide, ou se o mesmo está envolvido diretamente nos fenômenos neuropatológicos desencadeados. Em razão dessa carência de informação na literatura a respeito da ação direta da MCT em células gliais, tornou-se importante averiguar a ação desta molécula e do seu metabólito mais ativo sobre células gliais. O conjunto dos resultados aqui expostos, revela que astrócitos corticais de ratos respondem de forma direta ao alcalóide pirrolizidínico MCT, ocorrendo modificações fenotípicas e regulação do seu principal componente do citoesqueleto, a proteína GFAP. Dado que a literatura postula que a MCT é quimicamente inerte, e que, astrócitos de ratos possuem isoformas de citocromos P450, podemos sugerir então que esse composto estaria sendo ativado pelas células ao pirrol e este por sua vez estaria interferindo no metabolismo celular. Este estudo permitiu igualmente demonstrar que astrócitos corticais de ratos respondem a DHMC de forma heterogênea em função da concentração a que são expostos, seja através de modificações fenotípicas que sugerem uma astrogliose, seja por uma perda da viabilidade celular associada ou não com o condensação da cromatina nuclear, o que sugere uma entrada das células em uma via apoptótica.

Os resultados aqui apresentados não foram suficientes para esclarecer sobre o mecanismo (ou mecanismos) que induziram essa toxicidade da DHMC ou à possível astrogliose, que ficou sugerida principalmente pela aumento da expressão da GFAP revelada pelo western immunoblot. Contudo, como a gliose reacional é um fenômeno complexo e heterogêneo, que inclui alguns outros marcadores além da GFAP, uma conclusão definitiva de que o pirrol DHMC induz astrogliose deve esperar que investigações complementares neste sistema sejam realizadas. Ainda, apesar dos astrócitos tratados com a DHMC apresentarem sinais de apoptose, este é um processo complexo, altamente estruturado e especificamente regulado por vários genes, e estudos complementares são necessários para que se possa relacionar uma ação da DHMC à indução desse fenômeno em astrócitos corticais de ratos. O tratamento das células com a DHMC veiculada em volume menor de DMF também seria desejável, uma vez que este veículo por si só já foi capaz de induzir toxicidade nos astrócitos.

Finalmente, faz-se necessário uma investigação mais apurada sobre a possibilidade de ocorrência de efeitos diretos da MCT em componentes celulares, onde seria sensato investigar o envolvimento do complexo citocromo P450 nos fenômenos observados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams R, Rogers EF. The structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. J Am Chem Soc 1939; 61:2815-2819.

Alfonso HA, Sanchez LM, Figueredo MA, Gómez BC. Intoxication due to *Crotalaria retusa* and *C. spectabilis* in chickens and geese. Vet hum toxicol 1993; 32: 539.

Arzt J, Mount M. Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria* spp) ingestion in a horse on Easter Island. Vet Human Toxicol. 1999; 41: 96-99.

Aschner M. Astrocytes as Mediators of Immune and Inflammatory Responses in the CNS. Neurotoxicology 1998; 19 (2):269-82.

Atal CK, Sawhney RS. The pyrrolizidine alkaloids from Indian *Crotalaris*, Indian J Pharm 1973; 35:1-12.

Barreto RA, Hughes JB, Souza CS, Silva VDA, Silva AR, Velozo ES, Batatinha MJM, Costa MFD, El-Bachá RS, Costa SL. Células gliais da linhagem GL-15 respondem a uma exposição direta ao alcalóide pirrolizidínico monocrotalina. Rev Bras Sau Prod Anim [submetido].

Barri MES, Adam SEI. The toxicity of *Crotalaria saltiana* to calves. J Comp Path 1981; 91:621-627.

Barri MES, Adam SEI. Effects of *Crotalaria saltiana* on Nubian Goats. Vet Human Toxicol 1984; 26: 476-480.

Betz JM, Eppley RM, Taylor WC, Andrzejewski D. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum* sp.). J Pharm Sci 1994; 83(5):649-53.

Blum H, Beier H, Grass HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8:93-99.

Booher J, Sensenbrenner M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 1972; 2:97-105.

Bull LB. The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids. *Aust Vet J* 1955; 31: 33-40.

