

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

CARLOS ALBERTO FERNANDES RAMOS

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA INJÚRIA
HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO TRATAMENTO
CRÔNICO DE RATOS COM O D-LIMONENO**

João Pessoa
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS ALBERTO FERNANDES RAMOS

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA INJÚRIA
HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO TRATAMENTO
CRÔNICO DE RATOS COM O D-LIMONENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do grau de Mestre na área de Farmacologia

Orientadores:

Reinaldo Nóbrega de Almeida

Maria Salete Trigueiro de Araújo

João Pessoa
2010

R147a Ramos, Carlos Alberto Fernandes.

Avaliação histopatológica e bioquímica da injúria hepática experimental induzida pelo tratamento crônico de ratos com o D-Limoneno. / Carlos alberto Fernandes Ramos .- João Pessoa, 2010.

98p.: il.

Dissertação(mestrado) UFPB/CCS

Orientadores: Reinaldo Nóbrega de Almeida, Maria Salete Trigueiro de Araújo.

1.Fígado – Patologia. 2.D-Limoneno. 3. Bioquímica e imuno-histoquímica.

UFPB/BC

CDU: 616.36(043)

CARLOS ALBERTO FERNANDES RAMOS

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA INJÚRIA HEPÁTICA
EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO TRATAMENTO CRÔNICO DE RATOS COM
O D-LIMONENO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito para obtenção do grau
de Mestre em Farmacologia

Aprovado em 08 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (UFPB)

Prof^a. Dra. Margareth de Fátima F. Melo (UFPB)

Prof. Dr. Carlos Fernando Mello (UFSM - RS)

Prof^a. Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá (UFPB)

Este trabalho é dedicado

À minha mãe **Geralda**

Às minhas filhas **Anakarla** e **Ana Carenina**

À memória de meu pai **Luiz**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A gratidão é o único tesouro dos humildes
(William Shakespeare)

Nossos sinceros agradecimentos a todos os colegas, amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, com seus ensinamentos, orientações, críticas, acolhimento, incentivos, colaborações e amizade.

De forma especial, expressamos nosso apreço e reconhecimento

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**, Professor e Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos (LTF/UFPB), orientador deste trabalho.

À **Profª. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo**, Professora e Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos (LTF/UFPB), co-orientadora deste trabalho.

À **Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, Professora e Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos (LTF/UFPB), Diretora do Centro de Ciências da Saúde (UFPB)

À **Profª. Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá**, Professora e Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos (LTF/UFPB)

À técnica em biodiagnóstico **Anakarla Fernandes Pamplona Pinho Ramos**

Ao colega de mestrado do Programa de Pós-Graduação de Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB **Rubens Batista Benedito**

Ao doutorando em Biotecnologia (RENORBIO) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba **Franklin F. de Farias Nóbrega**

À **Profª. Dra. Hosana Bandeira Santos**, pesquisadora do Programa de Pós-Graduação de Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB

Aos **colegas mestrandos, professores e pesquisadores do Programa de Pós-Graduação de Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos** do LTF, UFPB

Ao **técnico José Crispim Duarte** do Biotério Prof. Dr. Thomas George do do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial hepatotóxico do d-limoneno - um componente dos óleos voláteis, extraídos de plantas cítricas. A investigação pré-clínica foi realizada em modelo animal (ratos), com ênfase nos estudos histopatológicos e imunopatológicos, para determinação de lesões teciduais e compreensão de seus mecanismos patogênicos. Foram usados 63 ratos *Wistar*, distribuídos aleatoriamente em oito grupos. Além dos grupos controle (sem tratamento ou recebendo apenas veículo), os grupos experimentais foram tratados durante 30 ou 45 dias com d-limoneno, nas doses de 25 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia. Dois outros grupos (satélites) foram acompanhados durante 60 dias, recebendo a substância apenas nos primeiros 30 dias, nas mesmas dosagens dos outros grupos anteriores. A outro conjunto de roedores foi administrado etanol a 20%, em baixas doses (3,5 ml/kg/dia), na expectativa de comparar-se os efeitos tóxicos do álcool com os do d-limoneno. Os escores foram analisados estatisticamente utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e de variância com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

As pesquisas bioquímicas não demonstraram elevações estatisticamente significativas dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), enquanto alterações de alanina aminotransferase (ALT) tiveram significância no grupo de animais tratados com a maior dose de d-limoneno.

A análise histológica revelou a ocorrência de lesões hepáticas inflamatórias, parenquimatosas, crônicas, de pequena ou média intensidade, no grupo tratado com d-limoneno. Degeração hidrópica, necrose hepatocítica, hiperplasia de células de Kupffer, fibrose incipiente e esteatose microvesicular foram as alterações microscópicas que, variavelmente, acompanharam a resposta inflamatória local.

Estudos imunopatológicos indicaram que a injúria hepática deveu-se em parte à presença de linfócitos T (CD3+) citotóxicos (CD8+), reforçando as teorias defendidas por vários autores de que a imunidade celular participa da hepatotoxicidade droga-induzida. O complexo mecanismo patogênico provavelmente é iniciado pela geração de substâncias reativas secundárias ao metabolismo oxidativo das drogas. Tais metabólitos podem conjugar-se com macromoléculas, prejudicando estruturas e funções celulares e formando haptenos imunogênicos. Células de Kupffer hiperplásicas também contribuem para o

processo de hipersensibilidade, com a produção de citocinas. Nos espaços perissinusoidais as células de Ito são estimuladas, transformando-se em miofibroblastos, produtores de substâncias matriciais, iniciando processos fibrogênicos. Neste modelo experimental com d-limoneno, fibras colagênicas finas, perissinusoidais, foram observadas apenas com técnicas específicas de coloração (vermelho picrossírius), indicando fibrose precoce, em focos isolados, associados às lesões inflamatórias mais significativas.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the hepatotoxic potential of d-limonene - a component of volatile oils extracted from citrus plants. The preclinical research was conducted in an animal model (rats) with emphasis on histopathological and immunopathological studies for determination of tissue lesions and understanding of their pathogenic mechanisms. Sixty-three Wistar rats were randomly divided into eight groups. In addition to the control groups (untreated or receiving only vehicle), experimental groups were treated for 30 or 45 days with d-limonene at doses of 25 mg/kg/day and 75 mg/kg/day. Two other groups (satellites) were followed for 60 days, receiving the substance only in the first 30 days in the same dosages of previous groups. To other rats' group was given 20% ethanol in low doses (3.5 ml/kg/day), expecting to compare the alcohol toxic effects with those of d-limonene. Scores were statistically analyzed using Kruskal-Wallis and ANOVA with Tukey post-test ($p < 0.05$).

Biochemical researches showed no statistically significant elevations in levels of aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP), while changes in alanine aminotransferase (ALT) were significant in the animals group treated with the higher dose of d-limonene.

Histological analysis revealed the occurrence of inflammatory liver injury, parenchymal, chronic, small or medium intensity in the group treated with d-limonene. Hydropic degeneration, hepatocytic necrosis, hyperplasia of Kupffer cells, microvesicular steatosis and incipient fibrosis were the microscopic changes that variously accompanied the local inflammatory response.

Immunopathological studies indicated that liver injury was due in part to the presence of T lymphocytes (CD3 +) cytotoxic (CD8 +), reinforcing the theories advocated by several authors that cellular immunity participates in drug-induced hepatotoxicity. The complex pathogenic mechanism is probably initiated by the generation of secondary reactive substances to the oxidative metabolism of drugs. Such metabolites can combine

with macromolecules, damaging structures and cellular functions and forming immunogenic haptens. Hyperplastic Kupffer cells also contribute to the process of hypersensitivity, with the elaboration of cytokines. Ito cells are stimulated in the perisinusoidal spaces being transformed into myofibroblasts, matrix-substance producers, starting fibrogenic processes. In this experimental model with d-limonene, perisinusoidal thin collagen fibers were observed only with specific staining techniques (picrosirius red), indicating early fibrosis, in isolated outbreaks, associated with more significant inflammatory lesions.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Espécies reativas de oxigênio.	25
Quadro 2	Relação entre tipos de lesão hepática, período de exposição e agente tóxico.	26
Quadro 3	Características dos tipos intrínseco e idiossincrásico de hepatotoxicidade.	27
Quadro 4	Principais espécies vegetais que contêm óleos essenciais ricos em limoneno.	32
Quadro 5	Distribuição dos animais por grupo e períodos de administração ou suspensão das drogas utilizadas.	40
Quadro 6	Critérios para avaliação histológica do grau de fibrose em tecido hepático.	44
Quadro 7	Critérios para avaliação histológica do grau de infiltração linfocitária portal.	44
Quadro 8	Critérios para avaliação histológica do grau de infiltração inflamatória periportal e perisseptal em tecido hepático.	45
Quadro 9	Critérios para avaliação histológica do grau dos fenômenos necroinflamatórios em tecido hepático.	45
Quadro 10	Avaliação histológica dos rins de animais dos grupos controle (I e II) e tratados com o d-limoneno (25 mg/kg/dia ou 75 mg/kg/dia - grupos IV, V, VI, VII) e etanol a 20% (grupo III)	70

Quadro 11	Avaliação histológica dos pulmões de animais dos grupos controle (I e II) e tratados com o d-limonenno (25 mg/kg/dia ou 75 mg/kg/dia - grupos IV, V, VI, VII) e etanol a 20%- (grupo III)	71
Quadro 12	Avaliação histológica do coração de animais dos grupos controle (I e II) e tratados com o d-limonenno (25 mg/kg/dia ou 75 mg/kg/dia - grupos IV, V, VI, VII) e etanol a 20%- (grupo III)	71
Quadro 13	Exemplos de drogas associadas a reações do tipo indiossincrásica e seus respectivos efeitos citopáticos	73
Quadro 14	Exemplos de drogas associadas a reações dependentes de doses elevadas (DE) ou cumulativas (DC) e seus respectivos efeitos citopáticos	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da circulação hepática – sinusóides recebem sangue arterial (da artéria hepática) e venoso (da veia porta), que se misturam e seguem para a veia cava inferior, passando por segmentos venosos intermediários.	21
Figura 2	Representação da estrutura lobular hepática, de acordo com o conceito de Rappaport.	22
Figura 3	Formação de limoneno a partir do geranil pirofosfato.	33
Figura 4	Distribuição dos animais em grupos controles, experimentais e satélites.	40
Figura 5	Procedimentos utilizados no modelo experimental e seus respectivos objetivos.	41
Figura 6	Organograma para orientação dos estudos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos realizados no modelo experimental.	43
Figura 7	Figura 7. Aspecto macroscópico do fígado de rato tratado com DL 75 mg/kg/dia por 30 dias.	51
Figura 8	Microvacúolos intracitoplasmáticos (setas) em hepatócitos de rato, após 45 dias de tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X400).	55
Figura 9	Foco de necrose hepatocitária perivenular (zona 3 do lóbulo), associado à mobilização mononuclear (setas), em fígado de rato, após 45 dias de tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X400).	55
Figura 10	Focos isolados de esteatose microvesicular (setas), em fígado de rato, após 45 dias de tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X400).	56

Figura 11	Finos septos conjuntivais neoformados (setas), em espaços perissinusoidais da zona 3 do lóbulo, em fígado de ratos, após 45 dias de tratamento com DL na dose de 75 mg/kg/dia (Picrossírius X 400).	56
Figura 12	Finos septos conjuntivais neoformados (setas), em espaços perissinusoidais da zona 3 do lóbulo, em fígado de ratos, após 45 dias de tratamento com DL na dose de 25 mg/kg/dia (Picrossírius X 400).	57
Figura 13	Fígado de rato do grupo controle, nos limites histológicos da normalidade, observando-se escassos linfócitos (provavelmente residentes) permeando o estroma conjuntivo portal (HE X100).	57
Figura 14	Inflamação lobular grau 1 (leve). Alterações hepatocitárias discretas - tumefação ou retração acidófila (setas finas) acompanhadas de infiltrado linfo-histiocitário e focos de necrose (setas grossas), após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).	58
Figura 15	Inflamação lobular grau 1 (leve), com alterações hepatocitárias discretas (tumefação ou retração acidófila) acompanhadas de infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose (setas), em zona perivenular, após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).	59
Figura 16	Inflamação lobular grau 2 (moderada), com focos de necrose hepatocitária circundados por agregados linfo-histiocitários (setas) em numerosos sítios, após tratamento com DL na dose de 75 mg/kg/dia (HE X 100).	59
Figura 17	Inflamação lobular grau 2 (moderada). Focos de necrose hepatocitária circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios (setas), após tratamento com DL na dose de 75 mg/kg/dia (HE X 400).	60
Figura 18	Inflamação lobular grau 2 (moderada). Focos de necrose hepatocitária circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios (setas), após tratamento com DL na dose de 75 mg/kg/dia (HE X 400).	60
Figura 19	Inflamação portal grau 1 (discreta) - leve aumento do número de linfócitos no espaço porta (setas grossas) associada a degeneração hidrópica hepatocitária (setas finas), após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).	61

Figura 20	Inflamação portal grau 1 (discreta). Leve aumento do número de linfócitos portais (setas espessas); microvacuolizações citoplasmáticas são expressão de degeneração hidrópica (setas finas). após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).	61
Figura 21	Inflamação portal grau 1, com aumento discreto do número de linfócitos portais (setas), após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).	62
Figura 22	Inflamação portal grau 2, com aumento moderado do número de linfócitos portais (setas), em fígado de ratos, após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 400).	62
Figura 23	Inflamação portal grau 2 (moderado). Aumento moderado do número de linfócitos portais, em fígado de ratos, após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 400).	63
Figura 24	Imunomarcagem positiva de HAM56 (marcador de macrófago), em infiltrado inflamatório de zona 3 hepática e em células de Kupffer, em fígado de rato tratado com DL 25 mg/kg/dia (imunoperoxidase X 100).	68
Figura 25	Imunoexpressão de CD3, em infiltrado inflamatório linfocítico, perivenular, grau 1, em fígado de rato tratado com DL 25 mg/kg/dia/45 dias (imunoperoxidase X 400).	69
Figura 26	Imunoexpressão de CD8, em infiltrado inflamatório linfocítico, perivenular, de média intensidade, em fígado de rato tratado com DL 75 mg/kg/dia/45 dias (imunoperoxidase X 400).	69
Figura 27	Localização do infiltrado inflamatório linfomonocitário observado no fígado de ratos tratados com d-limoneno: inflamação parenquimatosa, inflamação portal/septal ou inflamação mista (parenquimatosa e portal/septal).	76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Valores médios (em UI/L) da atividade de AST, ALT e FA, em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).
- Tabela 2** Valores médios (em UI/L) dos níveis de AST, ALT e FA em ratos do grupo I (controle) e dos grupos satélites (VII - LS25 e VIII - LS75), após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos experimentais - DL, nas doses de 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII). 48
- Tabela 3** Valores médios do peso hepático de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).
- Tabela 4** Valores médios do peso hepático de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL, 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75). 52
- Tabela 5** Grau de inflamação portal em ratos dos grupos controle I e II (tween) e dos grupos tratados com etanol 20% (3,5 ml/kg/dia -grupo III), com DL (25 mg/kg/dia – grupo IV e 75 mg/kg/dia - grupo V) durante 45 dias; com DL durante 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VI); com DL, administrado durante 30 dias e suspenso por 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VII e 75 mg/kg/dia - grupo VIII) 64
- Tabela 6** Grau de inflamação parenquimatosa (lobular) em ratos dos grupos controle I e II (tween) e dos grupos tratados com etanol 20% (3,5 ml/kg/dia -grupo III), com DL (25 mg/kg/dia – grupo IV e 75 mg/kg/dia - grupo V) durante 45 dias; com DL durante 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VI); com DL, administrado durante 30 dias e suspenso por 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VII e 75 mg/kg/dia - grupo VIII). 66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Níveis médios da atividade de AST (UI/L) em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).	48
Gráfico 2	Níveis médios da atividade de AST (UI/L) em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).	49
Gráfico 3	Níveis médios da atividade de ALT (UI/L), em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).	49
Gráfico 4	Níveis médios da atividade de ALT (UI/L) em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).	50
Gráfico 5	Níveis médios de FA (UI/L) em ratos, em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).	50
Gráfico 6	Níveis médios da atividade de FA (UI/L) em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).	51
Gráfico 7	Valores médios do peso hepático de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).	52
Gráfico 8	Valores médios do peso hepático de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75).	53

