

DANO HISTOLÓGICO RENAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA VENTRICULAR DIREITA INDUZIDA POR MONOCROTALINA

RENAL HISTOLOGICAL DAMAGE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF MONOCROTALIN-INDUCED RIGHT VENTRICULAR HYPERTROPHY

Douglas Mesadri GEWEHR^{1,2}, Matheus SCHICK¹, Jorge LEITE¹, Fernando Bermudez KUBRUSLY², Allan Fernando GIOVANINI^{1,2}, Aristides Schier DA CRUZ¹, Eduardo Bolicenha SIMM¹, Flavia Vernizi ADACHI¹, Luiz Fernando KUBRUSLY^{1,2}

REV. MÉD. PARANÁ/1634

Gewehr DM, Schick M, Leite J, Kubrusly FB, Giovanini AF, da Cruz AS, Simm EB, Adachi FV, Kubrusly LF. Dano histológico renal em modelo experimental de hipertrofia ventricular direita induzida por monocrotalina. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2021;79(Supl. 1):8-11.

RESUMO - Monocrotalina, alcalóide tóxico obtido de plantas do gênero *Crotalaria*, pode ter potencial efeito tóxico em órgãos do corpo humano, como rins, pulmões, coração, fígado e outros efeitos. O objetivo deste estudo foi avaliar o dano renal causado pela exposição à monocrotalina. Trata-se de estudo experimental em ratos divididos em 4 grupos, um dos quais recebeu injeção de soro fisiológico e os outros três inoculação de monocrotalina, com tempos diferentes para sacrifício; subsequentemente, estudo histológico foi feito a fim de evidenciar as lesões renais. Em conclusão, constatou-se que houve lesão renal. Contudo, não foi possível afirmar o mecanismo exato responsável por elas, ou seja, se foram decorrentes da ação tóxica direta da monocrotalina, ou se, também, esteve relacionado a outros fatores sistêmicos.

DESCRITORES - Hipertensão arterial pulmonar. Dano renal. Monocrotalina.

INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Crotalaria* pertencem à família Leguminosae e contêm mais de 600 espécies^{4,18}. Desenvolvem-se principalmente em zonas tropicais e subtropicais. As espécies são oportunistas, muito comuns em locais alterados como margem de estradas e como invasoras, encontradas com facilidade em plantações de grãos e em pastagens⁶.

Dentre essas mais de 600 espécies, existem algumas variedades tóxicas, as mais conhecidas são *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria crispata*, *Crotalaria retrusa*, *Crotalaria dura* e *Crotalaria globifera*, das quais são obtidos alcalóides pirrolizidínicos tóxicos como a monocrotalina (MCT), o principal desses alcalóides¹⁴.

Na literatura há relatos de toxicidade induzida por MCT em diversos órgãos, como fígado, pulmões, rins, coração, além de efeitos teratogênicos e carcinogênicos^{5,15,16,20,22}. Além de atividade depressora do sistema nervoso central que foi demonstrada em um estudo com ratos¹¹. Em relação a função pulmonar, foi evidenciado que MCT pode causar trombose capilar alveolar, especialmente nas artérias pequenas e médias. Já o coração, pode sofrer aumento significativo, mas limitado ao ventrículo direito. Essas lesões em associação ainda sugerem a presença de doença pulmonar e hipertensão⁹. Quanto aos rins, apesar de descritas poucas alterações, descreve-se que a partir da MCT podem aparecer a mesangiólise ou ainda aneurismas de vasos glomerulares¹³. Citocromos hepáticos P450, como os CYP3A, CYP2B, e CYP2C, estão envolvidos na sua metabolização, formando intermediários altamente reativos tipo pirrólicos que são responsáveis pela ligação cruzada do DNA-DNA e DNA-proteína, além da hepatotoxicidade e pneumotoxicidade⁷. O metabólito produzido ao final do processo e responsável pela toxicidade da MCT é a dehidromonocrotalina. A função precisa da metabolização hepática na toxicidade renal induzida por ela não é bem estabelecida²¹. Entretanto, um estudo

utilizando ratos medicados com inibidores de CYP3A, e modificados geneticamente com ausência do citocromo P450 específico do fígado, não apresentaram toxicidade hepática e renal pela MCT, diferentemente de ratos normais submetidos ao mesmo processo¹⁷.

Dada a grande gama de órgãos que potencialmente podem ser atingidos pelos efeitos da MCT, e a importância clínica das lesões renais que poderiam ser causadas em decorrência dela, o presente estudo teve por objetivo realizar análise anatomopatológica da injúria renal em ratos expostos a MCT.