Cajal SR. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. Oxford University Press; 1995.

Cheeke, PR, Shull LR. *Natural toxicants in feeds and poisonous plants*. Westport (Conn): AVI Publishing Company, Inc; 1985.

Cheeke PR. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J Anim Sci* 1988; 66:2343-2350.

Cheeke PR. *Natural toxicants in feeds, forages and poisonous plants*. 2nd ed. Danville (OH): Interstate Publishers; 1998.

Clement AM, Nadanaka S, Masayama K, Mandl C, Sugahara K, Faissner A. The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (43):28444-53.

Cookson MR, McClean R, Williams SP, Davenport-Jones J, Egan C, O'Hare S, et al. Use of astrocytes for in vitro neurotoxicity testing. *Toxic In vitro* 1994; 8 (4):817-9.

Cookson MR, Pentreath VW. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxic In vitro* 1994; 8 (3):351-9.

Copple BL, Rondelli CM, Maddox JF, Hoglen NC, Ganey PE, Roth RA. Modes of cell death in rat liver after monocrotaline exposure. *Toxicol Sci* 2004; 77(1):172-82.

Costa SL, Planchenault T, Charrière-Bertrand C, Mouchel Y, Fages C, Juliano S, et al. Astroglial Permissivity for Neurotropic Outgrowth in Neuron-Astrocyte CoCultures Depends on Regulation of Laminin Bioavailability. *Glia* 2002; 37:105-13.

Couet CE, Hopley J, Hanley AB. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids by human, rat and avocado microsomes. *Toxicol* 1996; 34:1058-1061.

Coulomb RA Jr., Drew GL and Stermitz FR.. Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154: 198-202.

Culvenor CCJ, Smith LW. The alkaloids of *Crotalaria retusa* L. *Aust J Chem* 1957; 10: 464-473.

Culvenor CCJ, Dann AT, Dick AT. Alkylation as the mechanism by which the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids act on cell nuclei. *Nature* 1962; 195 (4841): 570-573.

Daimon H, Takada S, Ohe M, Mimoto H. Interspecific differences in growth and nitrogen uptake among *Crotalaria* species. *Jpn J Crop Sci* 1995; 64: 115-120.

Dantas AFM, Nobre VMT, Tabosa IM. Intoxicação aguda por *Crotalaria* sp (Leguminosae) em ovinos na Paraíba, Brasil - relato de caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Belo Horizonte, MG; 1999 [Resumo].

Davies DL, Niesman IR, Boop FA, Phelan KD. Heterogeneity of astroglia cultured from adult human temporal lobe. *Int. J. Devl. Neuroscience* 2000; 18:151-60.

Dickison JO, Cooke MP, King RR, Mohamed PA. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169: 1192-1196.

Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes: implication for their role in neurological disease. *Neuroscience* 1993; 54:15-36.

Eng LF, Ghirmikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000; 25 (9-10):1439-51.

Frankfurt M, O'Callaghan J, Beaudet A. 5,7-Dihydroxytryptamine injections increase glial fibrillary acidic protein in the hypothalamus of adult rats. *Brain Res* 1991; 549(1):138-40.

Gardiner MR, Royce R, Bokor A.. Studies on *Crotalaria crispata*, a newly recognised cause of Kimberley horse disease. J Comp Path Bact 1965; 89: 43-53.

Garwood J, Schnädelbach O, Clement A, Schütte K, Bach A, Faissner A. DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. J. Neurosci. 1999; 19(10):3888-99.

Geng J, Strobel HW. Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monooxygenase system in the rat glioma C6 cell line. Brain Res. 1998 Feb 16;784(1-2):276-83.

Gherzi-Egea JF, Minn A, Siest G. A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. Life Sci 1988; 42(24):2515-23.

Gibbons WJ, Durr EH, Cox SA. An outbreak of cirrosis of the liver in horses. North Am Vet 1953; 34: 556-558.

Goeger DE, Cheeke PR, Schmitz JA, Buhler DR. Effects of feeding milk from goats fed Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*) to rats and calves. Am J Vet Res 1982; 43: 1631-1633.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 1989; 119:203-10.

Hasel KM, Summers BA, De Lahunta A. Encephalopathy with idiopathic hyperammonaemia and Alzheimer type II astrocytes in equidae. Equine Vet J 1999; 31(6):478-82.

