

O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos.

The pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, extracted from Crotalaria retusa, interferes on cellular growth, alters GFAP expression and induces morphological changes on astrocyte primary cultures.

BARRETO, R. A.¹; HUGHES, J. B.¹; SOUZA, C. S.¹; SILVA, V. D. A.¹; SILVA, A. R.¹; VELOZO, E. S.²; BATATINHA, M. J. M.³; COSTA, M. F. D.¹; EL-BACHÁ, R. S.¹; COSTA, S. L.^{1*}

1. Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA; Departamento de Biofunção, Salvador, BA, 40.110-100, Brasil.
2. Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica, Faculdade de Farmácia, UFBA; Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 40170-290, Brasil.
3. Laboratório de Toxicologia, Escola de Medicina Veterinária, UFBA; Departamento de Patologia e Clínica, Avenida Ademar de Barros, 500, Salvador, BA, 40.110-170, Brasil.

*Endereço para correspondência: costasl@ufba.br

RESUMO

Casos de intoxicações com plantas do gênero *Crotalaria* (Leguminosae), em humanos, e principalmente em animais, têm sido amplamente descritos, com o comprometimento do SNC em animais mais sensíveis, como equídeos. Este estudo objetivou investigar os efeitos diretos do alcalóide pirrolizidínico Monocrotalina (MCT), principal toxina da *C. retusa*, em culturas primárias de astrócitos corticais de ratos. Foram testadas concentrações entre 0,1-500µM da MCT, no período de 24 e 72h. O teste do MTT revelou que a MCT não mostrou toxicidade em astrócitos. A coloração de Rosenfeld permitiu evidenciar que os astrócitos tratados com 10-500µM MCT por 72h, apresentaram o corpo celular contraído e desenvolveram finos prolongamentos de tamanho variável, esse efeito foi dose-dependente, e verificado em até cerca de 80% das células tratadas com 500µM MCT. Modificações na expressão da GFAP foram verificadas por marcação imunocitoquímica e western blot, especialmente após 72h de tratamento: a MCT induziu, de forma dose-dependente; modificação na distribuição da GFAP, que ficou mais localizada na região peri-nuclear; e redução de cerca de 40% nos níveis de expressão dessa proteína foi verificada em todas as concentrações testadas. A coloração da cromatina nuclear com Hoechst-33258 revelou que a presença de astrócitos com núcleos picnóticos ou múltiplos nas culturas tratadas com 1-500µM MCT. Estes resultados indicam uma ação direta da MCT em astrócitos corticais de ratos, alterando a morfologia e o crescimento celular, e sugerem que a

resposta astrocitária a este alcalóide pode estar relacionada aos danos no SNC observados em animais intoxicados.

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

SUMMARY

Intoxications with plants of *Crotalaria* genus (leguminosae) have been described in humans and mainly in animals, and more susceptible animals, such as horses, may present nervous clinical signs. In this study we investigated the direct *in vitro* effects of monocrotaline (MCT), the main toxin from *C. retusa*, on astrocyte primary culture. Concentrations ranging from 0.1 to 500µM of MCT were tested by 24 and 72h. According to the MTT test, MCT was not toxic to astrocytes. The Rosenfeld stain showed that astrocytes treated with 10-500µM MCT for 72h 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 500µM MCT. Changes in the GFAP expression were observed by immunocytochemistry and by western blot, especially after 72h treatment: MCT induced, in a dose-dependent manner, changes in GFAP distribution, the presenting thin process; a decrease on GFAP expression (around 40%) was observed in all ranging concentration. The nuclear chromatin stain by

Hoechst-33258 dye revealed condensed or multiple nuclei in astrocytes treated with 1-500 μ M.MCT. Taken together, these results suggests a direct effect of the alkaloid MCT on cortical rat astrocytes, interfering on cellular growth and inducing morphological changes, and suggests that the astrocytes' response to this alkaloid may

be related to CNS damages and neurological signs sometimes showed by *Crotalaria* intoxication in animals.

Keywords: astrocytes, monocrotaline, GFAP, 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 (CHEECKE, 1988). No Brasil já foram encontradas aproximadamente de 40 espécies, sendo, muitas 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 e SAWHNEY, 1973; MATTOCKS, 1986). Essas plantas são ricas em alcalóides pirrolizidínicos (AP) que são 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 contêm nitrogênio em sua estrutura, normalmente formando um anel heterocíclico, o núcleo pirrolizidínico, sendo amplamente disseminados, tanto geograficamente quanto botanicamente (McLEAN, 1970; CHEECKE e SHULL, 1985; PRAKASH et al., 1999). Muitos desses alcalóides são hepatotóxicos e muitos outros são pneumotóxicos, neurotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (CHEECKE, 1988; CHEECKE, 1998; PRAKASH et al., 1999; YAN e 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 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 ele (MATTOCKS, 1986; THOMAS et al., 1996; RIBEIRO et al., 1993; CHEECKE, 1998; MEDEIROS et al., 2000). Equinos intoxicados com MCT, muitas vezes, apresentam sintomatologia nervosa, 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 dessas moléculas de atravessar a barreira hemato-encefálica (YAN e HUXTABLE, 1995). Recentemente, foi demonstrado um comprometimento de astrócitos no núcleo caudato e no córtex de equídeos naturalmente ou experimentalmente intoxicados com *Crotalaria retusa*, sendo evidenciada uma

hiperplasia e formação de núcleos vesiculares nessas células (NOBRE et al., 2004).