MÉTODO

Este estudo é experimental e foram respeitadas as normas estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal. O estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, registrado sob o protocolo n. 2578/2020.

É estudo qualitativo-quantitativo e foi realizada a indução de injúria renal por inoculação de MCT assim como simulação da inoculação nos animais do grupo controle.

Animais e métodos

Cinquenta ratos machos Wistar, da espécie *Rattus norvegicus*, pesando entre 250-300 g, foram randomicamente distribuídos em quatro grupos: 1) grupo controle (GC, n=10) animais que receberam uma injeção intraperitoneal de solução fisiológica (1 ml/kg 0,9%) no dia de início do experimento (D0); 2) grupo 15 dias (MCT15, n=10) inoculado com MCT e sacrifício após 15 dias; 3) grupo 30 dias (MCT30, n=10) inoculado com MCT e sacrifício após 30 dias; 4) grupo 37 dias (MCT37, n=20) inoculado com MCT e sacrifício após 37 dias.

Delineamento experimental

No início do experimento (D0) todos os animais tiveram seus pesos aferidos. Os dos grupos G15, G30 e G37 receberam injeção i.p. (60 mg/kg) de MCT (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,EUA)⁸ dissolvida em solução fisiológica (0,9%), enquanto os animais do GC receberam injeção i.p.de solução fisiológica (0,9%).

No dia 37 do experimento (D37), após a anestesia com uma combinação de 0,3 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% e 10 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% i.p.⁸, os animais foram pesados e posteriormente sacrificados através de exsanguinação por punção cardíaca. Por fim, foi conduzida a retirada de ambos os rins, os quais foram pesados em balança semi-analítica de precisão.

Preparação das amostras histológicas

Os rins foram excisados e fixados coletados em solução de formalina tamponada a 10% por 48 h. Após a fixação completa, eles foram cortados em seu maior eixo longitudinal, incorporados em blocos de parafina, sendo obtida uma seção histológica de 4 micrômetros para cada segmento. Todas as seções foram montadas em lâminas de vidro e coradas com H&E, metenamina de prata de Jones e ácido periódico de Schiff (PAS). Foi selecionada a lâmina do rim que apresentava lesão ou aquela que apresentava maior quantidade de lesões em comparação ao rim contralateral. A avaliação das lâminas foi realizada por um patologista experiente que não teve acesso aos dados clínicos e aos resultados dos experimentos.

Análise histológica das amostras

Utilizou-se como base a graduação dos achados histopatológicos renais proposta por Kubiak et al.¹². As lâminas foram examinadas quanto à presença dos achados pré-definidos, bem como a sua classificação no grau 0 quando não tinha sido encontrada lesão na lâmina; grau 1, presença esporádica do achado; graus 2 (1/2) e 3 (3/4) da lâmina com a lesão; grau 4 foi definido quando todo o corte estava afetado. Os achados histopatológicos levantados incluíram: edema intersticial (perivascular e peritubular), degeneração tubular (espaço paracelular, perda do bordo em escova, apoptose tubular, destacamento da membrana basal), necrose tubular, infiltrado leucocitário, alterações glomerulares, mesangiólise e descamação epitelial.

Apenas dois grupos tiveram infiltração leucocitária e alterações glomerulares. A graduação da infiltração foi: grau 1, presença de leucócitos esporádica, espalhada e não agrupada; grau 2, focalizada em grupos densos; grau 3, além dos focos densos quadros espalhados; grau 4, grande infiltração por todo o corte da lâmina. Com relação às alterações glomerulares definiu-se: grau 0, não havia ocorrência de lesão; grau 1, encontrado apenas leve aumento glomerular; grau 2, lesão tubular com necrose; grau 3, concomitância dos graus 1 e 2.

Análise estatística

Os dados foram analisados com o software SPSS (Statistical Packages for Social Sciences), primeiramente com teste de normalidade para as variáveis analisadas. Em sequência foram realizadas as análises descritivas de dados por grupo (média e desvio-padrão). Seguindo, foram aplicados testes não paramétricos devido condição das variáveis não seguirem distribuição de probabilidade normal. Para evidenciar diferença média significativa entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, e para cada variável significativa, foi verificado diferença entre os pares de grupos, em todas

as variáveis. Para fins estatísticos, foram consideradas como alterações significativamente relevantes aquelas que obtiveram p-valor $\leq 0,05$ de acordo com o teste de Kruskal Wallis.