Hincks JR, Kim HY, Segall HJ, Molyneux RJ, Stermitz FR, Coulombe RJ. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure-activity relationships. Toxicol Appl Pharmacol 1991; 111:90-98.

Hoehne FC. Leguminosas papilionaceas: *Crotalaria e Lupinus*. In: Hoehne FC, editor. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphicars, 1939. p.137.

Hooper PT, Scanlan WA. *Crotalaria retusa* poisoning in pigs and poultry. *Aus Vet J* 1977; 53:109-114.

<http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/leguminosas/crotalaria.html>. Acessado em: 02.05.2005.

<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/livros/plantastoxicas/19guizo.html>. Acessado em: 02.05.2005.

<http://www.grapheus.com/Plants/Plants-Crotalaria.htm> . Acessado em: 02.05.2005.

<http://www.merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/212700.htm> . Acessado em: 02.05.2005.

<http://www.mhhe.com/biosci/ap/holeessentials/student/olc/matching0298.html>. Acessado em 11.05.04.

Huxtable RJ. Herbal teas and toxins: novel aspects af of pyrrolizidine poisoning in United States. *Perspect Biol Med* 1980; 24: 1-14.

Huxtable RJ. Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. In: Cheeke PR ,Editor. *Toxicants of Plants Origin*. Florida:Boca Raton:1989

Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity of pirrolizidine alkaloids. *Pharmac Ther* 1990, 47: 371.

Huxtable RJ, Yan CC, Wild S, Maxwell S, Cooper R. Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. *Neurochem Res* 1996; 21(2):141-6.

Jacobson M.D. (1997) Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Curr Biol*. 7(5):277-281.

Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(8):1175-1181.

Ji L, Zhao X, Chen L, Zhang M, Wang Z. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells. *Toxicol* 2002; 40:1685-1690.

Ji LL, Zhang M, Sheng YC, Wang ZT. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induces apoptosis in human normal liver L-02 cells and reduces the expression of p53 protein. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(1): 41-6.

Jones PL e Rabinovitch M. Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res* 1996; 79: 1131-1142.

Jubb KVF e Kennedy PC. Patologia de los animales domésticos . In: Sistema Nervioso, p.430. Editorial Labor S.A.Barcelona. 1974.

Kandel ER. Nerve cells and behavior. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*. 4th ed. New York; 2000.

Kasahara Y, Kiyatake K, Tatsumi K, Sugito K, Kakusaka I, Yamagata S, Ohmori S, Kitada M, Kuriyama T. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30(1):124-129.

Kim HY, Stermitz FR, Molyneux RJ, Wilson DW, Taylor D, Coulombe RA Jr. Structural influences on pyrrolizidine alkaloid-induced cytopathology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 122(1): 61-9.

Kim HY, Stermitz FR, Coulombe RA Jr. Pyrrolizidine alkaloid-induced DNA-protein cross-links. *Carcinogenesis* 1995;16(11): 2691-7.

Kim HY, Stermitz FR, Li JKK, Coulombe RA. Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 619-625.

Kumari S, Kapur KK, Atal CK. Occurrence of a high monocrotaline yielding strain of *Crotalaria retusa*. *Curr Sci* 1966; 35: 546-547.

Kriegstein A, Götz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 2003; 43:37-43.

Lal PG, Ghirnikar RS, Eng LF. Astrocyte-Astrocytoma Cell Line Interactions in Culture. *J. Neurosci. Res.* 1996; 44:216-22.

Lappin PB, Ross KL, King LE, Fraker PJ, Roth RA. The response of pulmonary vascular endothelial cells to monocrotaline pyrrole: Cell proliferation and DNA synthesis *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 150: 37-48.

Lefrancois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J Neurosci.* 1997; 17 (11):4121-8.

Lent, R. As unidades do Sistema Nervoso: Forma e Função de Neurônios e Gliócitos. In: Nova Atheneu editora. Cem Bilhões de Neurônios, Conceitos Fundamentais de Neurociências, São Paulo; 2001. p. 65-95.

Lemos RAA, Barros CSL. Intoxicação por *Crotalaria* sp, p.322-325. In: Lemos RAA, editors. Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande; 1998.