- Gráfico 09** Valores médios dos graus de inflamação portal dos fígados de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, (3,5 ml/kg/dia - grupo III) e com DL (25 mg/kg/dia - grupo IV ou L25; 75 mg/kg/dia - grupo V ou L75).
- Gráfico 10** Valores médios dos graus de inflamação portal no fígado de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75). 65
- Gráfico 11** Valores médios dos graus de inflamação parenquimatosa em fígados de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, (3,5 ml/kg/dia - grupo III) e com DL (25 mg/kg/dia - grupo IV ou L25; 75 mg/kg/dia - grupo V ou L75). 67
- Gráfico 12** Valores médios dos graus de inflamação parenquimatosa no fígado de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75). 67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
CYP450	citocromo polimórfico P450
DAB	diaminobenzidina
DC	doses cumulativas
DE	doses elevadas
DL	d-limoneno
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EPA	Environmental Protection Agency
ERO	espécies reativas de oxigênio
FA	fosfatase alcalina
GSH	Glutathione reduzida
HE	hematoxilina-eosina
KG	quilograma
L	litro
LSAB	labeled streptavidin avidin-biotin (kit de revelação para imuno-histoquímica)
MG	miligrama
NTP	National Toxicology Program
PMT	permeabilidade mitocondrial transitória
UI/L	unidades internacionais por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 FUNDAMENTAÇÃO	20
1.2 O FÍGADO	20
1.2.1. Histofisiologia do fígado	21
1.2.2. Mecanismos de detoxificação hepática	24
1.2.3 Mecanismos de lesão e/ou morte celular	25
1.2.4 Tipos de lesão hepática	26
1.3. INJÚRIA HEPÁTICA DROGA INDUZIDA	26
1.3.1. Mecanismos de hepatotoxicidade – fase inicial	27
1.3.2. Vias diretas e vias mediadas por receptores	29
1.3.2.1. Apoptose e necrose	29
1.3.2.2. Mecanismos de proteção e regeneração	30
1.3.2.3. Fatores de riscos de hepatotoxicidade	31
1.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O D-LIMONENO	32
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVOS GERAIS	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 MATERIAL	38
3.1.1 Animais experimentais	38
3.1.2. Drogas	38
3.1.3. Parâmetros observados	38
3.1.4. Critérios de exclusão	39
3.1.5. Tamanho da amostra	40
3.1.6. Considerações éticas	41
3.2. METODOLOGIA	41
3.2.1. Análises bioquímicas	42
3.2.2 Estudos anatomopatológicos	42
3.2.3 Estudos imuno-histoquímicos	46
3.2.4. Análises estatísticas	46
4. RESULTADOS	47
4.1 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	47
4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO FÍGADO, RIM, CORAÇÃO E PULMÕES	51
4.3 HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO	54
5. DISCUSSÃO	72
5.1 O MODELO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO	72
5.2. A INJÚRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO D-LIMONENO	74

5.2.1. Anormalidades bioquímicas	74
5.2.2. Anormalidades histopatológicas	75
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS	84

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. FUNDAMENTAÇÃO

Os produtos naturais de origem vegetal são ricos em compostos com atividade biológica (EDRIS, 2007). As possibilidades terapêuticas dessas substâncias têm motivado numerosas pesquisas que procuram demonstrar suas propriedades antitumorais, anti-inflamatórias (LIN et al., 2008), antimicrobianas (KIRAN, 2008) ou anti-oxidativas. Durante a fase de investigação pré-clínica em modelos animais, a toxicidade dos compostos pode ser avaliada de formas diversas, inclusive com a realização de estudos histopatológicos, para determinação de lesões celulares e teciduais. Tal metodologia é útil para identificação dos efeitos sistêmicos das substâncias potencialmente tóxicas, enquanto modelos *in vitro* são utilizados para o estudo de mecanismos específicos em condições perfeitamente controladas (GAD, 1994; ULRICH et al., 1995).

Nos estudos farmacotoxicológicos, o fígado deve ser constantemente avaliado, uma vez que esse órgão é geralmente responsável pela *clearance* e metabolização dos compostos, experimentalmente administrados, tornando-se o alvo principal da toxicidade induzida pelos xenobióticos (RUSSMANN et al., 2009). Os modelos animais são ferramentas imprescindíveis para a identificação das lesões hepatotóxicas, que podem resultar da ação direta das substâncias ou de produtos gerados por biotransformação.

1.2. O FÍGADO

O fígado é a maior víscera de um animal, representando 2 a 5 % do seu peso. Cerca de 75% do suprimento sanguíneo é garantido pela veia porta, conduzindo sangue do trato gastrointestinal, baço e pâncreas. A artéria hepática transporta sangue oxigenado, representando aproximadamente 25% do débito cardíaco (HAM, 1975).

Na passagem pelos sinusóides, ocorre a mistura dos sangues venoso e arterial. A seguir, o sangue é transportado para as veias hepáticas terminais (em nomenclatura mais antiga, denominadas veias centrolobulares ou veias centrais). Estas confluem para formar

as veias intercalares e a seguir a veia hepática, pela qual o sangue é levado à veia cava inferior, que o transporta ao coração (figura 1).

Como o fígado, pela sua posição anatômica, é sede de drenagem do sangue proveniente do trato digestivo, o sangue hepático além de transportar nutrientes, contém produtos potencialmente tóxicos, que devem ser catabolisados ou excretados.

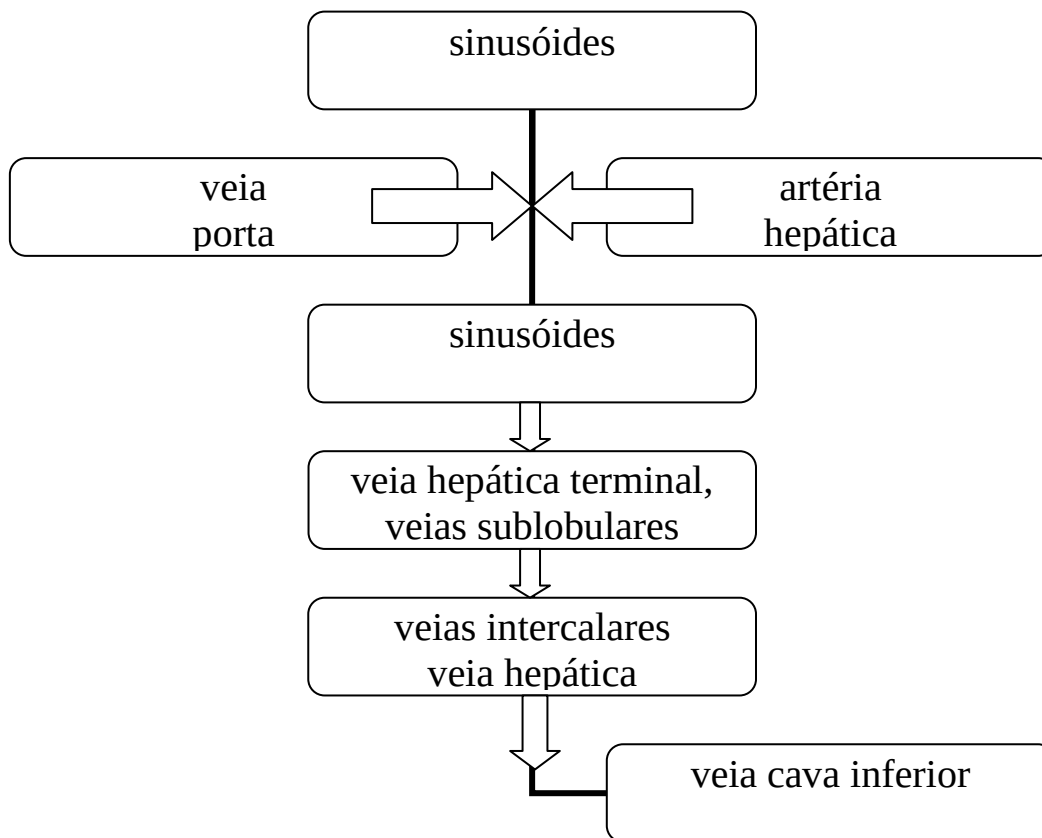


Figura 1. Representação da circulação hepática. Sinusóides recebem sangue arterial (da artéria hepática) e venoso (da veia porta), que se misturam e seguem para a veia cava inferior, passando por segmentos venosos intermediários.

1.2.1. Histofisiologia do fígado

O tecido hepático é constituído predominantemente por hepatócitos, que, no rato, representam quase 78% do volume parenquimatosos. Estão dispostos em placas

monocelulares, para facilitar a passagem dos produtos do metabolismo hepatocitário para a bile ou para o sangue.

Os sinusóides são constituídos por quatro tipos de células:

- (a) células endoteliais, típicas dos capilares sanguíneos;
- (b) células de Kupffer, que pertencem ao sistema mononuclear fagocitário. São mais numerosas na zona 3 do que na zona 1;
- (c) células de Ito ou lipócitos perissinusoidais, que armazenam lípidios e vitamina A e sintetizam colágeno;
- (d) *pit cells* ou células produtoras de linfócitos NK (*Natural Killer*), localizadas no espaço de Disse.

Em 1954, Rappaport definiu as unidades funcionais do tecido hepático, com base na estrutura microcirculatória do órgão (HAM, 1975). Conceituou o ácino como sendo uma pequena porção de parênquima, na qual os ramos terminais da veia porta e da artéria hepática se estendem para os espaços porta. Nessa concepção, a veia central situa-se na periferia, isto é, interposta entre dois ácinos. Fluindo através dos sinusóides, o sangue é alterado por trocas de nutrientes e oxigênio nos hepatócitos, de forma que três zonas fisiologicamente distintas podem ser definidas:

- (a) zona 1 - periportal, irrigada por sangue com alto teor de oxigênio e nutrientes;
- (b) zona 2 – médio-zonal, entre as zonas 1 e 3
- (c) zona 3 – perivenular, para a qual aflui o sangue após as trocas de gases e metabolitos nas zonas 1 e 2.

As células que estão na zona 3 são as mais sensíveis à ação das substâncias tóxicas. A relação entre estas regiões, definidas de diferentes formas, no parênquima hepático está representado na Figura 2.

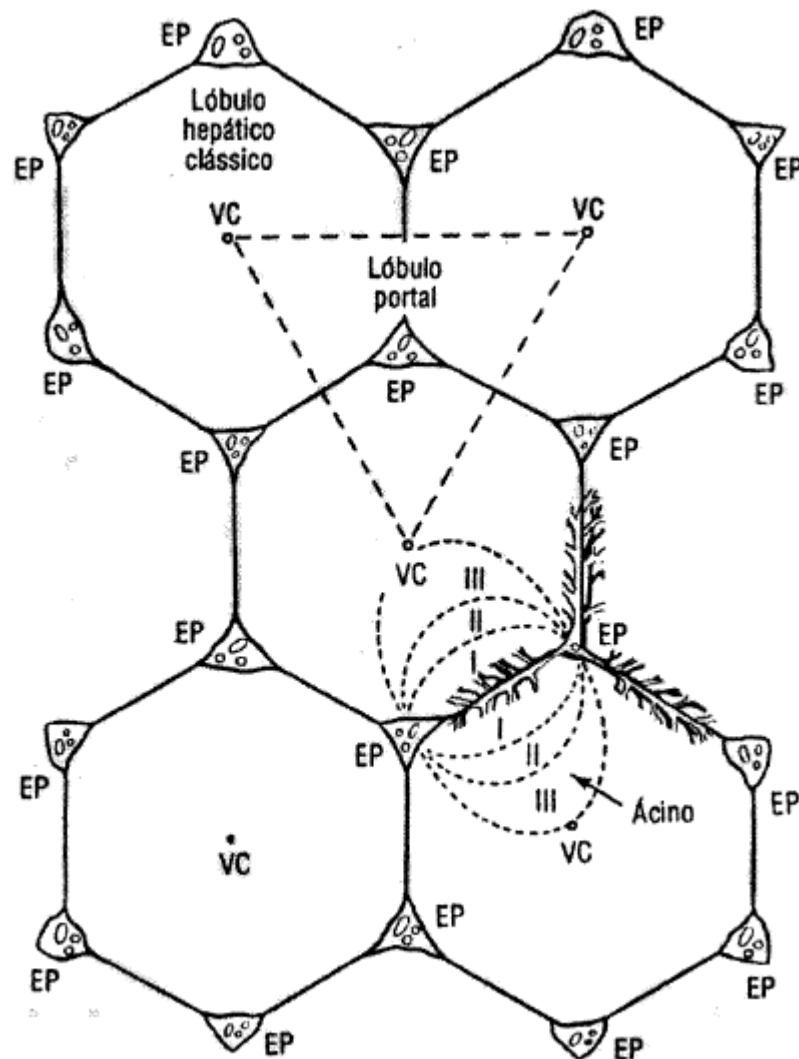


Figura 2 - Representação da estrutura lobular hepática, de acordo com o conceito de Rappaport (JUNQUEIRA et al., 1990).

A atividade metabólica do fígado é dependente da sua circulação sanguínea. Em cada unidade acinar, há diferenças quantitativas na constituição hepatocitária.

As células da zona 1 são ricas em mitocôndrias participando fundamentalmente da oxidação dos ácidos graxos, da gliconeogênese e da conversão da amônia em uréia (TIMBRELL, 1991). A elevação dos níveis de glutathione (GSH) e de enzimas com atividade respiratória reflete hepatotoxicidade. Na zona 3, haveria aumento das enzimas dependentes do citocromo P-450 (CYP450) e do NADPH (PLAA, CHARBONNEAU,

1994; MOSLEN, 1996; TSUTSUMI et al., 1989). Os gradientes enzimáticos relacionados com a detoxificação podem ser identificados por estudos imuno-histoquímicos (TRABER et al., 1988; JUNGERMANN et al., 1989).