Estudos para melhor compreensão dos efeitos biológicos e tóxicos da MCT e seus metabólitos têm sido conduzidos há algumas décadas (ADAMS e ROGERS, 1939; ROSE et al, 1957; SMITH e OSBORN, 1962; WILLIAMS e MOLYNEUX, 1987; RIBEIRO et al.1993; YAN e 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. As células gliais, 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). Essas 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). Já foi demonstrado que astrócitos reagem a danos químicos ou físicos por sofrerem ativação, um fenômeno conhecido como astrogliose (EDDLESTON e MUCKE, 1993; COOKSON e PENTREATH, 1994; MEAD e PENTREATH, 1998; COSTA et al., 2002). A astrogliose é caracterizada pelo acúmulo, hiperplasia e hipertrofia de filamentos intermediários específicos para esse tipo celular, sendo predominantemente formados pela proteína ácida do gliofilamento ou GFAP (COOKSON e PENTREATH, 1994; GOMES et al., 1999).

Tendo em vista as propriedades farmacológicas do alcalóide monocrotalina e, devido à estreita relação entre a sua intoxicação e a presença de sinais clínicos neurológicos em espécies mais sensíveis, tornou-se importante avaliar os efeitos diretos sobre células gliais. Nesse contexto, este estudo foi desenvolvido para

avaliar os efeitos de uma exposição celular direta ao alcalóide MCT, extraído de *C. retusa* em cultura primária de astrócitos corticais de ratos, modelo *in vitro* confiável e largamente utilizado na avaliação das funções dessas células em desordem do SNC e a resposta a agentes externos (COOKSON et al., 1994; ASCHNER, 1998; SANFELIU et al., 1999). Foram avaliadas as propriedades citotóxicas dessa moléculas através de modificações na viabilidade e na morfologia dos astrócitos, bem como a interferência na expressão do marcador estrutural dessas células, a proteína GFAP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da MCT

A MCT foi isolada a partir do extrato aquoso liofilizado de sementes de *Crotalaria retusa* no Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (LAPEMM), segundo método de Culvenor e Smith (1957) modificado. A primeira etapa da extração foi constituída por passagens do extrato aquoso liofilizado em solventes de polaridade crescente, através do extrator de Soxhlet. O extrato aquoso liofilizado foi primeiramente passado em hexano durante 16 h, a fim de que fossem retirados os óleos lipofílicos e a gordura. Em seguida, o substrato foi lavado em etanol por 16 h, com o objetivo de solubilizar os alcalóides presentes. O extrato etanólico (19,71 g) foi filtrado e, através da acidificação com H₂SO₄ 5%, os alcalóides foram transformados em sais. Então a solução foi alcalinizada com NH₄OH até pH 10,5, fazendo com que os alcalóides retornassem à forma livre. Os alcalóides da *Crotalaria retusa* foram extraídos com clorofórmio e concentrados a vácuo até cristalização, resultando em 2,86 g do extrato. Decorrido esse processo, os cristais foram dissolvidos em metanol aquecido e, após resfriamento do solvente, a MCT pura foi recristalizada e depositada no fundo do frasco. O rendimento

foi 1,26 g de MCT por 45 g de extrato aquoso liofilizado, representando 2,8 %. A caracterização da MCT foi realizada por ressonância magnética nuclear do ^{13}C e ^1H , além de espectro infravermelho.

Cultura Primária de Astrócitos

Foram utilizados ratos Wistar neonatos, obtidos do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA). O procedimento esteve de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal. Culturas primárias de astrócitos foram preparadas de acordo com método de Cookson e Pentreath (1994) modificado. Os ratos neonatos foram decapitados, tendo seus hemisférios cerebrais expostos e isolados assepticamente. As meninges e vasos sanguíneos foram retirados do córtex com auxílio de tesouras e pinças e, em seguida, esse foi envolvido em uma membrana de Nitex estéril de $75\mu\text{m}$ ϕ , sendo dissecado mecanicamente com uma tesoura e, as células suspensas em meio Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 100 UI/ml penicilina G, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 0,011 g/L piruvato e 10% soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil). As células foram semeadas em placas de cultura de poliestireno (TPP, Switzerland) de 35 mm ϕ , a uma densidade inicial de 5×10^5 células/placa, e de 100 mm ϕ , a uma densidade de 3×10^6 células/placa, cultivadas em câmara úmida com 5% CO_2 a 37 °C, ao longo de 15 dias até atingirem confluência. A cada 48 h, o meio de cultura foi trocado nas mesmas condições. Como determinado pela imunocitoquímica, utilizando-se anticorpo anti-GFAP, mais de 95% das células da placa foram positivas para GFAP (GFAP⁺).

Tratamentos

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 a -20 °C. No momento do tratamento, a MCT foi diluída no meio de cultura suplementada, em concentrações exponenciais finais entre 0,1 e 500 μM , onde o volume final de DMSO não ultrapassou 0,5% do volume final de meio de cultura. As células foram, então, tratadas durante 24 e 72 h.

Avaliação da viabilidade celular

Após atingirem confluência, os astrócitos cultivados em placas de 100 mm ϕ foram descolados das placas, utilizando-se uma solução de tripsina (EC 3.4.21.4) 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, e replaqueados em poliestireno de 96 poços (TPP, Suíça), a uma densidade de $1,6 \times 10^4$ células/placa. Para avaliar a viabilidade celular foi realizado o teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O teste do MTT (HANSEN et al., 1989) se baseia 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 foi removido e substituído por uma solução de MTT (100 $\mu\text{l/poço}$, Sigma, St Louis, MO) a uma concentração final de 1 mg/ml diluído em DMEM sem suplementos. Para completa dissolução dos cristais de formazan, foi acrescido, após o término do tempo de exposição, um volume de 100 $\mu\text{l/poço}$ 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 porcentagem da viabilidade (média \pm desvio padrão) em relação ao controle.

Avaliação da reatividade astrocitária

Modulação da morfologia de astrócitos

Modificações morfológicas nos astrócitos foram observadas 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°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, Boehinger, 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-se 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 $5\ \mu\text{g}/\text{mle}$ deixada 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), visando detectar modificações morfológicas. O corante foi adicionado às placas, em volume suficiente para cobrir completamente o tapete celular (0,5 ml). Decorridos 3 minutos, adicionou-se 1 ml de água à solução corante, deixando agir por 20 minutos em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com água corrente, secas ao ar e analisadas por microscopia óptica.