Letournel-Boulland ML, Fages C, Rolland B, Tardy M. Lipopolysaccharides (LPS) up-regulate the IL-1-mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary culture. *Euro. Cytokine Network* 1994; 5 (1):51-6.

Lowry OH, Rosenbroug NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193:265-75.

Luthman J, Olson L, Bjorklund H, Henschen A, Hoffer B, Oskarsson A. Combined lead acetate and disulfiram treatment-induced alterations of glial fibrillary acidic protein (GFA) immunoreactive astrocytes in brain smears. *Toxicology* 1991; 65(3): 333-46.

Mattocks AR.. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal. In: Mattocks AR, Editor. Chemistry and Toxicology of pyrrolizidine alkaloids. New York: Academic press;1986.

Mattocks AR, Jukes R, Brown J. Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicon* 1989;27(5):561-567.

McGrath JPM, Duncan JR. *Crotalaria spectabilis* toxicity in swine: characterization of the renal glomerular lesion. *J Comp Path* 1975; 85:185-194.

McLean EK. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharm Ver* 1970; 22: 429-483.

Mead C, Pentreath VW. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. *Toxico In vitro* 1998; 12:141-52.

Medeiros RMT. Veiculação do princípio tóxico da *Crotalaria spectabilis* (Roth) em leite de cabra e rata: uma avaliação toxicológica. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de medicina veterinária, USP; 1994.

Medeiros RMT, Górnaiak SL, Guerra JL. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 69: 181-188.

Mendonca EH, Mazzafera P, Schiavinato MA. Purification of leghemoglobin from nodules of *Crotalaria* infected with *Rhizobium*. *Phytochemistry* 1999;50(2):313-6.

Meyer RP, Knoth R, Schiltz E, Volk B. Possible function of astrocyte cytochrome P450 in control of xenobiotic phenytoin in the brain: in vitro studies on murine astrocyte primary cultures. *Exp Neurol*. 2001 Feb;167(2):376-84.

Minn A, El-BAchá RS, Bayol-Danizot C, Lagrange P, Suleman FG, Gradinaru D. Drug metabolism in the brain: benefits and risks. In: *The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS*. Begley DJ, Bradbury MW, Kreuter J, editors. New York, Marcel Dekker, Inc.:145-169; 2000.

Miranda CL, Reed RL, Guengerich FP, Buhler DR. Role of cytochrome P450III A4 in the metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in human liver. *Carcinogenesis* 1991;12(3): 515-9.

Molyneux RJ, James LF. Pyrrolizidine alkaloids in milk: thresholds of intoxication. : *Vet Hum Toxicol* 1990;32 Suppl:94-103.

Montgomery DL. Astrocytes: form, function and roles in diseases. *Vet Pathol* 1994; 31: 145-167.

Morest DK, Silver J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 2003; 43:6-18.

Nadarajah B. Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia* 2003; 43:33-6.

Nicholson TE, Renton KW. Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. *Brain Res* 1999; 827: 12–18.

Neal WM, Russof LL, Ahmann CF. The isolation and some properties of an alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Roth. *J Am Chem Soc* 1935; 57: 2560-2561.

Nobre D, Dagli MLZ, Haraguchi M. *Crotalaria Juncea* intoxication in horses. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36: 445-448.

Nobre VMT, Riet-Correa F, Dantas AFM, Barbosa Filho JM, Tabosa IM, Vasconcelos JS. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semi-árido da Paraíba. *Peq Vet Bras* 2004; 24(3): 132-143.

Norton JH, O'Rourke PK.. Toxicity of *Crotalaria goreensis* for chickens. *Aust Vet J* 1979; 55:173-174.

Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis. A review. *Neurochemical Research* 1992; 17:877-85.

O'Callaghan JP, Jensen KF. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13(1):113-22.

Peckham JC, Sangster LT, Jones Jr. OH. *Crotalaria spectabilis* poisoning in swine. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165: 633-638.

Pekny M, Leveen MP, Eliasson C, Berthold C, Westermark B, Betsholtz C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filament but develop and reproduce normally. *The EMBO journal* 1995; 14:1590-1598.

Pereira TN, Webb RI, Reilly PEB, Seawright AA, Prakash AS. Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5441-5447.