1.2.2. Mecanismos de detoxificação hepática

O fígado é o principal órgão para o metabolismo e eliminação de substâncias estranhas, sendo também um alvo frequente das agressões tóxicas (RUSSMANN et al., 2009).

Quando um elemento xenobiótico é absorvido, o organismo utiliza enzimas e fontes energéticas necessárias para a sua desativação ou para reduzir o seu potencial citotóxico. Há redução da meia vida biológica conseqüente a alterações na estrutura de suas moléculas. Para facilitar a eliminação por via renal ou biliar e evitar acúmulos de substâncias nocivas e assim diminuir a exposição do organismo aos xenobióticos, os processos de biotransformação ocorrem em três fases (RUSSMANN et al., 2009):

- Fase I (reações de funcionalização) – as substâncias xenobióticas tornam-se compostos mais polares, após processos de oxidação, redução ou hidrólise.
- Fase II (reações de conjugação ou biossintéticas) - possibilitam aumento da hidrofília do xenobiótico por adição de um grupo polar, que facilita a excreção por via renal ou biliar. Incluem a glicoronidação, a acetilação, a sulfatação, e a conjugação com a GSH.
- Fase III (reações catabólicas) – utilizam como substrato os produtos resultantes das reações de fase II.

Os mecanismos de biotransformação também podem converter algumas substâncias não-tóxicas em produtos intermediários quimicamente reativos, potencialmente tóxicos, tais como:

- Compostos eletrofílicos,
- Radicais livres,
- Espécies reativas de oxigénio (quadro 1),
- Policátions
- Metais pesados.

Quadro 1 – Espécies reativas de oxigênio (REIS et al., 2008).

Radicais	Não-radicais
Superóxido O_2^-	Peróxido de hidrogênio H_2O_2
Hidroxila OH	Ácido hipocloroso HOCl
Peroxila LO_2	Ozonio O_3
Alcoxila LO	Oxigênio <i>singlet</i>
Hidroxiperoxila HO_2	Peróxidos lipídicos

1.2.3. Mecanismos de lesão e/ou morte celular

A administração de substâncias tóxicas produz lesões celulares. Os efeitos primários são decorrentes de peroxidação lipídica, conjugação a macromoléculas, inibição enzimática e isquemia (RAMOS, 1999; RUSSMANN et al., 2009). As alterações estruturais ou bioquímicas posteriores podem conduzir à morte celular. Esses efeitos secundários, consequentes às lesões tóxicas são (RAMOS, 1999):

- alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana,
- alterações no citosqueleto,
- lesão mitocondrial e inibição das suas funções,
- depleção do ATP e de outros co-fatores,
- alterações na homeostase do Ca^{2+} ,
- modificações na molécula do DNA,
- desestabilização lisossomal,
- estimulação da apoptose,
- lesão do retículo endoplasmático,

As manifestações finais que podem ser observadas após exposição a um composto tóxico podem ser reversíveis (esteatose e degeneração vacuolar) ou irreversíveis (apoptose e necrose).

A apoptose e a necrose são formas de morte celular. A capacidade regenerativa do fígado possibilita a substituição de tecido necrótico em pouco tempo. Alguns compostos tóxicos são causa de lesões fibróticas, irreversíveis, a exemplo da cirrose alcoólica.

1.2.4. Tipos de lesão hepática

Algumas lesões hepáticas provocadas por substâncias químicas podem ser relacionadas com o tipo de agente e o período de exposição (quadro 2)

Quadro 2 – Relação entre tipos de lesão hepática, período de exposição e agente tóxico

Tipo de Exposição	Tipo de Lesão	Agente Tóxico
Exposição aguda	Esteatose	Etanol, tetracloreto de carbono
	Degeneração celular	Etanol, paracetamol, cobre
	Colestase	Etanol, estrogênios
Exposição crônica	Cirrose	Etanol, arsênio, vitamina A
	Neoplasia	Aflatoxinas, andrógenos

1.3. INJÚRIA HEPÁTICA DROGA-INDUZIDA

A injúria hepática droga-induzida é um problema médico atual, uma vez que se tornou a principal causa de insuficiência hepática aguda em países ocidentais (OSTAPOWICZ et al, 2002; LEE, 2003). São reconhecidas duas formas de hepatotoxicidade associada ao uso de drogas:

1. tipo intrínseco, conseqüente ao uso do analgésico acetaminofeno (paracetamol)
2. tipo idiossincrásico, relacionada com numerosas drogas, desenvolvendo-se em uma proporção pequena dos usuários do medicamento.

A hepatopatia idiossincrásica é responsável por mais de 10% de todos os casos de insuficiência hepática aguda, induzida por mais de mil drogas e produtos vegetais. De acordo com o “United States Acute Liver Failure Study Group”, a injúria hepática droga-induzida corresponde a mais de 50% dos casos de insuficiência hepática aguda, incluindo hepatotoxicidade causada por altas doses de acetaminofeno (39%) e injúria hepática idiossincrática desencadeada por outras drogas (13%). O quadro 3 apresenta as particularidades dos dois tipos de injúria hepática droga-induzida.

Quadro 3 – Características dos tipos intrínseco e idiossincrásico de hepatotoxicidade

Hepatotoxicidade	Tipo Intrínseco	Tipo idiossincrásico
Dose-dependência	Sim	Não
Dose desencadeante mínima	Não	Aproximadamente 10 mg/dia
Ocorrência	Previsível	Não-previsível
Injúria celular	Direta	Indireta

Algumas substâncias hepatotóxicas podem apresentar reações ora intrínsecas ora idiossincrásicas. A isoniazida é um exemplo de hepatotoxina, que é associada com hepatotoxicidade intrínseca leve, podendo também induzir reação idiossincrática grave (RUSSMANN et al, 2009). O acetaminofeno é uma hepatotoxina classicamente do tipo intrínseca, em doses acima de 10 a 15 g por dia, mas pode causar doença hepática grave, em doses terapêuticas inferiores a 4 g por dia, em alguns pacientes (KRAHENBUHL et al., 2007; THUMMEL et al., 2000). Além das casuísticas clínicas, a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno tem sido estudada também com modelos animais. Provavelmente o metabolismo da droga, via CYP450 2E1, gera um metabólito reativo, o NAPQ1, que, ligando-se de forma covalente a proteínas celulares, causa estresse celular oxidativo, se não houver a detoxificação pela GSH.

As lesões de natureza hepatotóxica podem assemelhar-se às demais formas de doença hepática aguda ou crônica, nem sempre sendo possível relacionar o tipo de injúria histológica com a estrutura química da hepatotoxina causadora.

Os complexos processos fisiopatológicos das injúrias hepáticas droga-induzidas são desconhecidos, não havendo, portanto, tratamentos específicos para a maioria das situações clínicas, em seres humanos.

1.3.1. Mecanismos de hepatotoxicidade – fase inicial

As drogas geralmente causam dano celular por ação de alguns metabólitos, que alteram as funções mitocondriais ou desencadeiam respostas imunológicas específicas. O sistema enzimático da classe do CYP450 é o mediador da primeira fase da oxidação das

drogas, gerando metabólitos reativos, potencialmente hepatotóxicos. A segunda fase do metabolismo das drogas é conjugativo e também pode resultar na formação de produtos hepatotóxicos. São exemplos os acil-glicuronídeos (BOELSTERLI, 2002; SPAHN-LANGGUTH, BENET, 1992).

O estresse celular inicial é explicado como resultado da ligação dos metabólitos reativos com enzimas, lipídios, ácidos nucleicos e outras estruturas celulares, podendo haver depleção da GSH e inibição específica de funções hepatocelulares, como a bomba apical (canalicular) de efuxo de sal biliar (BSEP, gene ABCB11). A acumulação intracelular dos substratos dessas reações pode causar dano hepatotóxico secundário (PAULI-MAGNUS et al., 2005).

Às vezes, os metabólitos das drogas inibem inicialmente a cadeia respiratória mitocondrial, provocando depleção de ATP e concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio (ERO). A inibição da beta-oxidação resulta em esteatose, dano do DNA mitocondrial, interferindo na sua replicação ou causando diretamente formação transitória de poro (PMT), localizado em sua membrana interna (VENDEMIALE et al., 1996; PESSAYRE et al., 1999). Provavelmente, há um limiar de injúria para a inibição do transporte de elétrons mitocondriais e aumento dos ERO citosólicos. Na fase precoce, não se observa elevação dos níveis de ALT, isto é, não existem marcadores de dano mitocondrial iminente.

As ligações covalentes de metabólitos reativos com proteínas geram haptenos ou neoantígenos, que induzem respostas imunológicas específicas, com a participação de células T citotóxicas. Os produtos neoantigênicos são subsequentemente apresentados a células monócíticas, que podem ativar a formação de anticorpos anti-haptenos ou autoanticorpos, que danificam algumas estruturas celulares, como as enzimas CYP450 (NJOKU et al., 2002; ROBIN et al., 1997).

Além de hepatócitos, as drogas hepatotóxicas podem comprometer células não-parenquimatosas ou outras estruturas do fígado, como nos exemplos a seguir:

- O tratamento com a flucloxacilina gera metabólitos que danificam estruturas celulares do epitélio dos ductos biliares.

- A ativação direta das células estreladas perissinusoidais (células de Ito – precursoras do miofibroblasto) pelos produtos derivados do metotrexato resulta em fibrose portal (JASKIEWICZ et al., 1996).
- A toxicidade sinusoidal é produzida pelo alcalóide pirrolizidina.
- A doença veno-oclusiva pode ser consequência de quimioterapia usada pelo transplante de células tronco hematopoiéticas (DELEVE et al., 2002).

Quando grave, o dano consequente a hepatotoxicidade não-parenquimatosa pode estender-se aos hepatócitos e evoluir para insuficiência hepática aguda ou crônica.

1.3.2. Vias diretas e vias mediadas por receptores

A função mitocondrial pode ser comprometida pelo estresse celular direto ou por reações imunológicas específicas, que resultam em permeabilidade mitocondrial transitória (PMT). Alternativamente, os mecanismos hepatotóxicos podem seguir duas vias:

1. via intrínseca, iniciada diretamente pelo estresse oxidativo;
2. via extrínseca, mediada de forma indireta por receptores amplificados de morte celular em consequência ao estresse celular de média intensidade e ou respostas imunológicas específicas.

1.3.2.1. Apoptose e necrose

O dano mitocondrial compromete a produção de energia, resultando na morte celular por necrose ou apoptose. A PMT permite o influxo maciço de prótons através da membrana mitocondrial interna, interrompendo a síntese do ATP mitocondrial. Em consequência, há expansão da matriz, permeabilização e ruptura da membrana mitocondrial externa, com liberação de citocromo e outras proteínas mitocondriais pro-apoptóticas do espaço entre as membranas dentro do citosol (MALHI, GORES, 2008; HAOUZI et al., 2000; FELDMANN et al., 2000)

A apoptose ou morte celular programada é caracterizada por condensação nuclear e citoplasmática e fragmentação sem perda da integridade de membrana. Esses fragmentos remanescentes são histologicamente referidos como corpos de Councilman, que, posteriormente serão removidos por fagocitose. Geralmente não se acompanha de resposta inflamatória, havendo, portanto, pouco dano celular secundário.

A necrose ocorre em virtude da severidade da injúria inicial, com formação de PMT, rapidamente formado em todas as mitocôndrias. Há outros mecanismos de morte celular por necrose, associados à redução intensa e rápida de ATP e ativação da via extrínseca. São causados por toxinas que induzem estresse celular inicial, severo e direto. Histologicamente, a necrose é caracterizada pelo edema celular e a lise, que segue distúrbios diversos da função celular. Há indução de resposta inflamatória e liberação de citocinas, que são importantes porque podem amplificar a injúria inicial pela sensibilização dos hepatócitos circunjacentes.

A distinção entre necrose e apoptose não é sempre muito clara. Fenômenos mistos são descritos e determinada hepatotoxina pode causar uma ou outra ou mesmo a ocorrência concomitante de ambas, dependendo das circunstâncias, incluindo dose e vulnerabilidade pré-existente dos hepatócitos. Provavelmente, apoptose e necrose são um espectro contínuo.

Na injúria hepatotóxica, a mitocôndria pode ser o alvo da toxicidade direta inicial, com o PMT tendo um papel chave nas vias intrínsecas e extrínsecas de sinalização da morte celular. Como as mitocôndrias geram a maioria do suprimento de ATP celular e como são também a principal fonte intracelular de oxigênio e radicais livres (nitrogênio), a extensão do dano mitocondrial finalmente determina se hepatócitos morrem por apoptose ou necrose.

1.3.2.2. Mecanismos de proteção e regeneração

A extraordinária capacidade de regeneração hepática possibilita a cura completa de lesões hepatotóxicas graves. Diferentes modelos de hepatotoxicidade, utilizando uma variedade de hepatotoxinas, têm demonstrado o papel dinâmico e crucial da regeneração hepatocitária em resposta à injúria tóxica (MEHENDALE, 2005; WANG et al., 2007). Esse é um processo complexo, que parece ser dose-dependente, onde a estimulação do reparo aumenta com a exposição mais alta às hepatotoxinas. Entretanto, acima de certos limiares de toxicidade, o processo regenerativo pode ser inibido e muitos fatores modulam esses gatilhos críticos de regeneração, determinando o prognóstico final da injúria hepatotóxica. Provavelmente o conteúdo de GSH mitocondrial tem essa atividade moduladora. Embora a hepatotoxicidade possa levar a dano hepático crônico, via mecanismos especiais, tais como

a estimulação crônica de fibrose ou toxicidade biliar, com desenvolvimento subsequente de síndrome do desaparecimento do ducto biliar (ANDRADE et al., 2006), o prognóstico é principalmente dicotômico, isto é insuficiência hepática aguda ou cura completa.

1.3.2.3. Fatores de riscos de hepatotoxicidade

Hepatotoxicidade idiossincrásica severa ocorre em proporção menor do que um para dez mil pacientes expostos a drogas potencialmente tóxicas. A maioria dos fatores de risco associados tem uma prevalência muito maior (RUSSMANN et al., 2009). Tais associações tendem a ser fracas e assim não permitem uma previsão aceitável de hepatotoxicidade, na prática clínica. A presença de um simples fator de risco não é usualmente suficiente para explicar a ocorrência da hepatotoxicidade idiossincrásica. Interações complexas de diferentes mecanismos, com vários fatores de risco, devem estar implicadas na maioria dos casos (SEGUIN, UETRECHT, 2002). Fatores ambientais incidentais podem funcionar como fatores desencadeantes de risco para hepatotoxicidade.

Como fatores de risco, são apontados a idade (envelhecimento), o sexo feminino e doenças concomitantes ou outras drogas. Podem ser ainda classificados como genéticos ou ambientais (MADDREY, 2005).

