

## EFEITOS DA DEHIDROMONOCROTALINA NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

Aline Buda dos Santos; Fábio Erminio Mingatto; Patrícia Domenici; Daniel Junqueira Dorta; Carlos Curti; Antonio Cardozo dos Santos - Zootecnia – Curso de Zootecnia – Faculdade de Zootecnia - Campus de Dracena.

No Brasil são conhecidas mais de 80 espécies de plantas tóxicas para herbívoros (Tokarnia et al. 2000) que causam perdas econômicas, por conceito de mortes de animais, estimadas entre 160 e 224 milhões de dólares (Riet-Correa & Medeiros 2001). Consideram-se tóxicas todas as plantas que, ingeridas espontânea ou acidentalmente pelo animal, podem aduzir danos refletindo na sua saúde ou vitalidade. A profilaxia e o controle das intoxicações por plantas no Brasil tem-se resumido apenas ao conhecimento dos fatores associados às plantas, aos animais, ao ambiente ou ao manejo que determinam a ocorrência, frequência e distribuição geográfica das intoxicações.

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (Guillouzo, 1998). A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada principalmente pelo citocromo P450. Em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio; estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia. A mitocôndria participa na regulação de vários aspectos da biologia celular, tais como produção de energia, estado redox, metabolismo molecular, homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e morte celular representando um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio e no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (Mingatto et al., 2000). Monocrotalina (MCT) é um alcalóide pirrolizidínico (PA) presente em várias espécies de plantas leguminosas do gênero *Crotalaria*. Vários casos de intoxicação por essa substância têm sido descritos (Huxtable, 1989). Normalmente, animais e pessoas expostas apresentam hepatomegalia e doença veno-oclusiva do fígado e estão sujeitos à sua ingestão, uma vez que suas sementes podem ser, inadvertidamente colhidas com diversas culturas como milho, soja e sorgo e aparecerem em suas rações (Souza et al., 1997). É sabido que os efeitos tóxicos da monocrotalina envolvem a sua bioativação pelos citocromos P450 hepáticos gerando a dehidromonocrotalina (Schultze & Roth, 1998), mas o mecanismo preciso de toxicidade ainda é desconhecido. A elucidação do mecanismo de hepatotoxicidade da monocrotalina, portanto, seria uma importante contribuição para a descoberta de substâncias que possam ser utilizadas no tratamento de humanos e animais expostos a essa substância. De acordo com os fatores citados acima estudamos os efeitos da monocrotalina sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato, com relação a parâmetros associados à bioenergética para tentar esclarecer seu mecanismo de toxicidade.

Monocrotalina (MCT) foi adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e o seu metabólito dehidromonocrotalina (DHM) foi sintetizada de acordo com Mattocks et al., 1989. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. Ratos Wistar machos de 180-200 g foram sacrificados por decaptação e o fígado foi imediatamente removido. A proteína mitocondrial foi determinada utilizando-se a reação do biureto, de acordo com Cain & Skilleter (1987), e BSA como padrão. O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi medido usando um medidor de oxigênio dissolvido (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) equipado com um eletrodo do tipo Clark. O potencial de membrana das mitocôndrias (2 mg de proteína) foi determinado espectrofluorimetricamente com o indicador safranina O  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , utilizando-se um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 (Tóquio, Japão), em 505 e 535 nm para

excitação e emissão, respectivamente (volume final de 2 mL). Para avaliar o efeito da MCT e DHM sobre a síntese de ATP, as mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mmol L<sup>-1</sup> + malato 5 mmol L<sup>-1</sup> foram incubadas na presença de diferentes concentrações das drogas e após 10 minutos de incubação. A quantidade de ATP foi medida utilizando-se o sistema luciferina-luciferase por meio do “ATP BIOLUMINESCENT ASSAY KIT” (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). O efeito da DHM sobre a atividade da NADH-desidrogenase foi avaliado usando-se partículas submitocondriais.