Extração de proteínas, western blot e análise da expressão de GFAP

O efeito da MCT sobre a expressão da proteína GFAP também foi avaliado pela técnica de

western blot (WB). Para extração e quantificação de proteínas totais, as células cresceram em placas de $35\ \text{mm}\ \phi$, ao longo de 15 dias. Após atingirem confluência, as células foram moduladas com MCT e as proteínas extraídas. As células foram lavadas duas vezes com PBS e retiradas da placa com um tampão de lise Tris-HCl $62,5\ \text{mM}$ pH 6,8, contendo 2% (p/v) SDS, 2 mM EGTA, 4 M uréia, 0,5% (v/v) Triton X-100 e suplementado com $1\ \mu\text{l}/\text{ml}$ de um coquetel 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, $5\ \mu\text{g}$ de proteínas totais foram separadas por eletroforese ($200\ \text{V}$ 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 $100\ \text{V}$. O bloqueio de sítios inespecíficos das membranas foi realizado com uma solução de Tris salino $20\ \text{mM}$ em pH 7,5, contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) e 1% de BSA (albumina bovina sérica), por uma hora, à temperatura ambiente. Para a análise da expressão de proteínas de astrócitos tratados com a MCT, as membranas foram incubadas por uma hora, sob agitação lenta, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal de camundongo anti-GFAP (1:5.000, Boehringer, Mannheim). Após lavagem em TBS-T, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado à fosfatase alcalina (1:10.000, Promega Corporation, WI, USA), por 30 minutos, sob mesmas condições. Bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando-se o substrato do kit Protoblot II AP System (Promega Corporation, WI), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram

escanadas e a análise densitométrica das bandas imunorreativas foi realizada, por meio do software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health-USA), sendo os resultados 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 (1987). Essa 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

Os efeitos da MCT 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 essa a 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 1A). A análise da viabilidade celular após 72 h de exposição à MCT (Figura 1B) 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 μM e de 10%, a mais tenha sido observado a 10 μM .

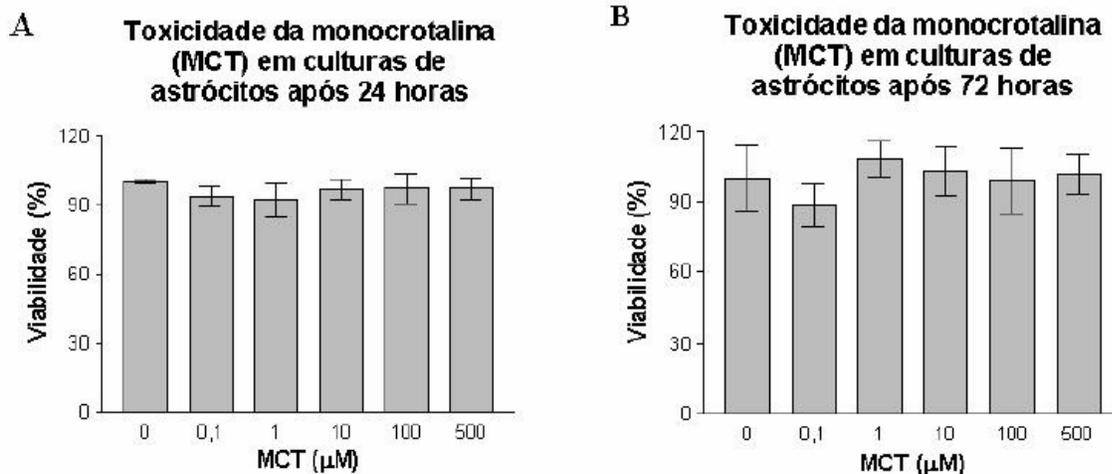


Figura 1 – Teste do MTT em células tratadas com a MCT. A: Comparação entre os tratamentos e controle DMSO após 24 h de exposição pelo teste One way ANOVA. Não houve significância em nenhuma das doses testadas. B: Comparação entre os tratamentos e controle DMSO após 72 h de exposição pelo teste One way ANOVA. Não houve significância em nenhuma das doses testadas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Para demonstrar alterações na morfologia de astrócitos em resposta ao alcalóide MCT, foi

realizada uma coloração das células pelo método de Rosenfeld (1947) nas culturas

primárias de astrócitos corticais de rato. A análise por microscopia óptica das células coradas revelou que, mesmo após 72 h de tratamento, a maioria dos astrócitos expostos a 0,5% DMSO (Fig. 2 A), veículo de diluição da MCT, bem como a 0,1 μ M MCT (dado não mostrado), apresentaram uma forma estrelada típica, com as células apresentando alguns finos processos celulares. A coloração dos astrócitos pode também evidenciar que a MCT, nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M 500 μ M (Fig. 2 B, C e D, respectivamente), foi capaz de induzir mudanças na morfologia dessas células, especialmente verificadas após 72 h de

tratamento. Os astrócitos tratados com 1 μ M MCT, por 72 h, apresentaram somente uma leve tendência a contraírem o corpo celular e a desenvolverem prolongamentos (dado não mostrado). Esse 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 μ M MCT (\pm 45%) e na maioria das células tratadas com 500 μ M MCT (> 80%), que apresentaram o citoplasma totalmente contraído e finos processos celulares de tamanhos variados (Fig.2 C e D, respectivamente).