RESULTADOS

As alterações histológicas semiquantitativas glomerulares, tubulares e intersticiais observadas no GC e nos grupos MCT durante o experimento estão registradas na tabela 1.

Nas fotomicrografias de tecido renal dos animais do GC, não foram observadas alterações significativas glomerulares, tubulares, intersticiais ou arteriolares (Figura 1).

Alterações glomerulares

Nos grupos MCT foi registrado apenas 2 padrões de lesão glomerular, a hipertrofia glomerular e a mesangiólise (Figura 2). Foi constatado aumento significativo da hipertrofia glomerular nos grupos MCT30 e MCT37 em relação ao GC. Em contrapartida, a mesangiólise só foi observada no MCT37, em baixa frequência, não havendo diferença estatisticamente significativa.

Alterações tubulares

Nos grupos MCT foi constatado a presença de espaços paracelulares e descamação epitelial já a partir do grupo MCT15, com aumento progressivo e significativo nos grupos MCT30 e MCT37 (Figura 2B).

A apoptose tubular e perda da borda em escova ocorreu apenas a partir do grupo MCT30, com aumento significativo no grupo MCT37 (Figura 2C). No entanto, a necrose tubular se manifestou apenas no grupo MCT37, estatisticamente significativo em relação aos demais (Figura 2C).

Alterações intersticiais

Nos grupos MCT foram observadas a ocorrência de edema perivascular já a partir de 15 dias, com aumento progressivo e significativo com o passar dos dias (Figura 3A). Já o edema peritubular só se manifestou a partir do grupo MCT30 (Figura 3B). O infiltrado leucocitário esteve presente apenas no MCT37, estatisticamente significativo.

TABELA 1 – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA

Parâmetros Histológicos	Grupos				p-valor
	GC	MCT15	MCT30	MCT37	
EPV	0,1±0,3d	0,2±0,4d	0,6±0,5d	2,6±1,2a,b,c	p <0,001
EPT	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,3	0,3±0,4	p >0,05
EPA	0,1±0,3d	0,4±0,7d	0,4±0,5d	2,8±1,2a,b,c	p <0,001
PBE	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,3±0,5d	1,2±0,9a,b,c	p <0,001
APT	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,1±0,3	1,4±1,7a,b	p <0,001
DMB	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0d	1,7±1,4a,b,c	p <0,001
NT	0,0±0,0d	0,0±0,0d	0,0±0,0d	1,2±1,3a,b,c	p < 0,001
IL	0,1±0,3d	0,0±0,0d	0,0±0,0d	1,5±0,7a,b,c	p < 0,001
AG	0,0±0,0c,d	0,0±0,0c,d	1,0±0,0a,b	1,0±1,0a,b,c	p < 0,001
ME	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,3	p > 0,05
DE	0,1±0,3d	0,5±0,7d	0,6±0,5d	2,2±1,1a,b,c	p < 0,001

EPV=edema espaço perivascular; EPT=edema espaço peritubular; EPA=espaço paracelular; PBE=perda do bordo em escova; APT=apoptose peritubular; DMB=destacamento da membrana basal; NT=necrose tubular; IL=infiltrado leucocitário; AG=alterações glomerulares; ME=mesangiólise; DE=descamação epitelial; nível de significância p-valor menor do que 0,05; *p <0,05 comparado ao GC. ^bp <0,05 comparado ao G15; ^cp <0,05 comparado ao G30; ^dp <0,05 comparado ao g37. EPV=edema espaço perivascular; EPT=edema espaço peritubular; EPA=espaço paracelular; PBV=perda do bordo em escova; APT=apoptose peritubular; DMB=destacamento da membrana basal; NT=necrose tubular; IL=infiltrado leucocitário; AG=alterações glomerulares; ME=mesangiólise; DE=descamação epitelial.