Uma droga pode ser transformada, via CYP450, em um metabólito reativo com toxicidade leve sobre a mitocôndria e também ter algum efeito inibitório sobre a excreção de ácidos biliares, resultando em um discreto aumento de enzimas hepáticas. Fatores ambientais ou a introdução de drogas concomitantes ou etanol podem também induzir elevação do CYP450. A toxicidade do metabólito resulta na morte de um número crítico de hepatócitos e severa injúria hepatotóxica, com subsequente reação imunológica contra o metabólito reativo ligado às proteínas (MADDREY, 2005).

Produtos contendo kava (*Piper methysticum*) podem induzir hepatotoxicidade idiossincrásica (HUMBERSTON, 2003). Vários pacientes com insuficiência hepática aguda durante consumo de kava mostraram sinais e sintomas de hipersensibilidade, indicando reação imune específica (RUSSMANN et al., 2001; STICKEL et al., 2002). Nesses casos, houve elevações frequentes das transaminases.

Estudos da hepatotoxicidade droga-induzida claramente demonstram o papel de metabólitos tóxicos, do estresse oxidativo e da defesa contra os mesmos, com um papel crucial para o GSH (WATKINS, 2003). A relevância de outros fatores de risco, particularmente os genéticos, tem sido mostrada com hepatotoxinas que, tipicamente, causam hepatotoxicidade idiossincrásica. Fatores ambientais e variações genéticas podem afetar todos os mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade (MADDREY, 2005).

1.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O D-LIMONENO

O limoneno é o terpeno mais frequentemente encontrado na natureza. É o principal componente dos óleos voláteis, extraídos de plantas cítricas, com propriedades medicinais e aromáticas (DE MAYO, 1959). O nome é etimologicamente derivado da fruta (limão) de onde é extraído em quantidades significativas, conferindo-lhe o odor característico (COOKE, 2000).

O d-limoneno é constituinte predominante dos óleos essenciais de diversos vegetais (quadro 4).

Quadro 4 – Principais espécies vegetais que contêm óleos essenciais ricos em limoneno.

Espécie Vegetal	Referência
<i>Artemisia dracunculus</i> L. (Asteraceae)	Sayyah et al., 2004
<i>Chloroxylon swietenia</i> DC	Kiran et al. (2008)
<i>Cinnamomum insularimontanum</i>	Lin et al. (2008)
<i>Citrus aurantium</i> L. (Rutaceae)	Pultrini et al. (2006)
<i>Cymbopogon schoenanthus</i> L. Spreng	Khadri et al. (2008)
<i>Lavandula angustifolia</i> (Alfazema)	Henson et al. (2005)
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown (Verbanaceae)	Vale et al., (1999, 2002)
<i>Ocimum basilicum</i> L	Chalchat & Ozcan (2008)
<i>S. africana-caerulea</i>	Kamatou et al. (2008)

O d-limoneno (IUPAC: 1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexeno) é um hidrocarboneto cíclico, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, pertencente à família dos terpenos, da classe dos monoterpenos (CARLINI, 1986).

A isomeria óptica desse composto orgânico é conseqüente à presença de um carbono assimétrico, em seu centro quiral (DE CASTILHO et al., 2007). De acordo com a nomenclatura IUPAC, os isômeros d-limoneno e l-limoneno correspondem respectivamente ao r-limoneno e s-limoneno, mas a literatura científica tem preferido os prefixos d e l ou alfa e beta .

O limoneno forma-se a partir do composto geranyl-pirofosfato, via ciclização do neril-carbocátion (ou equivalente). Na etapa final, o alceno deriva da perda do próton do cátion, conforme a figura 3 (MANN et al., 1994).

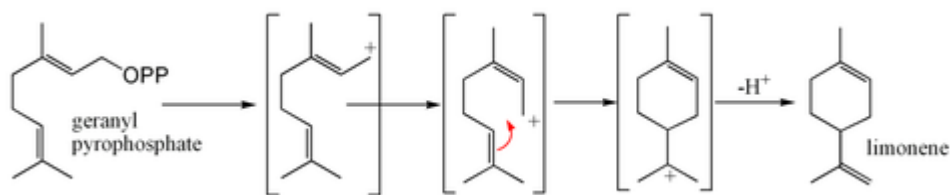


Figura 3 – Formação do limoneno a partir do geranyl pirofostato (MANN et al., 1994).

São muito antigos os relatos da utilização de óleos essenciais pelo homem (BURT, 2004). Há citações do uso de gengibre e ópio, no livro de ervas de Shen Nung, de 2700 AC., mas além dos chineses, a utilização dessas substâncias foi documentada, há milênios, por outros povos, como os hindus, persas e egípcios. Bálsamos, ervas aromáticas e resinas eram usadas para embalsamar cadáveres, há milhares de anos atrás, enquanto as soluções alcoólicas das essências também tiveram aplicações terapêuticas e na fabricação de perfumes (BURT, 2004).

Na sociedade contemporânea, os componentes voláteis extraídos das plantas aromáticas são largamente utilizados, em virtude de suas inúmeras aplicações terapêuticas e industriais (EDRIS, 2007). O limoneno é um ingrediente ativo em produtos alimentícios para adicionar-lhes sabor e odor semelhante ao do limão. Também é utilizado em sabões, perfumes, inseticidas e repelentes de inseto (GELLING et al., 1979). Os óleos essenciais, responsáveis pelo odor característico das laranjas, limões, pinheiros e carotenóides

correspondem a 1 a 2% da composição desses vegetais, tendo os monoterpenos como os seus principais constituintes não-nutritivos. À temperatura ambiente, é um líquido, límpido, incolor, oleoso e inflamável, sendo quimicamente caracterizado como um hidrocarboneto cíclico. Os isômeros configuracionais – d-limoneno e l-limoneno, não se distribuem de forma homogênea nos diversos vegetais onde ocorrem (DE CASTILHO, 2007). O d-limoneno é o produto predominantemente extraído dos limões, das laranjas (ARAÚJO, FARIAS, 2003) e da semente do cariz (alcaravia ou *Carum carvi*), enquanto o l-limoneno prevalece nas agulhas e cones dos pinheiros. A mistura de quantidades idênticas desses isômeros constitui o dl-limoneno ou dipenteno, que é um componente da turpentina.

Ao d-limoneno atribuem-se diversos efeitos farmacológicos, destacando-se as propriedades anti-tumorais (ELEGBEDE, 1984; ELEGBEDE et al., 1986; ELSON et al., 1988; MALTZMAN, 1989; HAAG et al., 1992; CROWELL et al., 1994) e antioxidantes (SAFARI et al., 2007), facilitadas pelo pequeno tamanho de suas moléculas, que lhes permite alcançar todos os tecidos e células do organismo.

O d-limoneno é um solvente biodegradável, considerado inofensivo para o ser humano, amplamente utilizado na indústria, seja como produto de limpeza ou aditivo aromático, em perfumes e cosméticos.

O limoneno é constituinte atmosférico, oriundo de fontes biogênicas ou antropogênicas (PETERS et al., 1994) Quando liberado no ar, os terpenos reagem rapidamente com o gás ozônio e com radicais nitratos e hidroxilas produzidos fotoquimicamente (LAMANNA, GOLDSTEIN, 1999). No solo, o limoneno é resistente à hidrólise e a sua biodegradação ocorre apenas em condições aeróbicas.

Após ingestão oral, o d-limoneno é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, em animais (IGIMI, et al., 1994; VIGUSHIN et al., 1998) e em humanos, podendo ser identificado no sangue, fígado, pulmão, rim, glândula mamária e vários outros tecidos, nos quais é completamente metabolizado. A vida média é estimada em 12 a 24 horas, com a excreção ocorrendo principalmente por via urinária (SUN, 2007).

O d-limoneno é metabolizado em compostos oxigenados, em ratos e humanos (CROWELL et al., 1992, 1994). No plasma e urina, os principais metabólitos identificados são o ácido di-hidroperílico, o limoneno-8,9-diol e o ácido perílico (POON et al., 1996; VIGUSHIN et al., 1998).

Estudos experimentais indicam que a toxicidade do limoneno é baixa. Alguns efeitos irritativos ou alergênicos foram observados em cobaias (KLECAK et al., 1977) e em coelhos (LACY et al., 1987; OKABE et al., 1990). Nesses roedores, Tsuji et al. (1974) também demonstraram irritação ocular. Há registros de casos de dermatite de contato em humanos (CALMAN et al., 1979; CACHAO et al., 1986; YA-CHANG, 1997). Segundo Karlberg et al. (1991, 1992), a sensibilização alérgica ao d-limoneno seria provocada por produtos de sua oxidação, como os hidroperóxidos.

Em animais experimentais, não há evidência de efeitos teratogênicos ou genotóxicos, relacionados com o limoneno (FAHRIG, 1984).

O potencial oncogênico do d-limoneno foi demonstrado em ratos machos, com a ocorrência de hiperplasia, adenoma e adenocarcinoma renais. Esses modelos não são considerados relevantes para a avaliação de riscos oncogênicos em humanos, uma vez que a enzima implicada nesse processo de carcinogênese – a alfa-2- μ globulina, é específica do rato. Os roedores com deficiência dessa enzima e que receberam d-limoneno não apresentam incidência maior de tumores ou lesões pré-neoplásicas. Quando administrado por gavagem, é possível haver formação de cilindros granulares na zona medular externa, renal (WEBB et al., 1989). Doses diárias de até 5 mg/kg do peso corpóreo não provocaram alterações histológicas.

Com a administração de N-etil-N-hidroxietilnitrosamina e d-limoneno, em ratos, observou-se uma significativa diminuição na incidência de tumores hepáticos, comparando-se com controles que receberam apenas N-etil-N-hidroxietilnitrosamina.

A toxicidade foi baixa, após administração experimental em camundongos, ratos, e cães por via oral, intraperitonal, subcutânea e intravenosa, observando-se hepatomegalia, hipocolesterolemia, aumento do fluxo biliar (KODAMA et al., 1976), inibição da atividade da S-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (CLEGG et al., 1980), aumento na atividade da epóxido hidratase (MALTZMAN et al., 1991) e das enzimas glutathioniltransferase e UDP-glicuroniltransferase (MALTZMAN et al., 1991). A exposição de curta duração (3 dias a 2 semanas) induziu aumento do citocromo hepático P-450 em ratas, após injeção intraperitonal (AUSTIN et al., 1988) ou por via oral (MALTZMAN et al., 1991). A administração oral de d-limoneno a ratos, na dose de 400 mg/kg do peso corpóreo, por 30 dias resultou em aumento de 20 a 30% na quantidade e atividade de diversas enzimas

hepáticas (CYP450, citocromo b5, aminopirina dimetilase e anilina hidroxilase), além de aumento do peso hepático e diminuição da colesterolemia (ARIYOSHI et al., 1975).

Doses diárias de até 10 mg/kg do peso corporal foram consideradas insuficientes para provocar hepatomegalia, mas o peso hepático aumentou de 5 a 20 vezes, após administração de d-limoneno em doses superiores a 75 mg/kg do peso corpóreo (KANERVA et al., 1987).

Com base em estudos de toxicidade aguda em ratos, o EPA (UNITED STATES, 1993) concluiu que o limoneno é não-tóxico para mamíferos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos citotóxicos consequentes à administração crônica de d-limoneno, em modelos animais, identificando-se e graduando-se as diversas lesões hepatocelulares, em relação com as doses utilizadas. O estudo poderá oferecer contribuições para entendimento dos mecanismos fisiopatológicos de substâncias potencialmente hepatotóxicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaios toxicológicos pré-clínicos em roedores, com base nas determinações da Resolução nº 01/88 do Conselho Nacional de Saúde e Resolução RE nº 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com algumas modificações;
- Desenvolver e validar uma metodologia para testar o possível efeito hepatotóxico do d-limoneno, administrado por via oral a roedores;
- Proceder avaliações histopatológicas, imunopatológicas e bioquímicas das lesões hepatocelulares eventualmente induzidas pelo d-limoneno, administrado em modelos animais;
- Identificar e caracterizar o efeito citotóxico em fígado, rim, pulmão e coração do d-limoneno administrado em roedores;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação das substâncias em estudo;
- Contribuir para o conhecimento de possíveis efeitos tóxicos de uma substância aromática, obtida de plantas cítricas brasileiras, amplamente utilizada na indústria de alimentos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais experimentais

No desenvolvimento do presente estudo, utilizamos ratos machos *Wistar*, albinos com aproximadamente três meses de idade e peso compreendido entre 280 e 350 gramas. Todos os roedores foram fornecidos pelo Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba.

No biotério, os animais foram alojados, até o dia dos experimentos, em gaiolas de polietileno. Eram mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $23 \pm 2^{\circ}$ C, com livre acesso a uma dieta controlada à base de ração tipo *pellets* (purina) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola.

Os animais eram mantidos em condições sanitárias adequadas, com controle do ambiente para proporcionar um ciclo claro/escuro de 12 horas, respeitando-se o ritmo circadiano. A fase clara foi programada para o período das 6:00 às 18:00 horas. Os roedores foram privados de água e ração com 60 minutos de antecedência à execução dos testes. Antes de cada procedimento, a bancada foi limpa com etanol 70%, entretanto, durante os testes, utilizou-se etanol de baixa graduação (10-30%). Os experimentos foram executados no período compreendido entre 12:00 h e 17:00 h. Após a conclusão dos respectivos estudos, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.1.2. Drogas

- Etanol P.A. (Produtos Químicos e Farmacêuticos -BRASIL);
- D-limoneno (Sigma-Aldrich E.U.A.);
- Tween-80 (Sigma-Aldrich E.U.A.);
- Água destilada

As soluções de d-limoneno foram preparadas imediatamente antes de sua utilização, veiculadas em solução de *tween*-80 a 0,2% e então administradas nos grupos experimentais, na proporção de 25 mg/kg do peso corporal e de 75 mg/kg do peso corporal. A menor dose foi determinada a partir de relatos na literatura como a mínima com atividade no sistema nervoso central, enquanto a “maior dose” foi fixada devido a ocorrência de hepatomegalia, relatada com o uso de doses superiores.

O etanol foi diluído em água destilada, na proporção de 20% e administrado diariamente em doses de 3,5 ml/kg do peso corpóreo.

A via de administração das drogas por gavagem possibilitou a ingestão oral das substâncias a serem testadas, minimizando o estresse decorrente das manipulações.

3.1.3. Parâmetros observados

Os grupos experimentais e controle foram acompanhados por um período de 45 dias, para a verificação da ocorrência de toxicidade crônica. Os grupos satélites foram acompanhados por um prazo adicional de 30 dias. Ao fim dos experimentos, todos os animais foram sacrificados por tração cervical, após obtenção de sangue para realização de exames laboratoriais. Em seguida, foram submetidos a estudo necroscópico, para avaliação histopatológica de fígado, rins, pulmões e coração.

No sangue, coletado imediatamente antes do sacrifício, foram investigados os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA).

3.1.4. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo os animais:

- Do sexo feminino;
- Com sinais de anormalidade física ou comportamental por ocasião da seleção para o estudo;

- Que não apresentaram as características descritas nos critérios de inclusão.