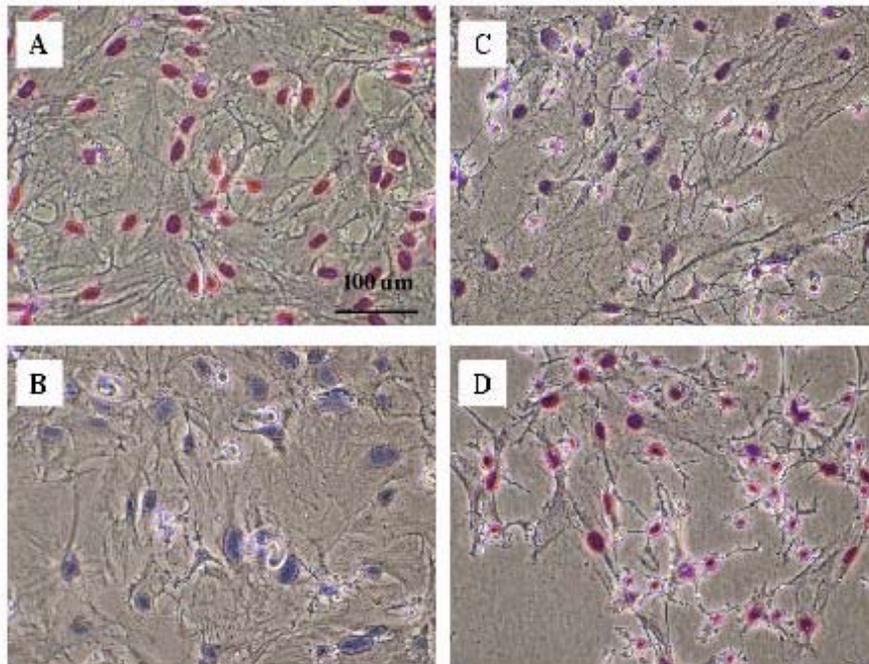


Figura 2 - Fotomicrografia óptica de culturas primárias de astrócitos em condições controle DMSO 0,5% (A) ou expostos à 10 μ M MCT (B), 100 μ M MCT (C) ou 500 μ M MCT (D), por um período de 72 h, e corados pelo método de Rosenfeld. A análise da morfologia permitiu detectar células estreladas e com vários processos celulares, e células com o corpo celular bastante contraído e finos processos de tamanho variável. Objetiva x20.

Para demonstrar a expressão de GFAP, em astrócitos e a reatividade ao alcalóide MCT, 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 o filamento intermediário está distribuído de forma homogênea em mais de 90 % dos astrócitos não tratados (dado não mostrado) ou submetidos à condição controle (0,5% DMSO) durante todo o experimento (Fig. 3 A), considerados GFAP positivos

(GFAP⁺). Por outro lado, a imunomarcaco evidenciou que, quando os astrócitos foram tratados com concentraes crescentes de MCT, houve uma distribuo da GFAP mais perinuclear nos processos celulares, caracterizando um fenótipo mais bipolar das células com o corpo celular contraído e longos processos celulares. Esse fenmeno 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 concentraes mais altas

adotadas (10, 100 e 500 µM) (Figura 3 G, H e I). Ainda, a contra-colorao da cromatina nuclear com o agente intercalante Hoechst 33258 ps em evidência uma sub-populao de células que se apresentou negativa quanto  expressão da GFAP (GFAP⁻), representando 13 a 32% do total de células contadas; células com o núcleo contraído (picnótico) e formao de núcleos múltiplos também foram verificadas (Figura 3 E, F, J, L e M).