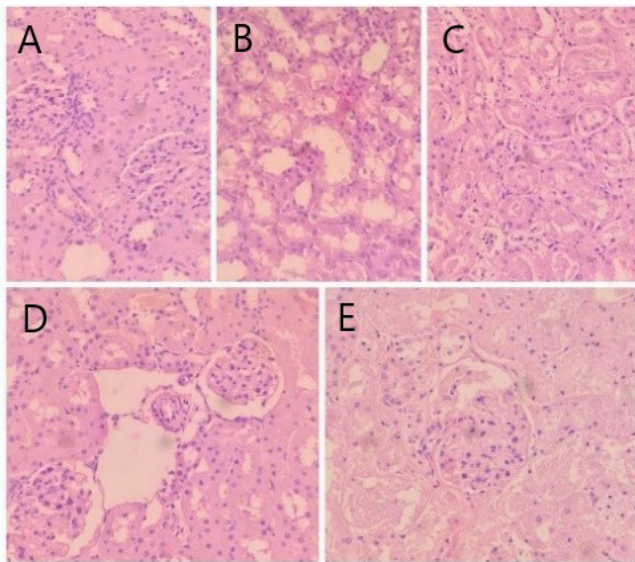


FIGURA 1 – A) GLOMÉRULO NORMAL; B) DESCAMAÇÃO EPITELIAL E PERDA DO BORDO EM ESCOVA; C) NECROSE, APOPTOSE, PERDA DO BORDO EM ESCOVA E DESCAMAÇÃO EPITELIAL; D) EDEMA PERIVASCULAR; E) NECROSE E APOPTOSE (H&E, 400X)

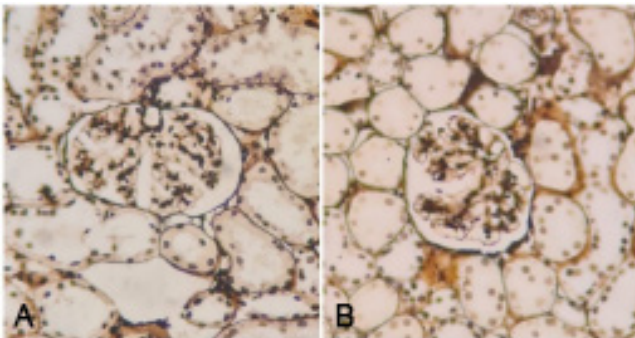


FIGURA 2 – LÂMINA COM CORTE DE TECIDO RENAL (PRATA DE JONES, 400X): A) GLOMÉRULO NORMAL; B) MESANGIÓLISE.

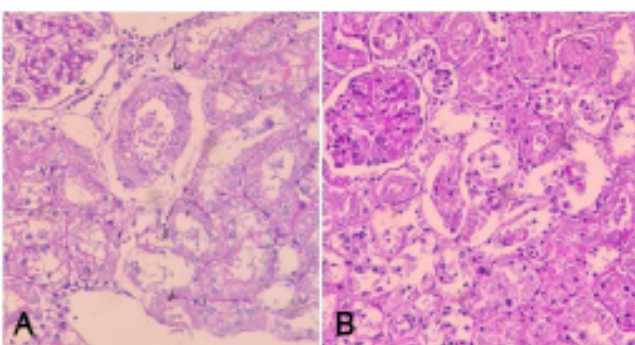


FIGURA 3 – LÂMINA COM CORTE DE TECIDO RENAL: A) EDEMA PERIVASCULAR, ESPAÇO PARACELULAR E DESCAMAÇÃO EPITELIAL; B) ESPAÇO PARACELULAR, APOPTOSE, NECROSE E DESCAMAÇÃO EPITELIAL COLORAÇÃO (PAS, 400X)

DISCUSSÃO

Mecanismos relacionados com o dano renal

Os achados histopatológicos que podem estar relacionados à síndrome cardiorenal são: edema perivascular, necrose e apoptose tubular e descamação epitelial. Outros achados, porém, não se enquadram nesse mecanismo, sendo

melhor explicados por uma via de ação direta da MCT sobre os rins, e ainda outros que não foi possível correlacionar aos mecanismos citados.

A síndrome cardiorenal é distúrbio fisiopatológico complexo dos corações e rins, no qual a disfunção aguda ou crônica de um órgão pode induzir disfunção em outro. Nesse caso, o medicamento pode induzir insuficiência cardíaca (IC), e esta por sua vez desencadear lesões renais, como a lesão tubular, sendo necessário então buscar diferenciar as consequências renais originadas pelo medicamento, ou secundárias à síndrome cardiorenal².

Na literatura é descrito que, após a inoculação de MCT na dose de 30 mg/kg durante 4 semanas, ratos Sprague-Dawley desenvolvem hipertrofia do ventrículo esquerdo, evidenciando insuficiência cardíaca. Nesse estudo em questão de Angelini et al², nos animais que desenvolvem a IC, foram verificados derrames pericárdicos, pleurais e peritoneais, além de altos índices de peptídeo natriurético cerebral. Além disso, as citocinas inflamatórias, creatinina e NGAL (importante marcador da injúria renal) séricas, encontravam-se altas².