Peters A, Palay SL, Webster H de F. *The fine structure of the Nervous System: The Cells and their processes*. New York: Oxford University Press, 1991.

Petry TW, Bowden GT, Huxtable RJ, Sipes IG. Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res* 1984. 44 (4): 1505–1509.

Pitt D. & McKenzie R. *Jaagsiekte in Horses*. Queensland Government 2002. Disponível em: URL: www.qld.gov.au/news/371.html.

Polhill, RM. *Crotalaria in Africa and Madagascar*. Rotterdam (NL): AA Balkema Publishers; 1982.

Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE, Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res* 1999; 5: 53-67.

Raine CS. Cellular neurochemistry and neural membranes. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fischer SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. New York; 1999.

Rataboul P, Vernier P, Biguet NF, Mallet J, Poulat P, Privat A. Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 1989; 22(1):155-61.

Reindel JF, Roth RA. The effects of monocrotaline pyrrole on cultured bovine pulmonary artery endothelial and smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1991;138(3):707-19.

Reindel JF, Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA. Comparison of response of bovine and porcine pulmonary arterial endothelial cells to monocrotaline pyrrole. *Am J Physiol* 1991;261(6 Pt 1):406-414.

Ribeiro LR, Silva AR, Bautista AR, Costa SL, Sales LA, Rios AC, Salvadori DM. Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 1993; 300: 253-8.

Rohl C, Gulden M, Seibert H. Toxicity of organotin compounds in primary cultures of rat cortical astrocytes. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(1):23-32.

Rose AL, Gardner CA, McConnell J.D, Bull LB.. Field and experimental investigation of "walk about" disease of horses (Kimberley horse disease) in Northern Australia: *Crotalaria* poisoning in horses. *Aust Vet J* 1957; 33: 25-33.

Rosenfeld G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: Nova combinação dos componentes do May Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego prático. *Mem Inst Butantã* 1947; 20: 329-335.

Rutka JT, Smith SL. Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation and tumorigenicity. *Cancer Research* 1993; 53:3624-31.

Samba RT, Sylla SN, M Neyra, Gueye M, Dreyfus B, Ndoeye I. Biological nitrogen fixation in *Crotalaria* species estimated using the ¹⁵N isotop dilution method. *Afric J Biotech* 2002; 1:17-22

Samuel MV, Jago. Localization in the cell cycle of the antimitotic action of the pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine and of its metabolite, dehydroheliotridine. *Chem Biol Interact* 1975; 10(3): 185-197.

Sanfeliu C, Crisòfol R, Torán N, Rodrigues-Farré E, Kim SU. Use of human central nervous system cell cultures in neurotoxicity testing. *Toxicol In vitro* 1999; 13 (4-5):753-9.

Shubat PJ, Hubbard AK, Huxtable RJ. Dose-response relationship in intoxication by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *J Toxicol Environ Health* 1989; 28: 445-460.

Skilleter DN, Mattocks AR, Neal GE. Sensitivity of different phases of the cell cycle to selected hepatotoxins in cultured liver-derived (BL9L) cell. *Xenobiotica* 1988; 18(6): 699-705.

Smith FH, Osborne JC. Toxic effects of *Crotalaria* seed. *Vet med* 1962; 57: 237-237.

Souza AC, Hatayde MR, Bechara GH. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae). *Pesq Vet Bras* 1997; 17: 12-18.

Stegelmeier BL, Edgar JA, Colegate SM, Gardner DR, Schoch TK, Coulombe RA, Molyneux RJ. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins* 1999; 8(1):95-116.

Steenkamp V, Stewart MJ, Zuckerman M. Clinical and analytical aspects of pyrrolizidine poisoning caused by South African traditional medicines. *Ther Drug Monit* 2000; 22 (3):302-6.

Strobel HW, Kawashima H, Geng J, Sequeira D, Bergh A, Hodgson AV, Wang H, Shen S. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. *Toxicol Lett*. 1995 Dec;82-83:639-43.

Tardy M. Astrocyte et Homeostasie. *Médecine Science* 1991; 8 (7):799-804.

Taylor DW, Wilson DW, Lamé MW, Dunston SD, Jones AD, Segall HJ. Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 143:196-204.