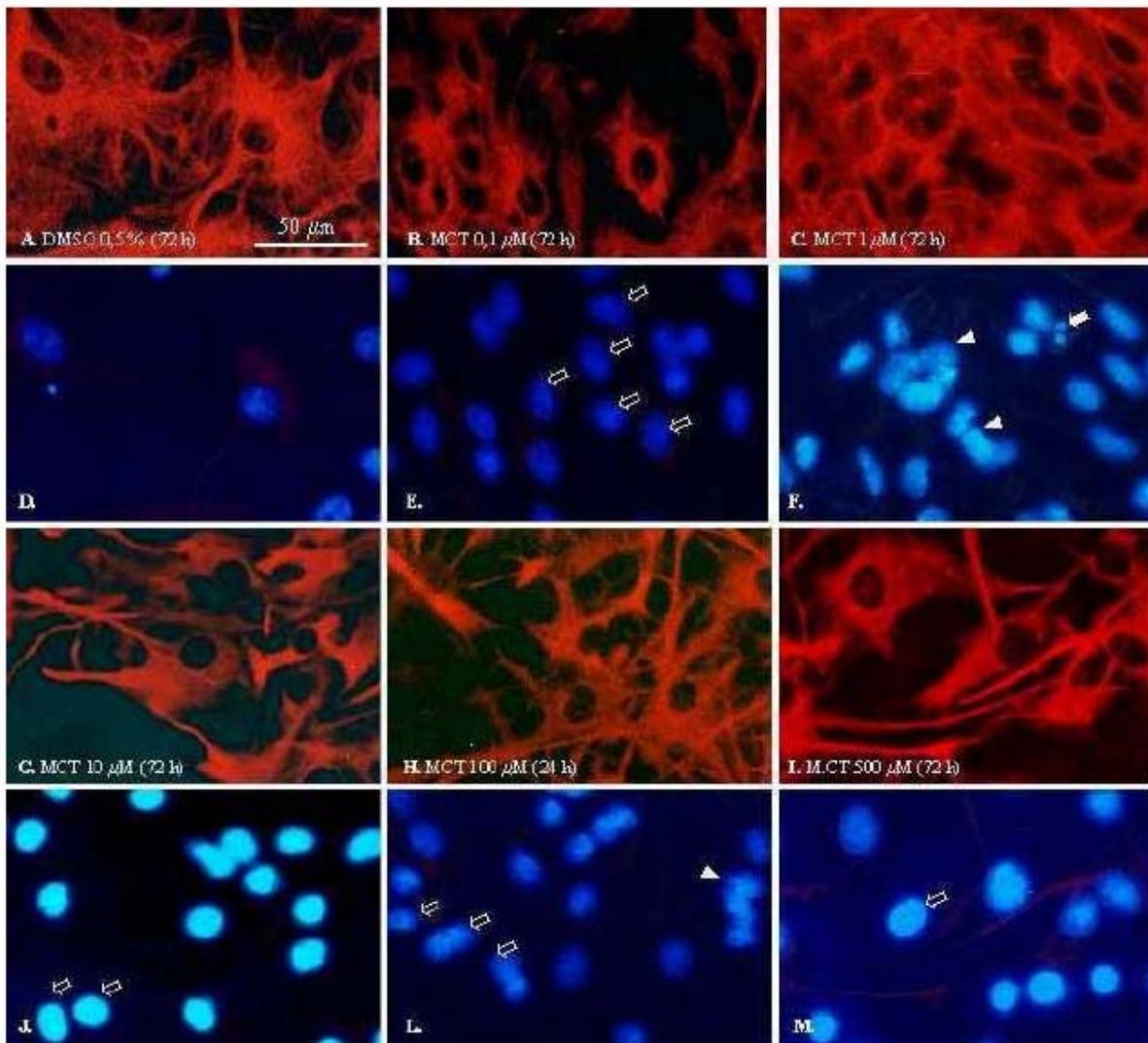


Figura 3 - Fotomicrografia da análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP em astrócitos em condies controle (DMSO 0,5%) ou expostos  MCT (0,1-500 µM) por um período de 72h, e da colorao da cromatina nuclear das mesmas células com o agente intercalante do DNA Hoechst-33258. A colorao da cromatina nuclear permitiu evidenciar células negativas para a GFAP (⇔), bem como células com compactao do núcleo (➔), e com núcleos múltiplos (➤). Objetiva x20.

Visando analisar, de forma semi-quantitativa, as alterações nos níveis de expressão da proteína GFAP em astrócitos corticais de ratos, induzidas pela MCT, 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 comparados aos níveis expressos nos astrócitos em condições controle ou em presença do veículo DMSO (Fig. 4).

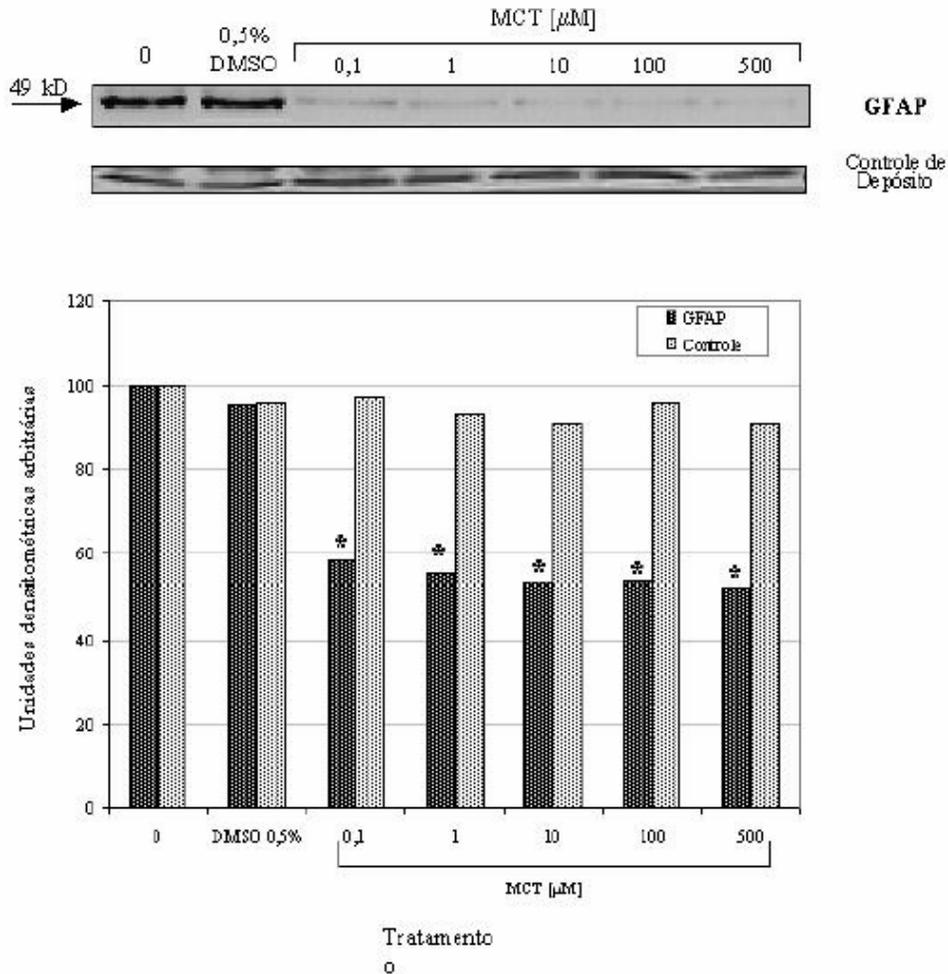


Figura 4 - Análise por Western blot da expressão da proteína do citoesqueleto GFAP em astrócitos em condições controle (DMSO 0,5%) ou tratadas com diferentes concentrações da MCT (0,1 a 500 μM) por 72 h. **A:** Imagem do imunoblot referente à proteína GFAP de 49 kD, de um experimento representativo de três; controle do depósito de proteínas feito através da coloração com nitrato de prata de um gel de eletroforese idêntico ao utilizado para o western blot, aqui representado pelas bandas referentes ao fundo de migração. **B:** Representação da análise densitométrica de um experimento representativo de três; os resultados são expressos em percentual de Unidades densitométricas arbitrárias em relação ao controle (100%).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

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. As concentrações de MCT adotadas neste estudo variaram entre 0,1 e 500 μM , e o tempo de tratamento das células variou entre 24 e 72 h. Esses parâmetros foram adotados em função de abrangerem aqueles adotados em outros estudos *in vitro* com alcalóides pirrolizidínicos, em outros sistemas celulares (THOMAS et al., 1998a; THOMAS et al., 1998b; KIM et al., 1999; WILSON et al., 2000; JI et al., 2002). Com base nos resultados de nosso estudo prévio, utilizando células humanas de origem astrocitária (linhagem GL-15), que revelou-se que a MCT é capaz de induzir a megalocitose e a apoptose (BARRETO, 2002).