Possivelmente uma resposta inflamatória sistêmica foi responsável pelos altos níveis de morte celular, o que explicaria a expressão de NGAL pelos rins. Entretanto, a liberação dessa proteína também pode ser consequência de inflamação renal. Logo, a fonte da inflamação certamente foi multifatorial, podendo ser tanto o coração quanto o rim a sua fonte ativa².

O aumento da pressão intravenosa nos rins pode ter desencadeado dano tubular, que por sua vez libera NGAL e induz explosão de citocina inflamatórias, que, por meio de mecanismos endócrinos ou parácrinos, produzem mais danos a órgãos, como o coração e os rins². A liberação da NGAL, precedendo o aumento dos níveis da creatinina sérica, confirma o papel dessa proteína como biomarcador precoce de lesão renal. A IC leva ao aumento da pressão intravenosa no rim, e essa congestão causa danos tubulares, responsáveis por liberar NGAL. Essa proteína, por sua vez, desencadeia novas cascatas inflamatórias, responsáveis por promover mais danos renais, seja por mecanismos endócrinos ou parácrinos.

Possivelmente o rim sofre hipoperfusão na IC sistólica e congestão na IC diastólica, podendo formar duas vias diferentes para o meio inflamatório descrito, gerando dano tubular e a liberação da NGAL.

Achados histopatológicos relacionados a síndrome cardiorenal

O surgimento tanto de apoptose quanto necrose tubular pode ser explicado pela hipoperfusão e congestão secundária a IC, que leva os túbulos renais a quadros isquêmicos; entretanto, há resposta heterogênea, em diferentes segmentos do túbulo. Logo, o resultado de apoptose ou necrose se deve à adaptação e/ou resposta a depleção de energia correspondente em casa segmento¹⁰.

Reforçando a lesão tubular desencadeada pela MCT, o presente estudo verificou a ocorrência de descamação epitelial. Esse achado apresentou-se evoluindo gradativamente conforme o tempo exposto à MCT, até atingir todos os ratos do último grupo. Este é um outro fator possivelmente ligado à síndrome cardiorenal, já que a descamação epitelial pode ocorrer devido à isquemia e congestão tubular. Essa lesão parece ser devido a alterações na estrutura e função do citoesqueleto celular, microfilamentos e proteínas de fixação de superfície¹⁹.

Quanto ao edema perivascular, foi demonstrado interferência da MCT com relação ao aparecimento do achado,

já que, apesar de apenas no último grupo o número de casos ter sido significativo, foram afetados 95% desses animais. O edema intersticial encontrado, pode ter relação com a ação sistêmica da MCT que contribui para o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar, que por sua vez, leva ao edema intersticial nos rins³.

Anderson et al.¹ demonstraram que a hipertensão arterial pulmonar secundária à MCT em ratos apresentava concomitantemente aumento da pressão no coração direito. Possivelmente esse aumento e congestão vascular seja o causador do edema encontrado; portanto, esta não seria lesão direta da MCT sobre

os rins, mas sim um resultado sistêmico.

CONCLUSÃO

Constatou-se que houve injúria renal após a exposição a MCT sob o ponto de vista anatomopatológico. Todavia, apenas pelo estudo histopatológico, não foi possível afirmar com exatidão qual o mecanismo exato responsável por desencadear as lesões renais, se são decorrentes da ação tóxica direta da MCT, ou se também está relacionado a fatores sistêmicos.

Gewehr DM, Schick M, Leite J, Kubrusly FB, Giovanini AF, da Cruz AS, Simm EB, Adachi FV, Kubrusly LF. Renal histological damage in an experimental model of monocrotalin-induced right ventricular hypertrophy. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2021;79(Supl. 1):8-11.

ABSTRACT - Monocrotaline, a toxic alkaloid obtained from plants of the *Crotalaria* genus, may have a potential toxic effect on human body organs, such as kidneys, lungs, heart, liver and other effects. The aim of this study was to evaluate the kidney damage caused by exposure to monocrotaline. This is an experimental study in rats divided into 4 groups, one of which received saline injection and the other three received monocrotaline inoculation, with different times for sacrifice; subsequently, a histological study was performed in order to evidence renal lesions. In conclusion, it was found that there was kidney damage. However, it was not possible to state the exact mechanism responsible for them, that is, if they were due to the direct toxic action of monocrotaline, or if it was also related to other systemic factors.