3.1.5. Tamanho da amostra

Os 63 animais utilizados nos experimentos foram distribuídos em oito grupos (figura 4) e as drogas administradas nos prazos de 30 ou 45 dias, conforme as indicações do quadro 5.

Quadro 5 – Distribuição dos animais por grupo e períodos de administração ou suspensão das drogas utilizadas

GRUPO	Drogas administradas	N	Período de administração das drogas	Período de suspensão das drogas (anterior ao sacrifício)
I	Nenhum produto	08	-	0
II	Veículo	10	45 dias	0
III	Etanol 20%	10	45 dias	0
IV (L25)	DL 25 mg/kg	10	45 dias	0
V (L75)	DL 75 mg/kg	10	45 dias	0
VI (L25/30)	DL 25 mg/kg	05	30 dias	0
VII (LS25)	DL 25 mg/kg	05	30 dias	30 dias
VIII (LS75)	DL 75 mg/kg	05	30 dias	30 dias

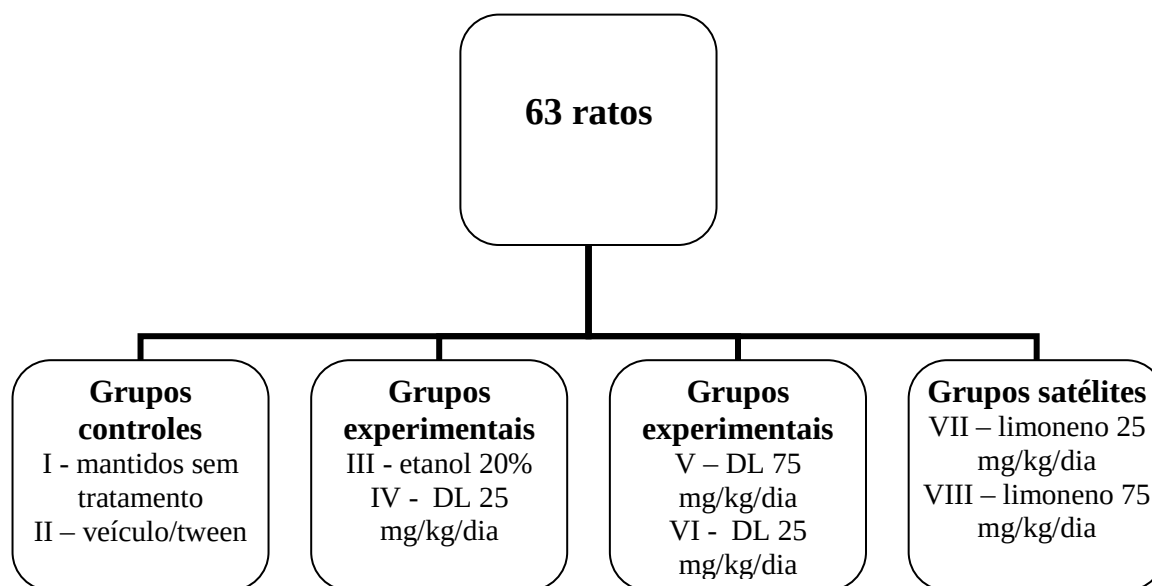


Figura 4 – Distribuição dos animais em grupos controle, experimentais e satélites

3.1.6. Considerações éticas

Os protocolos experimentais foram elaborados em acordo com os atuais preceitos éticos e técnicos para a prática didático-científica da vivisseção de animais, (JACOBSON-KRAM, KELLER, 2001; ANDERSEN ET AL., 2004; ANVISA, 2007) tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF-UFPB.

3.2. METODOLOGIA

Com o objetivo de investigar sinais de injúria hepatocelular ou das próprias lesões hepáticas, bem como dos mecanismos fisiopatológicos associados às agressões droga-induzidas, as análises realizadas neste trabalho utilizaram estudos bioquímicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos (figura 5).

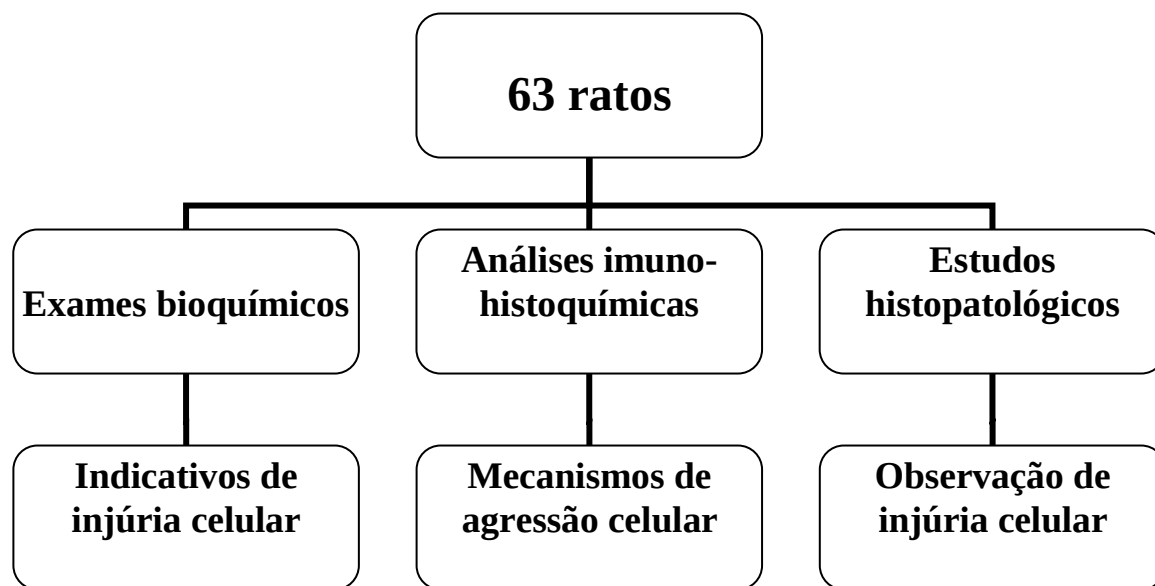


Figura 5 – Procedimentos utilizados no modelo experimental e seus respectivos objetivos.

3.2.1. Análises bioquímicas

O sangue colhido foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Toxicologia do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF/UFPB). As dosagens bioquímicas de fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) mensuradas por métodos cinéticos, em aparelho auto-analisador.

3.2.2. Estudos anatomopatológicos

No exame necroscópico, foram eviscerados o fígado, o coração, os pulmões e os rins de todos os animais. Os procedimentos anatomopatológicos compreenderam estudos macroscópicos e microscópicos dos órgãos selecionados (figura 6). A análise macroscópica incluiu as medidas e pesos dos órgãos, além da descrição das características organolépticas gerais, a saber:

- Aspecto da superfície externa (lisa, brilhante opalescente, rugosa ou nodular)
- Descrição da cápsula (fina ou espessa)
- Cor da superfície externa e de corte (vermelho, vinhosa, pálida, pardacenta, amarelada ou ferruginosa);
- Tipo de bordas (finas ou rombas);
- Consistência (elástica, firme, amolecida ou endurecida);
- Tamanho (medida tridimensional);
- Peso.

Secções tissulares representativas foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada, por um período de 24 horas. O tecido fixado e, posteriormente resseccionado, foi submetido aos protocolos de rotina de histotecnologia, com desidratação em álcool etílico e diafanização com xilol, para confecção dos blocos de parafina e cortes de 3,0 µm em micrótomo convencional.

Os cortes histológicos foram colocados sobre lâminas e corados pelas técnicas da hematoxilina-eosina, vermelho picrossírius para colágeno e método de Perls para investigação de hepatossiderose (figura 6). Todas as técnicas histológicas foram realizadas

em laboratório privado da cidade de João Pessoa (PB). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular (Nikon Eclipse E200), procedendo-se as respectivas descrições histológicas (MICHALANY, 1998). Para reduzir as limitações decorrentes da subjetividade da interpretação morfológica, as amostras do presente trabalho foram analisadas pelo pesquisador e também por um segundo patologista experiente, sem conhecimento das condições experimentais de cada caso em estudo.

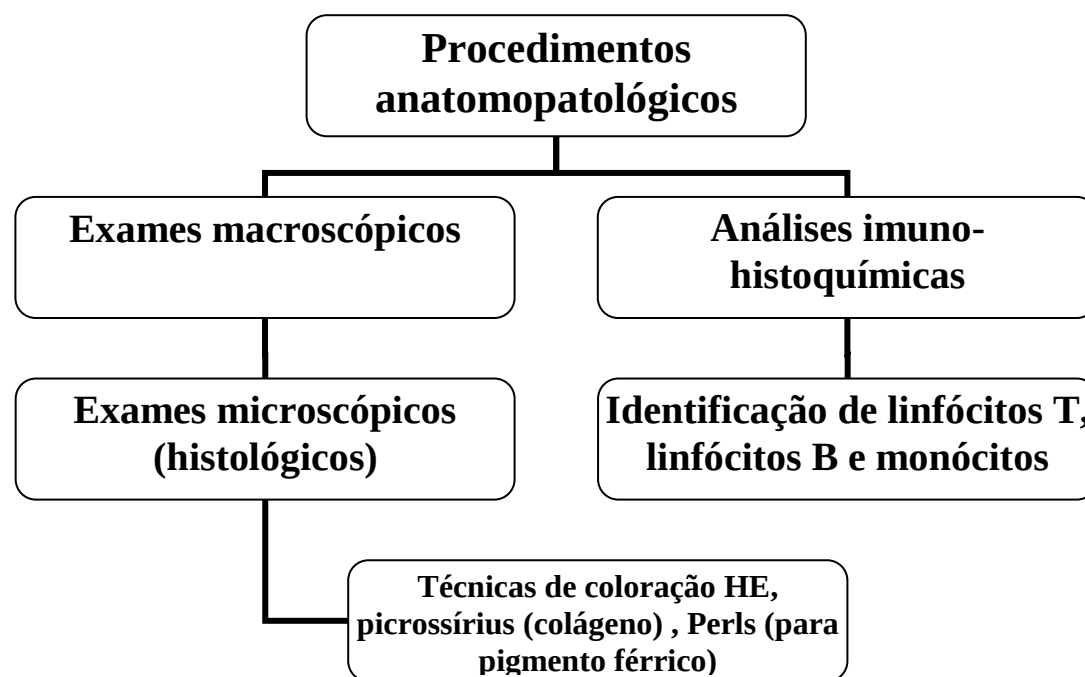


Figura 6 – Organograma para orientação dos estudos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos realizados no modelo experimental

As lesões hepáticas foram identificadas de acordo com os seguintes critérios:

- 1 – degeneração hidrópica: aumento discreto do volume celular e microvacuolização citoplasmática decorrentes de retenção hídrica (edema);
- 2 - esteatose microvesicular: acúmulo lipídico sob a forma de microvesículas citoplasmáticas com volume menor do que o do núcleo hepatocitário;
- 3 – necrose: núcleo hipocorado ou ausente, intensa eosinofilia citoplasmática e destruição ou perda da arquitetura dos cordões de hepatócitos (destrabeculação hepatocelular);
- 4 – apoptose: condensação da cromatina nuclear acompanhada de intensa eosinofilia citoplasmática

5 – infiltração leucocitária: presença de leucócitos (linfócitos, monócitos ou outros) nas várias partes do lóbulo hepático ou no tecido conjuntivo portal ou septal.

Utilizou-se um sistema de escores para graduar as lesões presentes no fígado, baseado na presença e intensidade das alterações, em conformidade com os critérios da Reunião de Consenso entre as Sociedade Brasileira de Patologia e Sociedade Brasileira de Hepatologia (1999).

Para classificação do grau de fibrose portal e periportal utilizaram-se os parâmetros apresentados no quadro 6.

Quadro 6 – Critérios para avaliação histológica do grau de fibrose em tecido hepático.

Escore	Arquitetura lobular
F0	Normal (ausência de fibrose)
F1	Expansão fibrosa de espaços portais
F2	Expansão fibrosa de espaços portais com septos porta-porta
F3	Expansão fibrosa de espaços portais com septos porta-porta e porta-centro, podendo haver formação de nódulos
F4	Cirrose com áreas nodulares predominantes em relação aos lóbulos remanescentes

A intensidade do infiltrado inflamatório no espaço portal foi graduada conforme os parâmetros indicados no quadro 7.

Quadro 7 – Critérios para avaliação histológica do grau de infiltração linfocitária portal.

Grau	Infiltrado inflamatório portal e septal
0	Ausente ou raros linfócitos portais
1	Aumento discreto do número de linfócitos portais
2	Aumento moderado do número de linfócitos portais
3	Aumento acentuado do número de linfócitos portais
4	Aumento muito acentuado do número de linfócitos portais

A atividade do infiltrado inflamatório periportal e perisseptal foi graduada conforme o esquema apresentado no quadro 8.

Quadro 8 – Critérios para avaliação histológica do grau de infiltração inflamatória periportal e perisseptal em tecido hepático.

Grau	Atividade inflamatória portal e septal
0	Ausência de lesões na interface espaço portal/parênquima
1	Extravasamento de linfócitos, não caracterizando necrose em “sacabocado”
2	Discreta necrose em “sacabocado” (em poucos espaços portais)
2	Moderada necrose em “sacabocado”
3	Necrose em “sacabocado” em extensas áreas de muitos espaços portais

O grau de atividade necroinflamatória do parênquima é apresentado no quadro 9.

Quadro 9 – Critérios para avaliação histológica do grau dos fenômenos necroinflamatórios em tecido hepático.

Grau	Atividade parenquimatosa (fenômenos necroinflamatórios)
0	Hepatócitos normais, isomorfos
1	Alterações hepatocitárias discretas (tumefação ou retração acidófila) acompanhadas de infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose
2	Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios
3	Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente
4	Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente extensa/múltipla

O grau de siderose hepática foi avaliado com base na classificação a seguir (SEARL et al, 2001):

- Ausência de ferro hepático
- Grânulos de ferro visíveis ao aumento de 400X
- Grânulos de ferro visíveis ao aumento de 100X
- Grânulos de ferro visíveis ao aumento de 25X
- Massas de grânulos de ferro visíveis ao aumento de 10X ou a olho nu

As lâminas histológicas também foram selecionadas para fotomicrografias coloridas, demonstrativas dos achados histopatológicos e imuno-histoquímicos relevantes.

3.2.3. Estudos imuno-histoquímicos

Com o objetivo de esclarecer a exata natureza das populações mononucleares inflamatórias, as amostras foram submetidas a exames imuno-histoquímicos.

Os procedimentos técnicos foram iniciados com a realização de cortes histológicos com 3 µm de espessura, dispostos sobre lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Na etapa seguinte, procedeu-se a recuperação antigênica, utilizando-se tampão citrato pH 6,0, aquecido em banho-maria à temperatura de 95 °C, por 20 minutos. Após resfriamento, aplicou-se peróxido de hidrogênio a 3%, para bloqueio da peroxidase endógena. Os anticorpos utilizados foram: CD3 (anti-células T humanas, clone UCHT1), CD20cy (anti-células B humanas, clone L26), marcador de macrófago (clone HAM-56). A diluição adotada para todos esses anticorpos foi 1:200 e o período de incubação estendeu-se a 12 horas, findo o qual o anticorpo secundário do kit LSAB foi incubado durante 30 minutos e o amplificador do mesmo kit por mais 30 minutos. Para revelação da imunorreação, utilizou-se diaminobenzidina (DAB), contra-corada com hematoxilina de Harris e montada em resina.