Foi observado, 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 dessas células, mesmo na mais alta concentração (500 μM). Além disso, 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, que foi amplificado com o aumento da concentração de MCT. O resultados corroboram com estudos, da mesma autoria deste, sobre ação da MCT em células de glioma de origem astrocitária da linhagem GL-15, que revelando que células gliais são capazes de responder diretamente à MCT (BARRETO, 2002).

Já está bem estabelecido que alterações em astrócitos podem ser usadas como marcadores para vários tipos de danos no sistema nervoso (COOKSON et al., 1994). Entre essas

alterações, particularmente um conjunto de respostas hiperplásicas e hipertróficas, conhecido 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 das células a uma diversidade de compostos, entre esses, por exemplo, o ácido caínico (RATABOUL et al., 1989), o acetato de chumbo (LUTHMAN et al., 1991) e a trimetilina (O'CALLAGHAN e JANSEN, 1992). Enquanto o aumento na expressão da GFAP possa estar associado à astrogliose, à reação a danos físicos, e mesmo, à neurodegeneração (TARDY et al., 1991; COYLE e SCHWARCZ, 2000; COSTA et al., 2002), a diminuição nos níveis de expressão pode ser um indicativo de que a sinaptogênese e a transmissão anormais (O'CALLAGHAN, 1991; RAJKOWSKA et al., 2002; MOISES et al., 2002). Nós observamos que os astrócitos expostos à MCT, em todas as concentrações testadas (0,1-500 μM), apresentaram uma redução significativa nos níveis de expressão da GFAP, verificados tanto pelo western immunoblot quanto pela marcação imunocitoquímica. Não foram evidenciadas bandas imunorreativas para a GFAP, que aparecendo com uma intensidade muito fraca na marcação do western blot, quando comparadas às condições controle. 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 e PENTREATH, 1994) e com organotinas trimetilina, trietilina e tributilina (ROHL et al., 2001). Esses achados sugerem que fenômenos distintos dose-dependentes podem ser desencadeados nas células tratadas com o alcalóide na sua forma nativa (MCT).

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 . Os resultados mais uma vez corroboram com os estudos realizados nas células gliais da linhagem GL-15, que evidenciaram células com núcleos múltiplos após tratamento com 1-10 μM MCT e megalocitose. Modificações nos núcleos dessa natureza, 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). A condensação da cromatina, por outro lado, foi evidenciada através da coloração de Rosefeld e Hoechst-33258 em astrócitos tratados com a mais alta concentração de MCT adotada (500 μM), sugerindo-se que essas células estavam entrando em um estado de apoptose. 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). Como a apoptose é um processo complexo, altamente estruturado e especificamente regulado por vários genes (JACOBSON, 1997), estudos complementares são necessários à cerca dos mecanismos envolvidos nesse processo, podendo ser associados aos efeitos do alcalóide MCT.

Um dos elementos clássicos que tem sido descrito como característico 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 nessas células: um estímulo à regeneração após lesão do parênquima e a ação antimitótica dos pirróis, produto do metabolismo de APs (MATTOCKS, 1986). Tem sido sugerido que a formação de megalocitose é o resultado da ação do metabólito pirrólico DHMC, principal metabólito da MCT (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 e MATTOCKS, 1988; PRAKASH et al., 1999). Uma outra importante propriedade que tem sido atribuída a produtos do metabolismo de APs, tal como a DHMC, é a capacidade que essas moléculas possuem de 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 se ligar ao DNA e à proteína actina do citoesqueleto de células renais e de carcinoma de seio, propriedade que foi correlacionada às atividades citotóxicas, antimitóticas e hiperplásicas de alcalóides pirrolizidínicos e metabólitos (HINCKS et al., 1991; KIM et al., 1999). A presença de isoformas de citocromos P450 no SNC tem sido descrita em diferentes espécies, inclusive em ratos (GHERSI-EGEA et al., 1988; NICHOLSON e RENTON, 1999) e em células de glioblastoma de origem astrocitária (GENG e STROBEL, 1998). Ainda que a atividade dos citocromos P450 presentes no cérebro corresponda 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 e GUSTAFSSON, 1995; STROBEL et al., 1995; GENG e STROBEL, 1998, MINN et al., 2000). O pirrol DHMC é facilmente oxidável e apresenta meia vida curta em meio aquoso, no entanto, já foi encontrado ligado ao tecido do cérebro de ratos experimentalmente intoxicados (YAN e HUXTABLE, 1995). Nesse sentido, pode-se sugerir que esse composto esteja sendo produzido no local onde se dá a ligação ao tecido. Como em nossos achados as alterações nos astrócitos expostos à MCT foram observadas de forma dose-dependente e 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 a resposta celular expressa em modificações morfológicas com alteração na expressão da proteína do citoesqueleto GFAP. Estudos utilizando drogas dependentes 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). 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 esterasas, gerando o derivado retronecina, seja conjugação com o glutation, gerando o conjugado pirrol-glutationa; a retronecina também pode ser oxidada pelo sistema P450 gerando o metabólito secundário

reativo dehidroretronecina. Nesse caso os efeitos observados nos astrócitos expostos à MCT podem também ser o resultado da ação adicional do conjunto de metabólitos gerados nessas células.