Nas concentrações testadas (50 a 250 µmol L<sup>-1</sup>) a MCT não apresentou efeitos de estimulação sobre a respiração de estado 4 e nem de inibição da respiração de estado 3, seja em mitocôndrias energizadas com glutamato + malato, substratos de sítio I da cadeia respiratória, ou com succinato, substrato de sítio II (resultados não apresentados). No mesmo sentido, nas mesmas concentrações, a MCT não dissipou significativamente o potencial de membrana mitocondrial. A DHM inibiu a respiração de estado 1, na faixa de concentração de 50 a 250 µmol/L, e de estado 3 das mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mmol L<sup>-1</sup> + malato 5 mmol L<sup>-1</sup> em concentrações dose-dependentes e não apresentou nenhum efeito de estímulo sobre a respiração de estado 4, promoveu uma diminuição no potencial de membrana e inibiu a atividade da NADH-desidrogenase também em uma faixa de concentração de 50 a 250 µmol/L. Ainda na mesma faixa de concentração, a DHM inibiu a síntese de ATP. Efeito semelhante foi encontrado na análise do potencial de membrana das mitocôndrias incubadas com glutamato + malato, mostrando que a DHM foi capaz de dissipar o potencial eletroquímico de maneira dose-dependente. Os níveis mitocondriais de ATP foram avaliados 10 minutos após a incubação das mitocôndrias com a MCT e a DHM, nas mesmas condições da respiração mitocondrial, usando-se glutamato + malato como substratos oxidáveis. Os resultados mostram que em concentrações de 50 a 200 µmol L<sup>-1</sup>, DHM, mas não MCT, propicia uma significativa queda nos níveis mitocondriais de ATP. Os presentes resultados mostram que a monocrotalina não exerce efeitos sobre a bioenergética, uma vez que quando as mitocôndrias foram incubadas na presença dessa substância não foram observadas alterações nos parâmetros de consumo de oxigênio, potencial de membrana e níveis de ATP.

Já com relação ao seu metabólito dehidromonocrotalina, o qual tem sido apontado como o principal responsável pelos efeitos tóxicos da monocrotalina (Pan et al., 1993), os resultados obtidos mostram que essa substância interfere na produção mitocondrial de ATP, uma vez que é capaz de inibir a respiração mitocondrial de estado 3 na presença de glutamato + malato e a atividade da NADH-desidrogenase indicando que sua ação ocorre ao nível do complexo I da cadeia respiratória. Em adição a essa observação, a dehidromonocrotalina também foi capaz de dissipar o potencial de membrana das mitocôndrias.

Nesse sentido, como observado no presente estudo, o nível celular de ATP foi afetado pela dehidromonocrotalina, sugerindo que sua diminuição seja, pelo menos em parte, responsável pela citotoxicidade apresentada pela monocrotalina. Além disso, também indica que o efeito tóxico apresentado pela monocrotalina é dependente do seu metabolismo hepático.

## Referências Bibliográficas

CAIN, K. & SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: **Biochemical Toxicology**, (Ed. Snell, K.; Mullock, B.), IRL Press, Oxford, p. 217-254, 1987.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. **Environ. Health Perspect.**, Washington, v.106, supl. 2, p.511-532, 1998.

HUXTABLE, R.J. Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. In: **Toxicants of Plant Origin** (Ed. Cheeke, P.R.), CRC Press, Boca Raton, FL, v.1, p.41-86, 1989.

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

MINGATTO, F.E.; SANTOS, A.C.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A.A.; UYEMURA, S.A.; CURTI, C. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. *B. J. Pharmacol.*, v. 131, p.1154-1160, 2000.

PAN, L.C.; WILSON, D.W.; LAME, M.W.; JONES, A.D.; SEGALL, H.J. COR pulmonale is caused by monocrotaline and dehidromonocrotaline but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrolizine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.118, p.87-97.

RIET-CORREA F. & MEDEIROS R.M.T. 2001. Intoxicações por plantas no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, v. 21(1):38-42.

SCHULTZE, A.E.; ROTH, R.A. Chronic pulmonary hypertension-the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J. Tox. Environ. Health B Crit. Rev.*, v.1, 271-346, 1998.

SOUZA, A.C.; HATAYDE, M.R.; BECHARA, G.H. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, v.17 (1), p.12-18, 1997.

TOKARNIA C.H., DOBEREINER J. & Peixoto P.V. 2000. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, p.215-221.

**Bolsa:** FAPESP