3.2.4. Análises estatísticas

Os dados descritos foram anotados em protocolos de estudo e levados à análise estatística, aplicando-se os seguintes testes:

Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis, para comparação dos escores histopatológicos

ANOVA com um fator de variância, seguido de teste de Tukey, para múltiplas comparações de pesos e dosagens bioquímicas. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$ (alfa = 5%). Os resultados foram expressos em termos de média $\pm$ erro-padrão da média. Todos os cálculos foram feitos por meio do programa de estatística *GraphPad Prism* versão 4.00.

4. RESULTADOS

Os 63 ratos deste trabalho experimental receberam os tratamentos programados, durante 30, 45 ou 60 dias, não tendo sido constatada qualquer intercorrência ou acidente que tenha causado óbito.

4.1 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Após completarem seus respectivos tratamentos, a atividade de AST (gráficos 1 e 2) e FA (gráficos 5 e 6) dos animais expostos ao d-limoneno não se alteraram de forma significativa. Os resultados foram estatisticamente comparáveis aos observados nos grupos controle e nos animais que receberam pequenas doses diárias de etanol (tabelas 1 e 2).

Alterações da ALT foram constatadas em animais expostos à maior dose de d-limoneno (75 mg/kg/dia), observando-se redução significativa ($p < 0,05$) entre os níveis registrados nesse grupo com relação ao respectivo grupo controle (gráficos 3 e tabela 1).

Nos animais em que, após 30 dias de administração de d-limoneno, esse tratamento foi suspenso, a atividade de ALT é comparável à observada no grupo controle (gráfico 4 e tabela 2)

Tabela 1 – Valores médios (em UI/L) da atividade de AST, ALT e FA, em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).

Parâmetro	II (Tween)	III (Álcool)	IV (L25)	V (L75)
AST (UI/L)	168,6 ± 15,8	171,2 ± 8,7	150,2 ± 10,4	147,2 ± 11,4
ALT (UI/L)	66,70 ± 4,5	65,10 ± 3,7	63,20 ± 3,7	50,80 ± 3,0*
FA (UI/L)	153,1 ± 20,7	123,1 ± 5,4	118,7 ± 8,5	104,5 ± 11,5

Os valores representam média ± e.p.m.; * $p < 0,05$ vs grupo controle (Teste ANOVA – Teste de Tukey).

Tabela 2 - Valores médios (em UI/L) da atividade de AST, ALT e FA, em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).

Parâmetro	Controle	Grupo VII (LS25)	GRUPO VIII (LS75)
AST (UI/L)	173,6 ± 21,2	147,8 ± 3,9	142,4 ± 8,6
ALT (UI/L)	71,63 ± 4,5	70,60 ± 7,7	85,40 ± 9,5
FA (UI/L)	326,6 ± 32,8	224,4 ± 44,0	410,8 ± 75,1

Os valores representam media ± e.p.m. (Teste ANOVA – Teste de Tukey).

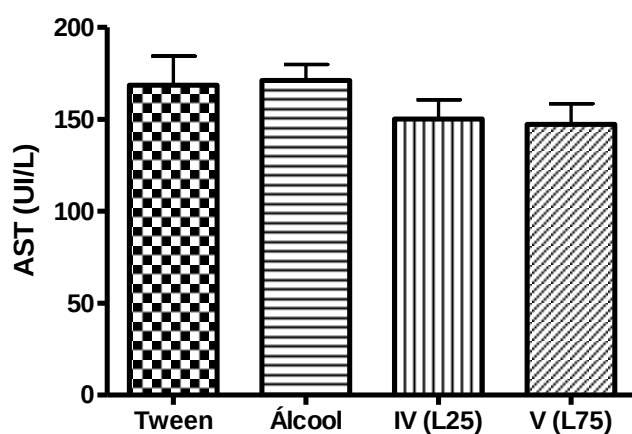


Gráfico 1 – Níveis médios da atividade de AST (UI/L) em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).

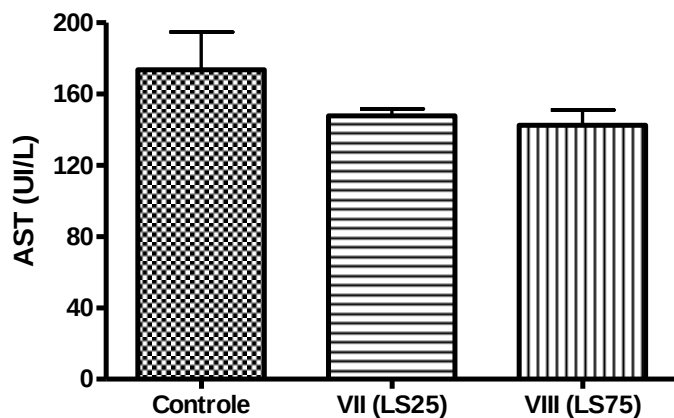


Gráfico 2 – Níveis médios da atividade de AST (UI/L) em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).

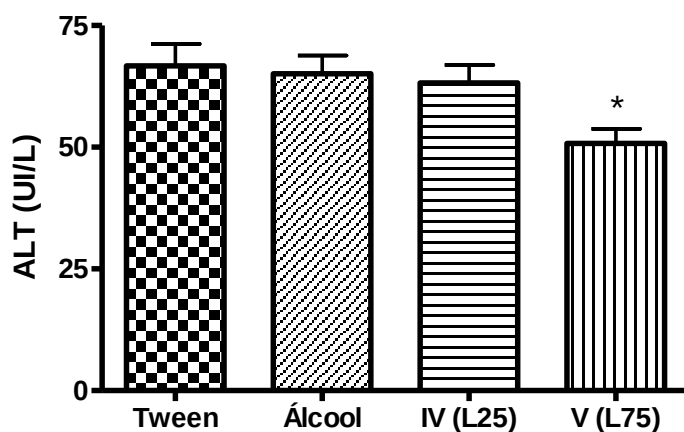


Gráfico 3 – Níveis médios da atividade de ALT (UI/L), em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).

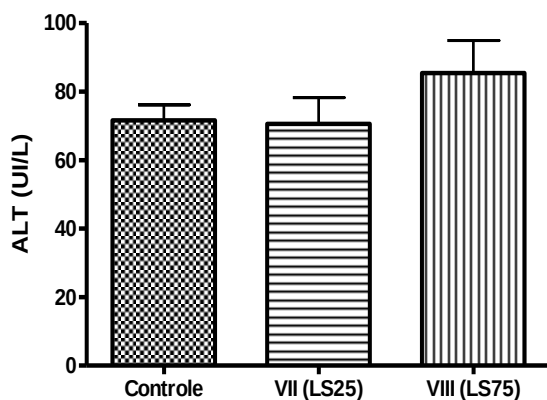


Gráfico 4 – Níveis médios da atividade de ALT (UI/L) em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).

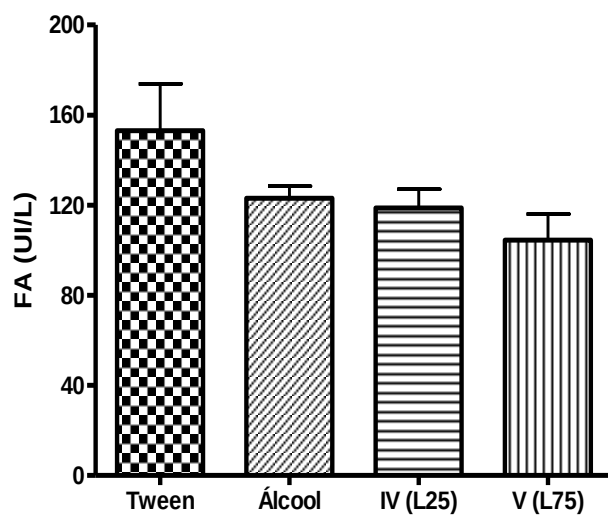


Gráfico 5 – Níveis médios de FA (UI/L) em ratos, em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controla); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).

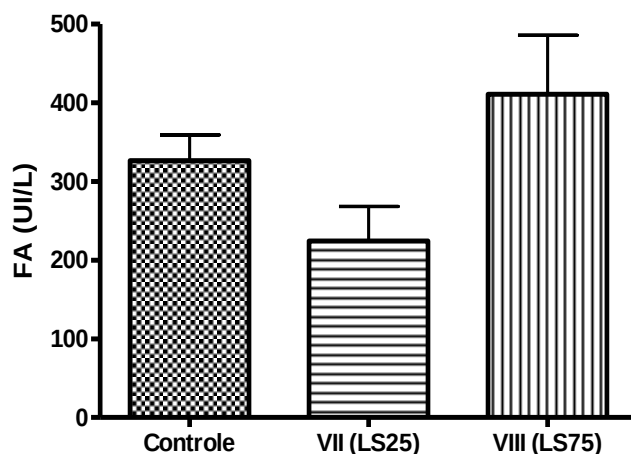


Gráfico 6 – Níveis médios da atividade de FA (UI/L) em ratos do grupo controle (I) e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos com DL 25 mg/kg/dia (grupo VII - LS25) e 75 mg/kg/dia (grupo VIII - LS75).

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO FÍGADO, RIM, CORAÇÃO E PULMÕES

O exame necroscópico da cavidade abdominal não revelou sinais de hipertensão portal ou ascite, em quaisquer dos animais.

Ao exame macroscópico, todos os ratos apresentaram fígado de conformação normal, com múltiplos lobos, superfície externa lisa, brilhante, vinhosa, recoberta por cápsula fina. As superfícies de secção eram compactas, de mesma cor, com desenho lobular pouco aparente (figura 7).



Figura 7. Aspecto macroscópico do fígado de rato tratado com DL 75 mg/kg/dia por 30 dias.

Tabela 3 – Valores médios do peso hepático, em ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL, doses de 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).

Parâmetro	Tween	Álcool	IV (L25)	V (L75)
Peso do Fígado	7,470 ± 0,5	7,900 ± 0,4	8,600 ± 0,8	7,970 ± 0,5

Os valores representam media ± e.p.m. (Teste ANOVA – Teste de Tukey).

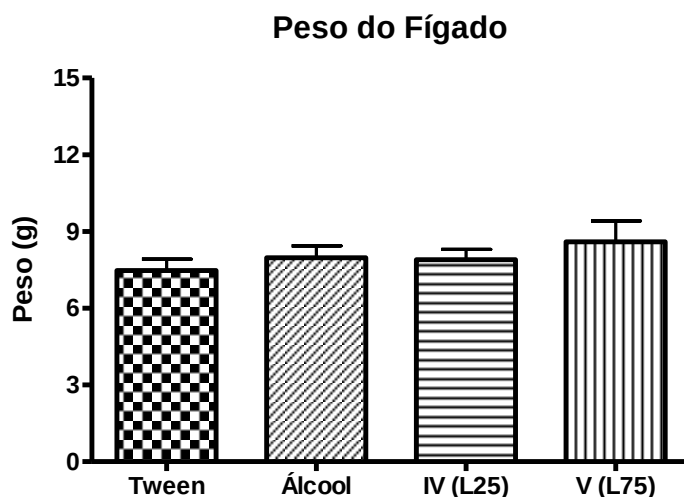


Gráfico 7 - Valores médios do peso hepático de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, 3,5 ml/kg/dia (grupo III) e com DL 25 mg/kg/dia (grupo IV - L25) e 75 mg/kg/dia (grupo V - L75).

Tabela 4 – Valores médios do peso hepático de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL, nas doses de 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75).

Parâmetro	Controle	VI (L25/30)	VII (LS25)	VIII (LS75)
Peso do Fígado	12,21 ± 0,3	10,30 ± 1,6	11,94 ± 0,2	12,18 ± 0,5

Os valores representam média $\pm$ e.p.m.; (Teste ANOVA – Teste de Tukey).

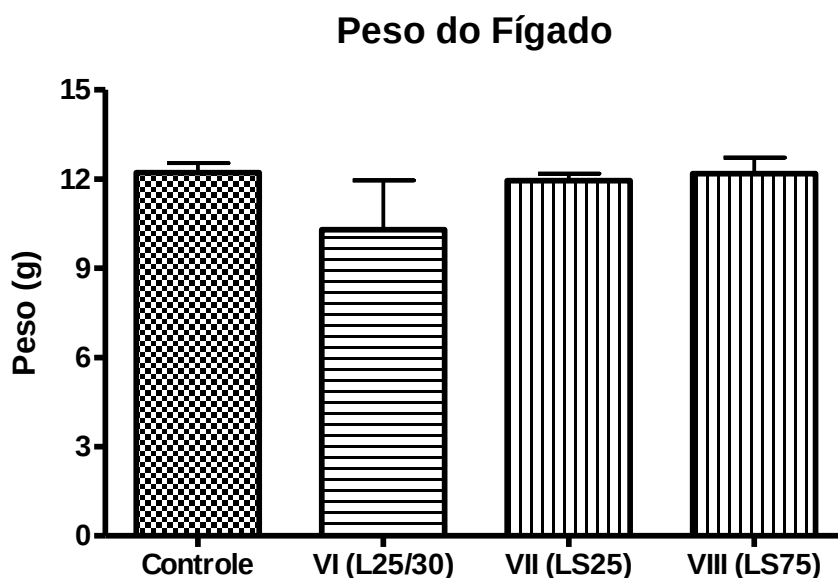


Gráfico 8 – Valores médios do peso hepático de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75).

Em relação ao estudo macroscópico dos rins, pulmões e coração, todos esses órgãos tinham forma, tamanho e superfície de corte dentro dos parâmetros da normalidade.

Os rins mostraram superfície externa lisa, pardacenta, envolvida por cápsula opalescente, facilmente destacável do parênquima subjacente. No hilo, identificaram-se os cálices. A superfície de corte era compacta, pardacenta, com região cortical e medular distintas. Na zona medular, observaram-se pirâmides com vértices (papilas) voltados para os cálices. Ureteres eram pervios.

Os pulmões apresentaram superfície externa lisa, de tonalidade rósea, envolvida por pleura fina e transparente, com evidente e fina vascularização. A superfície de corte era esponjosa, de mesma tonalidade, com textura delicada, podendo-se identificar secções transversais de estruturas brônquicas.

Os corações foram seccionados à altura dos vasos da base, que se mostravam p rvios e proporcionais às dimensões do  rg o. Tinham superfície externa lisa, recoberta por epicárdio transparente e delicadamente vascularizado. Abertos os órgãos, coágulos recentes *post-mortem* foram, às vezes, identificados nas câmaras, que se apresentavam forradas por endocárdio liso e brilhante. As válvulas tinham suas bordas livres.