Ainda que danos em células gliais tenham sido descritos e indiretamente associados à intoxicação pela *C. retusa*, pouco se sabe como essas células reagem aos seus principais componentes tóxicos, e se estão envolvidas nos fenômenos neuropatológicos desencadeados. O conjunto dos resultados aqui expostos revela que astrócitos corticais de ratos respondem, de forma direta, ao alcalóide pirrolizidínico MCT, alterando o crescimento celular e induzindo modificações fenotípicas com regulação do seu principal componente do citoesqueleto, as proteínas dos filamentos intermediários GFAP. Estudos complementares, no entanto, deverão ser desenvolvidos para esclarecer sobre como esses efeitos são desencadeados em astrócitos e possível relação com os danos observados no SNC e com aparecimento de sinais clínicos em animais intoxicados.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). Agradecemos o apoio técnico concedido pelo Sr. Carlos Alberto Rodrigues.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.; ROGERS, E.F. The structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. **J Am Chem Soc** v.61, p.2815-2819, 1939.

ATAL, C.K.; SAWHNEY, R.S. The pyrrolizidine alkaloids from Indian *Crotalarias*, **Indian J Pharm** v.35, p.1-12, 1973.

BARRETO, R.A. **Efeitos do alcalóide Monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, sobre sobre células do sistema nervoso central com fenótipo astrocitário:** toxicidade, modificações do crescimento e na expressão da proteína do citoesqueleto GFAP. 2002. 55f. Monografia- Graduação-Universidade Federal da Bahia, Escola de Med. Vet. Salvador.

BLUM, H.; BEIER, H.; GRASS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BULL, L.B. The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids. **Aust Vet J** v.31, p.33-40, 1955.

CHEEKE, P.R.; SHULL, L.R. **Natural toxicants in feeds and poisonous plants.** Westport (Conn): AVI Publishing Company, 1985.

CHEECKE, P.R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **J Anim Sci** v.66, p.2343-2350, 1988.

CHEECKE, P.R.. **Natural toxicants in feeds, forages and poisonous plants.** 2.ed. Danville (OH): Interstate Publishers, 1998.

COSTA, S.L.; PLANCHENAULT, T.; CHARRIERE-BERTRAND, C.; MOUCHEL, Y.; FAGES, C.; SHARON, J.; LEFRANÇOIS, T.; BARLOVATZ-MEIMON, G.; TARDY, M.; Astroglial permissivity for neurotic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of lamini bioavailability. **Glia**, v.37, p.105-13, 2002.

COOKSON, M.R.; PENTREATH, V.W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxic in Vitro** v.8, n.3, p.351-9, 1994.

COPPLE, B.L.; RONDELLI, C.M.; MADDOX, J.F.; HOGLEN, N.C.; GANEY, P.E.; ROTH, R.A.. Modes of cell death in rat liver after monocrotaline exposure. **Toxicol Sci**, v.77, n.1, p.172-82, 2004.

COULOMB JR., R.A.; DREW, G.L.; STERMITZ, F.R. Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.154, p.198-202, 1999.

COYLE, J.T.; SCHWARCZ, R. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. **Arch Gen Psychiatry**, v.57, n.1, p.90-93, 2002.

CULVENOR, C.C.J.; SMITH, L.W. The alkaloids of *Crotalaria retusa* L. **Aust J Chem**, v.10, p.464-473, 1957.

CULVENOR, C.C.J.; DANN, A.T.; DICK, A.T. Alkylation as the mechanism by which the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids act on cell nuclei. **Nature**, v.195, n.4841, p.570-573, 1962.

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

GENG, J.; STROBEL, H.W. Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monooxygenase system in the rat glioma C6 cell line. **Brain Res**. v.16, n. 784, p.276-83, 1998.

GHERSI-EGEA, J.F.; 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**, v.42, n.24, p.2515-23, 1988.

GOMES, F.C.A.; PAULIN, D.; MOURA-NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med Biol Res**, v.32, p.619-31, 1999.

HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods**, v.119, p.203-10, 1989.

HASEL, K.M.; SUMMERS, B.A.; DE LAHUNTA, A. Encephalopathy with idiopathic hyperammonaemia and Alzheimer type II astrocytes in equidae. **Equine Vet J**, v.31, n.6, p.478-82, 1999.

HINCKS, J.R.; KIM, H.Y.; SEGALL, H.J.; MOLYNEUX, R.J.; STERMITZ, F.R.; COULOMBE, R.J. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure-activity relationships. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.111, p.90-98, 1991.

HOEHNE, F.C. Leguminosas papilionaceas: *Crotalaria* e *Lupinus*. In: _____. (ed.). **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939. p.137.

HUXTABLE R.J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmac Ther**, v.47, p.371, 1990.

HUXTABLE, R.J.; YAN, C.C.; WILD, S.; MAXWELL, S.; COOPER, R. Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. **Neurochem Res**, v.21, n.2, p.141-6, 1996.

JACOBSON, M.D. Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. **Curr Biol**. v.7, n.5, p.277-281, 1997.

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**, v.40, p.1685-1690, 2002.

JI, L.L., ZHANG, M.; SHENG, Y.C.; WANG, Z.T. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induces apoptosis in human normal liver L-02 cells and reduces the expression of p53 protein. **Toxicol in Vitro**, v.19, n.1, p.41-6, 2005.

KANDEL, E.R. Nerve cells and behavior. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. (ed). **Principles of neural science**. 4. ed. New York, 2000.

KIM, H.Y.; STERMITZ, F.R.; LI, J.K.K.; COULOMBE, R.A. Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids. **Food Chem Toxicol**, v.37, p. 619-625, 1999.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUG, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265-75, 1951.

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**, v.65, n.3, p.333-46, 1991.

MATTOCKS, A.R. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal. In: _____. (ed.). **Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids**. New York: Academic Press, 1986.