Thomas HC, Lamé MW, Wilson DW, Segall HJ. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141(1):319-29.

Thomas HC, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ, Wilson DW. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 151: 236-244.

Thomas HC, Lamé MW, Morin D, Dunston SK, Wilson DW, Segall HJ. Prolonged Cell-cycle arrest associated with altered cdc2 kinase in monocrotaline pyrrole-treated pulmonary artery endothelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1998; 19: 129-142.

Tokarnia CH, Döbereiner J. Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq vet bras* 1983; 3:115-123.

Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. In: Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV, editors. *Plantas Tóxicas do Brasil*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. p. 240-242.

Torres MBAM, Sales MWS, Headley AS, Barros CSL. Intoxicação experimental por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leguminosae) em suínos. *Ciência Rural* 1997; 27: 307-312.

Travis J. Glia: The Brain's other cells. *Science* 1994; 266: 970-972.

Vernadakis A, Fleischer-Lambropoulos H. Cell culture as a model to study cell-cell interactions during development aging and neurodegenerative diseases. *Int J. Develop. Neurosci.* 2000; 18 (2-3): 139-43.

Warner M, Gustafsson JA. Cytochrome P450 in the brain: neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16(3): 224-36.

Williams MC, Molyneux RJ. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed Sci* 1987;35: 476-481.

Wilson DW, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ. DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 69-80.

Winter H, Seawright AA, Mattocks AR, Jukes R, Tshewang AR, Gurung BJ. Pirrolizidine alkaloid poisoning in yaks. First report and confirmation by identification of sulphurbound pyrrolic metabolites of the alkaloids in preserved liver tissue. *Aust Vet J* 1990; 67: 411-412.

Yan CC, Huxtable RJ. The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and tricothecium, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. *Toxicol* 1995; 33: 627-634.

ANEXOS

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Rafael A. Barreto, Victor D. A. da Silva, Ana Rita Silva, Sandra Regina V. B. de Freitas, Juliana Bentes Hughes, Alexandre Moraes Pinheiro, Maria de Fátima Dias Costa, Ramon dos Santos El-Bachá, Maria José M. Batatinha, Eudes da Silva Velozo, Silvia Lima Costa. The pyrrolizidine alkaloid monocrotaline induces down-regulation of GFAP and toxicity in rat astrocyte primary culture. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio Grande do Sul, v. 24, n. suplemento, p. 10-11, 2004.

Juliana Bentes Hughes, Jocelone S. Souza, André Mário Mendes da Silva, Victor Diógenes Amaral da Silva, Ana Rita Silva, Cleide dos Santos Souza, **Rafael de Araújo Barreto**, Maria do Socorro Granjeiro, Alexandre Moraes Pinheiro, Ramon dos Santos El-Bachá, Eudes da Silva Velozo, Silvia Lima Costa. Reactional astrogliosis induced by *Prosopis juliflora* pods on astrocytes primary cultures. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio Grande do Sul - Brasil, v. 24, n. Suplemento, p. 29-30, 2004.

Rafael de A. Barreto, Juliana B. Hughes, Cleide S. Souza, Vítor D. A. Silva, Ana Rita Silva, Eudes S. Velozo, Maria J. M. Batatinha, Maria F. D. Costa, Ramon S. El-Bachá, Sílvia L. Costa. Células gliais da linhagem GL-15 respondem a uma exposição direta ao alcalóide pirrolizidínico monocrotalina. Submetido à Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.

Juliana B. Hughes, Jocelone S. Sousa, Ana Rita Silva, **Rafael de A. Barreto**, Vítor D. A. Silva, Cleide S. Souza, Maria J. M. Batatinha, Maria F. D. Costa, Ramon S. El-Bachá, Eudes S. Velozo, Marcienne Tardy, Sílvia L. Costa. Cytotoxicity of chloroformic extract from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. Submetido à Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.

Juliana B. Hughes, Jocelone S. Sousa, Ana Rita Silva, **Rafael de A. Barreto**, Vítor D. A. Silva, Cleide S. Souza, Maria J. M. Batatinha, Maria F. D. Costa, Ramon S. El-Bachá, Eudes S. Velozo, Marcienne Tardy, Sílvia L. Costa. Evaluation of the neurotoxic effects and reactional astrogliosis induced by alkaloids extracted from *Prosopis juliflora* Sw. D.C on astrocyte primary cultures. Submetido à Toxicology in Vitro.

PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS

BARRETO, R. A ; SILVA, V. D. A. ; SILVA, A. R. ; FREITAS, S. R. V.-B. ; HUGHES, J. B. ; PINHEIRO, A. M. ; COSTA, M. F. D. ; EL-BACHA, R. S. ; BATATINHA, M. J. M. ; VELOZO, E. S. ; COSTA, S. L. The pyrrolizidine alkaloid monocrotaline induces down-regulation of GFAP and toxicity in rat astrocyte primary culture.. In: 1º SILAPT SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PLANTAS TÓXICAS, 2004, Salvador. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.2004.

HUGHES, J. B. ; SOUZA, J. S. ; SILVA, A. M. ; SILVA, A. R. ; SILVA, V. D. A. ; **BARRETO, R. A.** ; GRANJEIRO, M. S. ; PINHEIRO, A. M. ; EL-BACHA, R. S. ; VELOZO, E. S. ; COSTA, S. L. . Reactional astrogliosis induced by *Prosopis juliflora* pods on astrocytes primary cultures.. In: 1º SILAPT Simpósio Latino-Americano de Plantas Tóxicas, 2004, Salvador. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2004.

BARRETO, R. A. ; HUGHES, J. B. ; SILVA, V. D. A. ; BATATINHA, M.J.M ; VELOZO, E. ; TARDY, M. ; COSTA, M. F. D. ; ELBACHÁ, R. S. ; COSTA, S. L. The pyrrolizidine alkaloid monocrotaline induces down-regulation of GFAP and toxicity in rat astrocyte primary culture. In: XXXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR- SBBq, 2004, Caxambú- MG. **Anais da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2004.

HUGHES, J. B. ; SOUZA, J. S. ; SILVA, A. M. M. ; SILVA, V. D. A. ; **BARRETO, R. A.** ; SOUZA, C. S. ; FREITAS, S.R.B.V ; COSTA, S. L. ; ELBACHÁ, R. S. Reactional astrogliosis induced by *Prosopis juliflora* pods on astrocyte primary culture. In: XXXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR- SBBq, 2004, Caxambú- MG. **Anais da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2004

SILVA, A. R. ; SILVA, V. D. A. ; FREITAS, S.R.B.V ; SOUZA, J. S. ; **BARRETO, R. A.** ; HUGHES, J. B. ; BARBOSA, P.R ; ROQUE,N.F ; ELBACHÁ, R. S. ; COSTA, S. L. Effect of four flavonoid compounds isolated from *Croton betulaster* on viability and proliferation of glioblastoma cells. In: XXXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA

MOLECULAR- SBBq, 2004, Caxambú- MG. **Anais da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** 2004

BARRETO, R.A., HUGHES, J.B., SILVA, A.R., SILVA, V.D.A., SOUSA, J.S, COSTA, M.F.D., BATATINHA, M.J.M., VELOZO, E.S., TARDY, M., EL-BACHÀ, R.S., COSTA, S.L. The alkaloid monocrotaline extracted from *Crotalaria retusa* induces growth inhibition and apoptosis on GL-15 glioma cells. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu - MG. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** 2003.

HUGHES, J.B, SOUSA, J.S, SILVA, A.R., **BARRETO, R.A.**, VELOZO, E.S., BATATINHA, M.J.M., FREITAS, S.R.V.B., SILVA, V.D.A., COSTA, M.F.D., TARDY, M., EL-BACHÀ, R.S., COSTA, S.L. Alkaloidal extracts from *Prosopis juliflora* pods presents an antitumoral potential against glioblastoma cells. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu - MG. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** 2003.

SILVA, A.R., SOUSA, J.S, SILVA, V.D.A., FREITAS, S.R.V.B., HUGHES, J.B, **BARRETO, R.A.**, VASCONCELLOS, V., BARBOSA, P.R., COSTA, M.F.D., FREIRE, S.M., TARDY, M., EL-BACHÀ, R.S., COSTA, S.L. Antitumoral effects of bioflavonoids on GL-15 malignant glioblastoma cells. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2003, Caxambu - MG. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)