HEADINGS - Pulmonary arterial hypertension. Renal damage. Monocrotaline.

REFERÊNCIAS

- Anderson RJ, Malhotra A, Kim NH. Pulmonary hypertension: evolution of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Thorac Dis* 2016;8:S562. <https://doi.org/10.21037/JTD.2016.07.33>.
- Angelini A, Castellani C, Virzi GM, Fedrigo M, Thiene G, Valente M, et al. The Role of Congestion in Cardiorenal Syndrome Type 2: New Pathophysiological Insights into an Experimental Model of Heart Failure. *Cardiorenal Med* 2016;6:61–72. <https://doi.org/10.1159/000440775>.
- Benavides-Cordova V, Silva-Medina M, Varela MX, Gómez MP. Subchronic toxicity of the pulmonary hypertension model due to lowdose monocrotaline in rats. *J Pharm Pharmacogn Res* 2020;8:308–15.
- Cheeke PR. Toxicity and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids. *J Anim Sci* 1988;66:2343–50. <https://doi.org/10.2527/JAS1988.6692343X>.
- Cheeke PR, Cheeke PR. Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants. 2nd ed. Danville Ill.: Interstate Publishers; 1998.
- Flores AS, Miotto STS. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. *Acta Bot Brasílica* 2005;19:245–9. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000200006>.
- Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine Alkaloids—Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. <http://DxDoiOrg/101081/DMR-120028426> 2004;36:1–55. <https://doi.org/10.1081/DMR-120028426>.
- Gewehr DM, Salgueiro GR, de Noronha L, Kubrusly FB, Kubrusly LF, Coltro GA, et al. Plexiform lesions in an experimental model of monocrotalin-induced pulmonary arterial hypertension. *Arq Bras Cardiol* 2020;115:480–90. <https://doi.org/10.36660/abc.20190306>.
- Hayashi Y, Lalich JJ. Renal and Pulmonary Alterations Induced in Rats by a Single Injection of Monocrotaline. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;124:392–6. <https://doi.org/10.3181/00379727-124-31748>.
- Homs E. Insuficiência Renal Aguda. *J Bras Nefrol* 1998;20:362–4.
- Honório JER, Soares PM, de Melo CL, Filho ACVA, Filho JGS, Filho JMB, et al. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. *Rev Bras Farmacogn* 2010;20:453–8. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300025>.
- Kubiak BD, Albert SP, Gatto LA, Snyder KP, Maier KG, Vieau CJ, et al. Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. *Shock* 2010;34:525–34. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181e14cd2>.
- Kurozumi T, Tanaka K, Kido M, Shoyama Y. Monocrotaline-induced renal lesions. *Exp Mol Pathol* 1983;39:377–86. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(83\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0014-4800(83)90066-7).
- Mark Lafranconi W, Huxtable RJ. Hepatic metabolism and pulmonary toxicity of monocrotaline using isolated perfused liver and lung. *Biochem Pharmacol* 1984;33:2479–84. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90721-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90721-4).
- Mattocks AR, Rebekah J, Janet B. Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol* 1989;27:561–7. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90117-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90117-7).
- Medeiros RMT, Gómiak SL, Guerra JL. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. *J Ethnopharmacol* 2000;69:181–8. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00149-X).
- Ottom JM, Yu CY, McCrohon J, Sammel N, Feneley M. Accuracy and clinical outcomes of computed tomography coronary angiography in the presence of a high coronary calcium score. *Hear Lung Circ* 2013;22:980–6. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2013.05.647>.
- Palomino G, Vázquez R. Cytogenetic Studies in Mexican Populations of Species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae). *Cytologia (Tokyo)* 1991;56:343–51. <https://doi.org/10.1508/CYTOLOGIA.56.343>.
- Racusen LC. The histopathology of acute renal failure. *New Horizons Sci Pract Acute Med* 1998;3:623–30. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5482-6_50.
- Ribeiro LR, Silva AR, Bautista ARPL, Costa SL, Sales LA, Rios ACC, et al. Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. *Mutat Res Toxicol* 1993;300:253–8. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(93\)90058-L](https://doi.org/10.1016/0165-1218(93)90058-L).
- Rooney P, Telfer C, E. McFadyen M, Melvin W, Murray G. The Role of Cytochrome P450 in Cytotoxic Bioactivation: Future Therapeutic Directions. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;4:257–65. <https://doi.org/10.2174/1568009043333014>.
- 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;141:319–29. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(96\)80038-X](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(96)80038-X).