MATTOCKS, A.R.; JUKES, R.; BROWN, J. Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. **Toxicol**, v.27, n.5, p.561-567, 1989.

MCLEAN, E.K. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Pharm Ver**, v.22, p.429-483, 1970.

MEAD, C.; PENTREATH, V.W.. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. **Toxicol in vitro**, v.12, p.141-52, 1998.

MEDEIROS, R.M.T.; GÓRNIK, S.L.; GUERRA, J.L. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. **J Ethnopharmacol**, v.69, p.181-188, 2000.

MEYER, R.P.; 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**, v.167, n.2, p.376-84, 2001.

MINN, A., EL-BACHÁ, R.S.; BAYOL-DANIZOT, C.; LAGRANGE, P.; SULEMAN, F.G.; GRADINARU, D. Drug metabolism in the brain: benefits and risks. In: BEGLEY, D.J.; BRADBURY, M.W.; KREUTER, J. **The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS**. New York, 2000, p.145-169.

MOISES H.W.; ZOEGA T.; GOTTESMAN I. I. The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia, **BMC Psychiatry** v.2, p.8, 2002.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, function and roles in diseases. **Vet Pathol**, v.31, p.145-167, 1994.

NICHOLSON, T.E.; RENTON, K.W. Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. **Brain Res** v.827, p.12-18, 1999.

NOBRE, V.M.T.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A.F.M.; BARBOSA FILHO, J.M.; TABOSA, I.M.; VASCONCELOS, J.S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesq Vet. Bras.**, v.24, n.3, p.132-143, 2004.

NORTON, W.T.; AQUINO, D.A.; HOZUMI, I.; CHIU, F.C.; BROSNAN, C.F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochemical Research** v.17, p.877-85, 1992.

O'CALLAGHAN, J.P.; JENSEN, K.F. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v.13, n.1, p.113-22, 1992.

PRAKASH, A.S.; PEREIRA, T.N.; REILLY PE; SEAWRIGHT, A.A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutat Res.**, v.5, p.53-67, 1999.

RAJKWOSKA, G.; MIGUEL HIDALGO, J.J.; MAKKOS, Z.; MELTZER, H.; OVERHOLSER, J.; STOCKMEIER, C. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. **Schizophr Res.** v.57, n.2-3, p.127-38, 2002.

RATABOUL, P.; VERNIER, P.; BIGUET, N.F.; MALLET, J.; POULAT, P.; PRIVAT, A. Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat. **Brain Res Bull**, v.22, n.1, p.155-61, 1989.

RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.R, BAUTISTA, A.R., COSTA, S.L.; SALES, L.A.; RIOS, A.C.;

SALVADORI, D.M. Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. **Mutat Res**, v.300, p.253-258, 1993.

ROHL, C.; GULDEN, M.; SEIBERT, H. Toxicity of organotin compounds in primary cultures of rat cortical astrocytes. **Cell Biol Toxicol.**,v.17, n.1, p.23-32, 2001.

ROSE, A.L.; GARDNER, C.A.; MCCONNELL, J.D.; BULL, L.B. Field and experimental investigation of "walk about" disease of horses (Kimberley horse disease) in Northern Australia: *Crotalaria* poisoning in horses. **Aust Vet J.**, v.33, p.25-33, 1957.

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

SAMUEL, M.V.J. Localization in the cell cycle of the antimetabolic action of the pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine and of its metabolite, dehydroheliotridine. **Chem Biol Interact.**, v.10, n.3, p.185-197, 1975.

SKILLETER, D.N.; MATTOCKS, A.R.; NEAL, G.E. Sensitivity of different phases of the cell cycle to selected hepatotoxins in cultured liver-derived (BL9L) cell. **Xenobiotica**, v.18, n.6, p.699-705, 1988.

SMITH, F.H.; OSBORNE, J.C. Toxic effects of *Crotalaria* seed. **Vet Med**, v.57, p.237-237, 1962.

STROBEL, H.W.; KAWASHIMA, H.; GENG, J.; SEQUEIRA, D.; BERGH, A.; HODGSON, A.V.; WANG, H.; SHEN, S. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. **Toxicol Lett.**, v.82-83, p.639-43, 1995.

TARDY, M. Astrocyte et Homeostasie. **Médecine Science**, v.8, n.7, p.799-804, 1991.

THOMAS, H.C.; LAME, M.W.; WILSON, D.W.; SEGALL, H.J. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to

pulmonary artery endothelial cell DNA. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.141, n.1, p.319-29, 1996.

THOMAS, H.C.; LAMÉ, M.W.; DUNSTON, S.K.; SEGALL, H.J.; WILSON, D.W. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.151, p.236-244, 1998a.

THOMAS, H.C.; LAMÉ, M.W.; MORIN, D.; DUNSTON, S.K.; WILSON, D.W.; SEGALL, H.J. Prolonged Cell-cycle arrest associated with altered cdc2 kinase in monocrotaline pyrrole-treated pulmonary artery endothelial cells. **Am J Resp Cell Mol Biol**, v.19, p 129-142, 1998b.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. In: _____, (ed.) **Plantas Tóxicas do Brasil**, 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000, p.240-242.

TRAVIS, J. Glia: the brain's other cells. **Science**, v.266, p.970-972, 1994.

WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Cytochrome P450 in the brain: neuroendocrine functions. **Front Neuroendocrinol**, v.16, n.3, p.224-36, 1995.

WILLIAMS, M.C.; MOLYNEUX, R.J. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Sci**, v.35, p.476-481, 1987.

WILSON, D.W.; LAMÉ, M.W.; DUNSTON, S.K.; SEGALL, H.J. DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human artery endothelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.166, p. 69-80, 2000.

YAN, C.C.; HUXTABLE, R.J. The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and trichodesmine, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. **Toxicol**, v.33, p. 627-634, 1995.