4.3 HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO

Os achados histopatológicos em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina foram os seguintes:

- 1) fígado normal
- 2) lesões hepatocelulares (degeneração hidrópica, esteatose microvesicular, apoptose e necrose) ou estromais (fibrose)
- 3) inflamação discreta (grau 1) ou moderada (grau 2) em:
 - a. Espaços portais,
 - b. Lóbulos hepáticos (parênquima),
 - c. Espaços portais e lóbulos hepáticos.

As lesões hepatocitárias acima indicadas (figuras 8, 9 e 10) não foram observadas de forma isolada, mas sempre em associação com processos inflam t rios, caracterizados pela exsudação de células mononucleares (linfócitos e histiócitos), nos compartimentos portais e ou lobulares.

Reação estromal (fibrose) não foi identificada nas lâminas coradas pela técnica HE. A utilização da coloração picrossírius demonstra, na zona 3, formação de finos septos conjuntivais, perissinusoidais (figuras 11 e 12). A intensidade da inflamação foi analisada com a utilização de escores semi-quantitativos (quadros 6 a 9) conforme os parâmetros estabelecidos na reunião de consenso entre a Sociedade Brasileira de Patologia e Sociedade Brasileira de Hepatologia (1999).

As figuras a seguir exemplificam as lesões histológicas identificadas no tecido hepático (figuras 9 a 23).

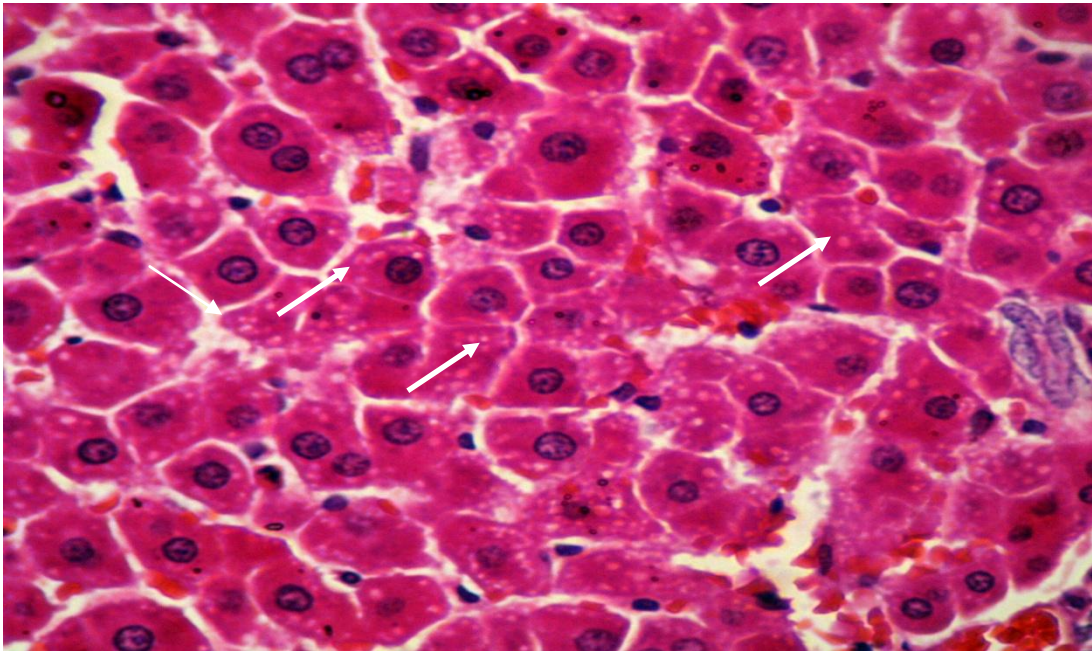


Figura 8. Microvacúolos intracitoplasmáticos (setas) em hepatócitos de rato, após 45 dias de tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X400).

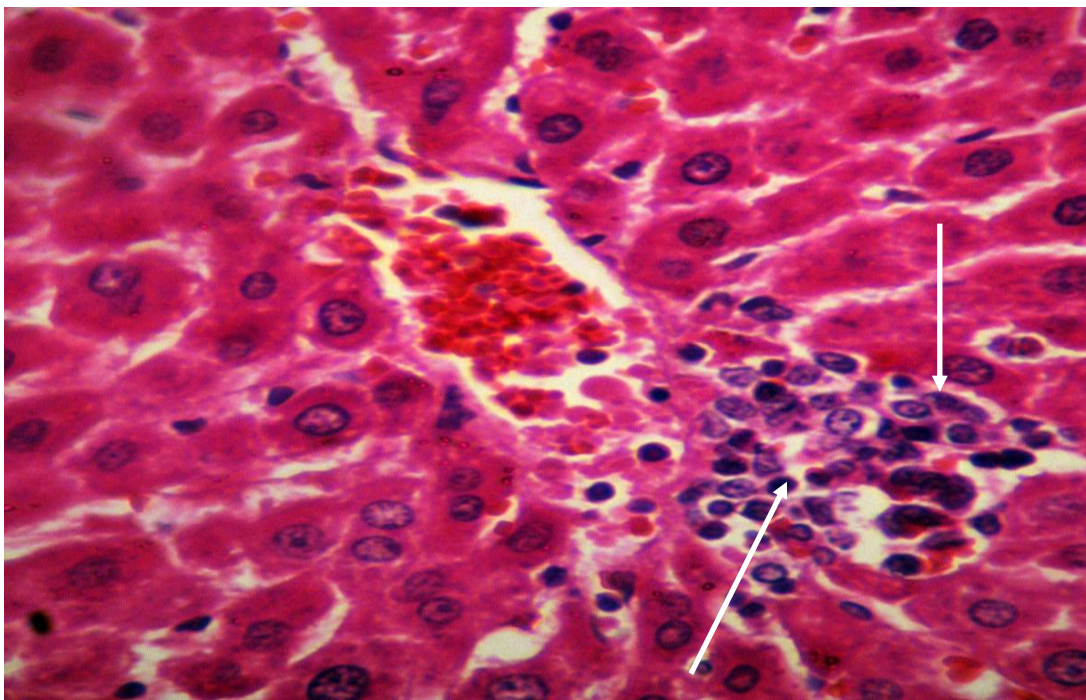


Figura 9. Foco de necrose hepatocitária perivenular (zona 3 do lóbulo), associado à mobilização mononuclear (setas), em fígado de rato, após 45 dias de tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X400).

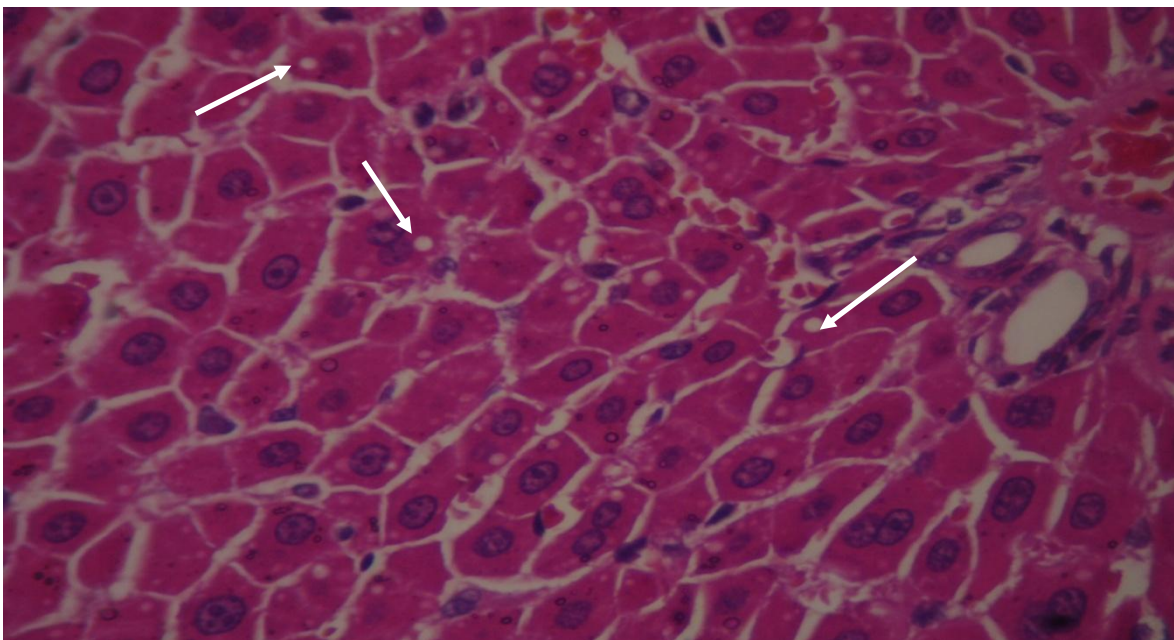


Figura 10. Focos isolados de esteatose microvesicular (setas), em fígado de rato, após 45 dias de tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X400).

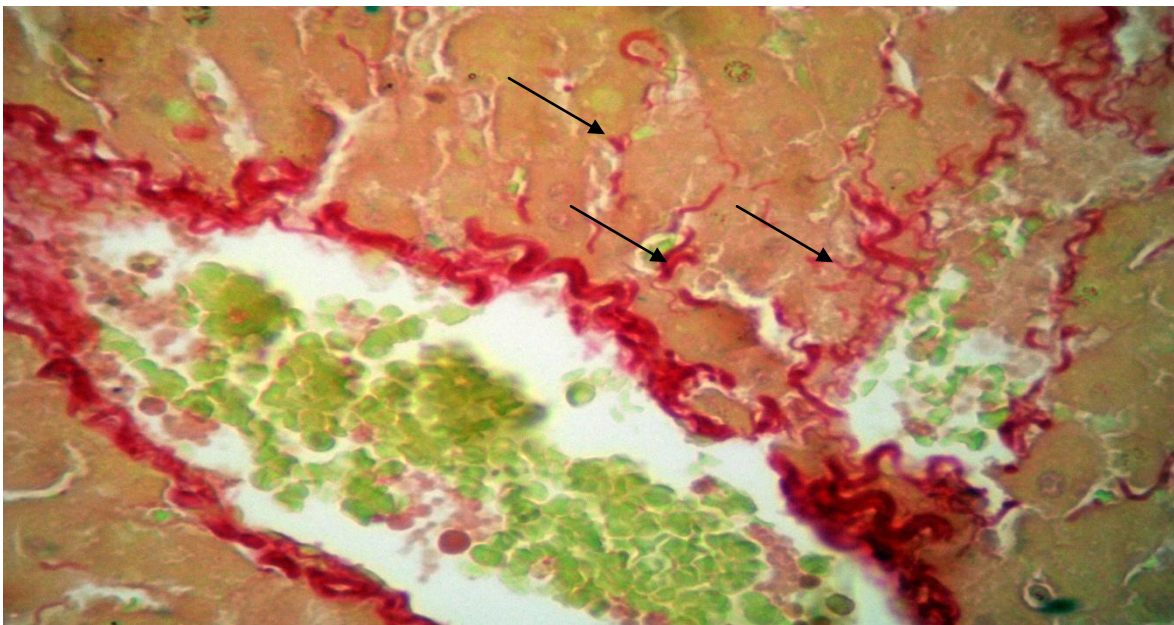


Figura 11. Finos septos conjuntivais neoformados (setas), em espaços perissinusoidais da zona 3 do lóbulo, em fígado de ratos, após 45 dias de tratamento com DL 75 mg/kg/dia (Picrossírius X 400)

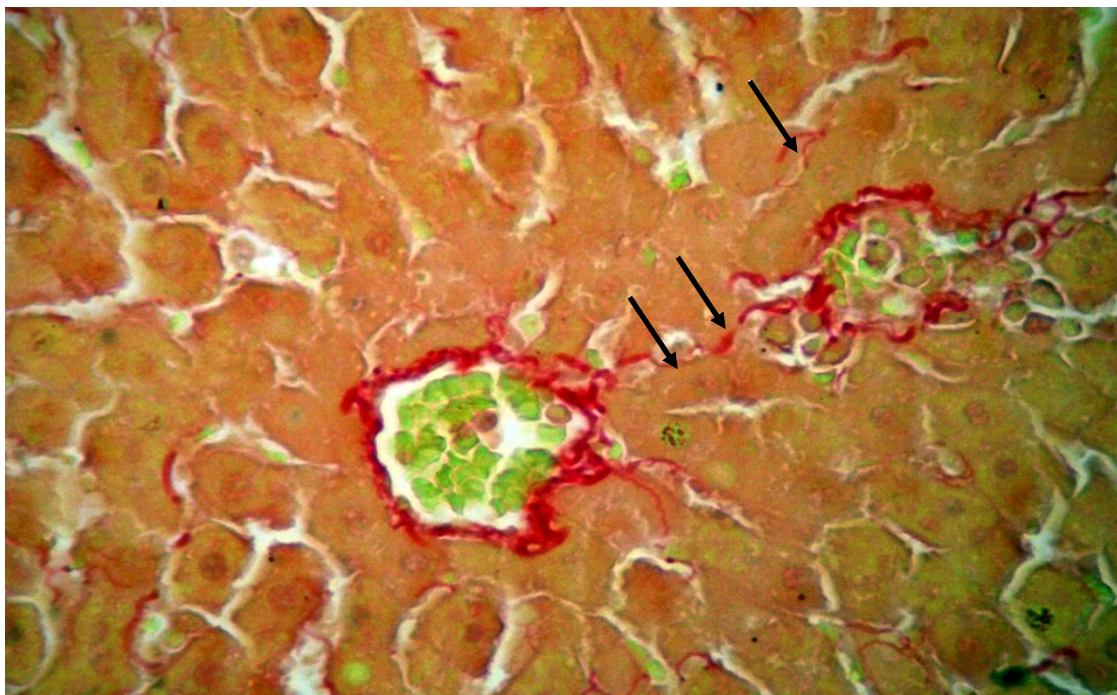


Figura 12. Finos septos conjuntivais neoformados (setas), em espaços perissinusoidais da zona 3 do lóbulo, em fígado de ratos, após 45 dias de tratamento com DL 25 mg/kg/dia (Picrossírius X 400).

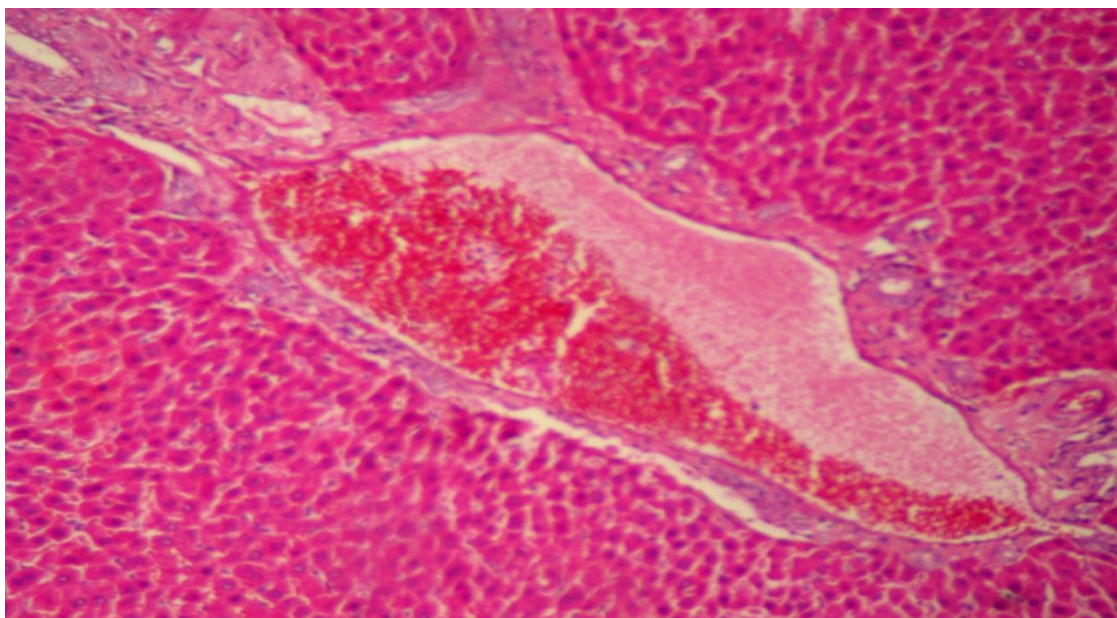


Figura 13. Fígado de rato do grupo controle, nos limites histológicos da normalidade, observando-se escassos linfócitos (provavelmente residentes) permeando o estroma conjuntivo portal (HE X100).

De uma maneira geral, os fígados dos grupos controle (I e II) estavam dentro dos limites da normalidade, admitindo-se, nesses casos, a presença de escassas células mononucleares, no parênquima ou em espaços portais (figura 13)

Nos grupos experimentais, o grau de inflamação (leve ou moderada) é relacionado à quantidade de células mononucleares, que se dispersam ou constituem aglomerados, no parênquima ou espaços portais, conforme os escores indicados nos quadros de 6 a 9. Focos de necrose hepatocitária geralmente acompanhavam a inflamação lobular.

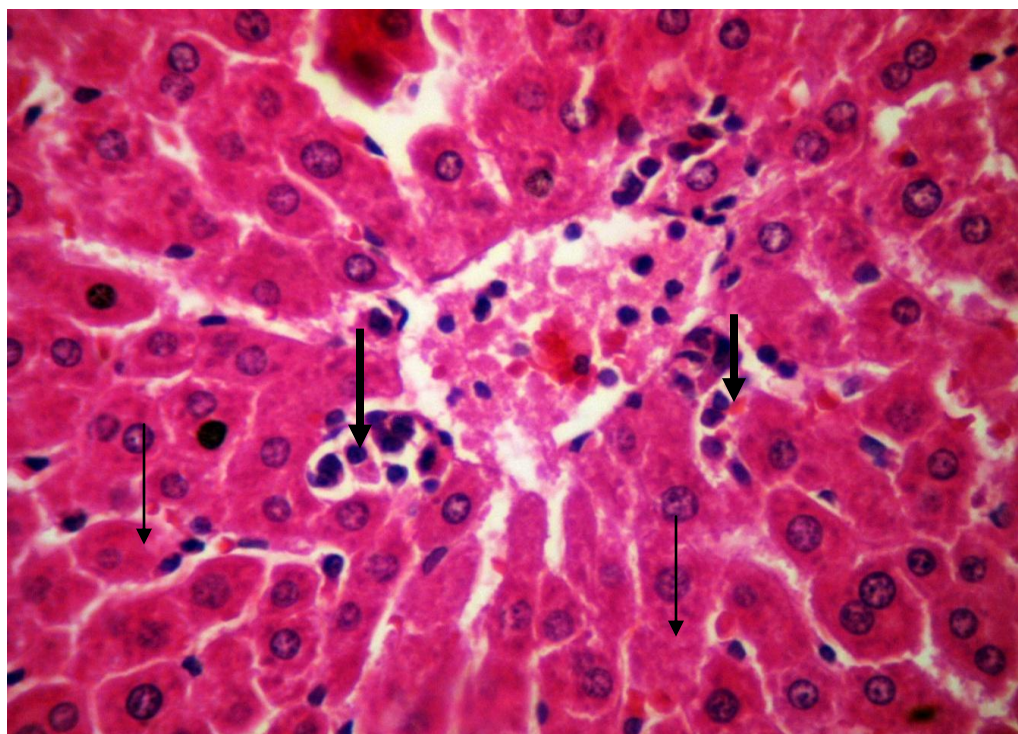


Figura 14. Inflamação lobular grau 1 (leve). Alterações hepatocitárias discretas - tumefação ou retração acidófila (setas finas) acompanhadas de infiltrado linfo-histiocitário e focos de necrose (setas grossas), após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).

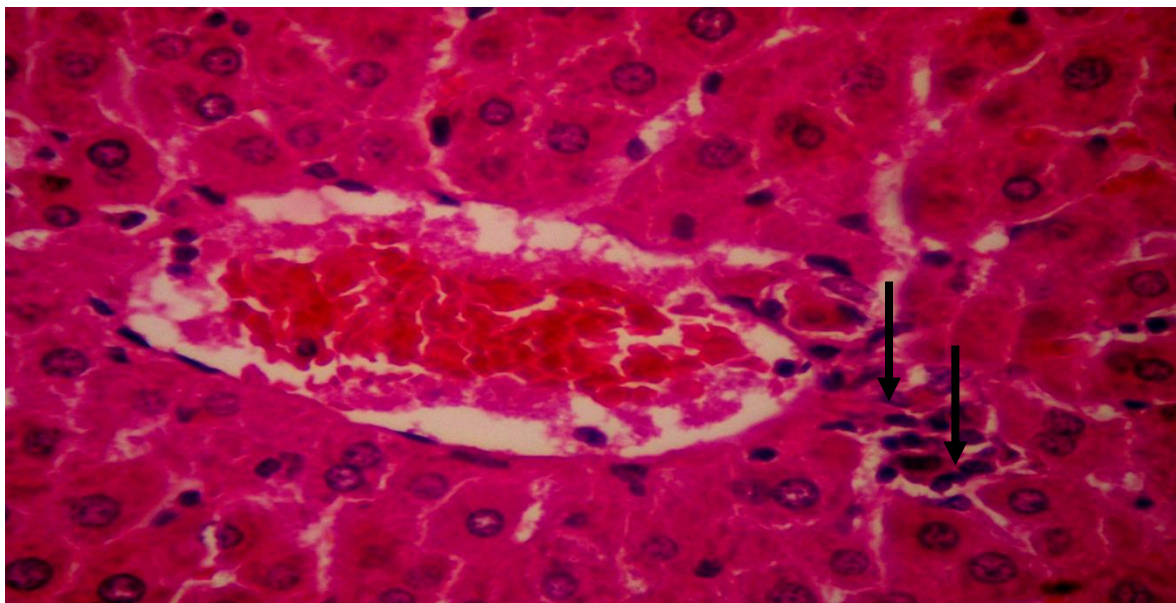


Figura 15. Inflamação lobular grau 1 (leve), com alterações hepatocitárias discretas (tumefação ou retração acidófila) acompanhadas de infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose (setas), em zona perivenular, após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).

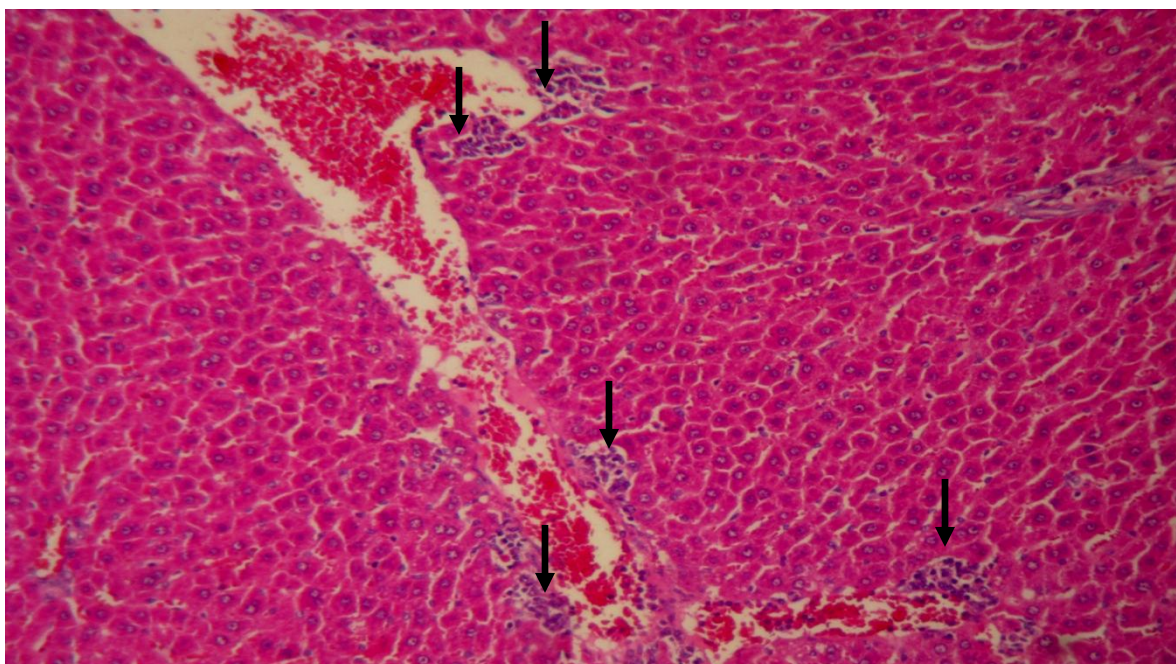


Figura 16. Inflamação lobular grau 2 (moderada), com focos de necrose hepatocitária circundados por agregados linfo-histiocitários (setas) em numerosos sítios, após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 100).

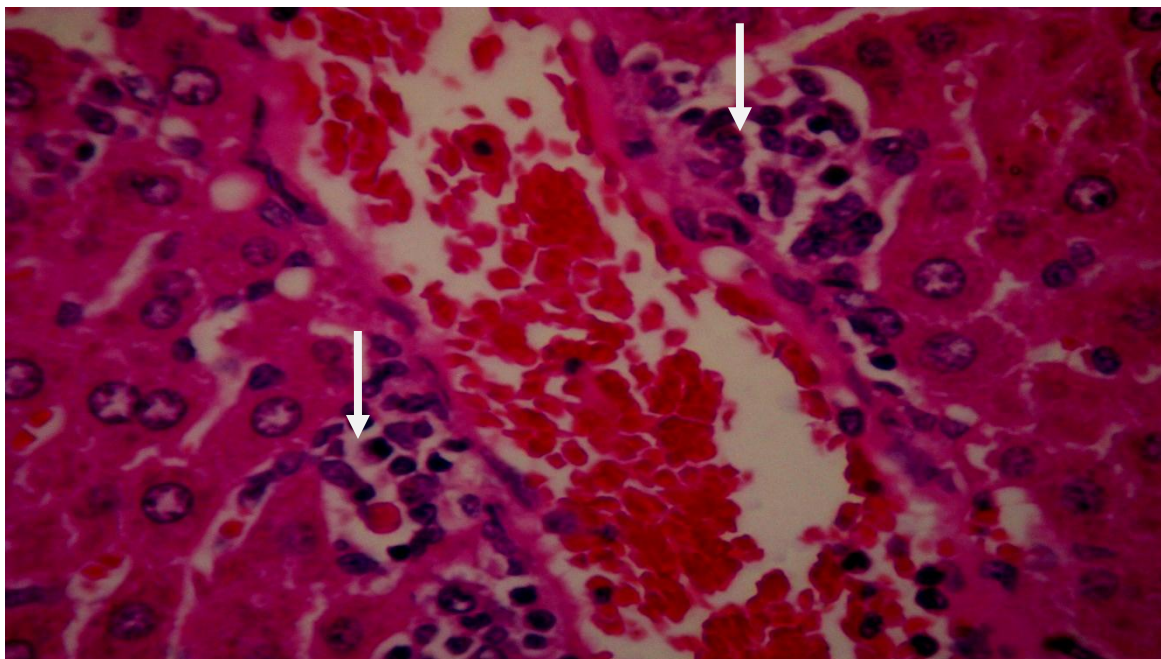


Figura 17. Inflamação lobular grau 2 (moderada). Focos de necrose hepatocitária circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios (setas), após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 400).

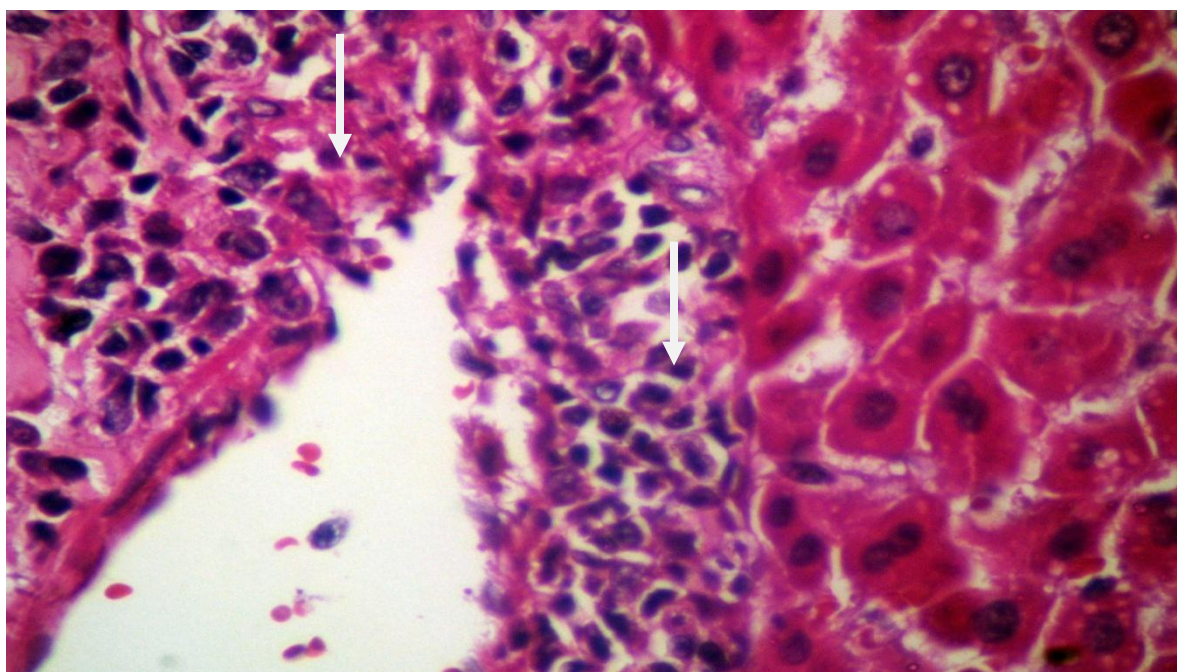


Figura 18. Inflamação lobular grau 2 (moderada). Focos de necrose hepatocitária circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios (setas), após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 400).

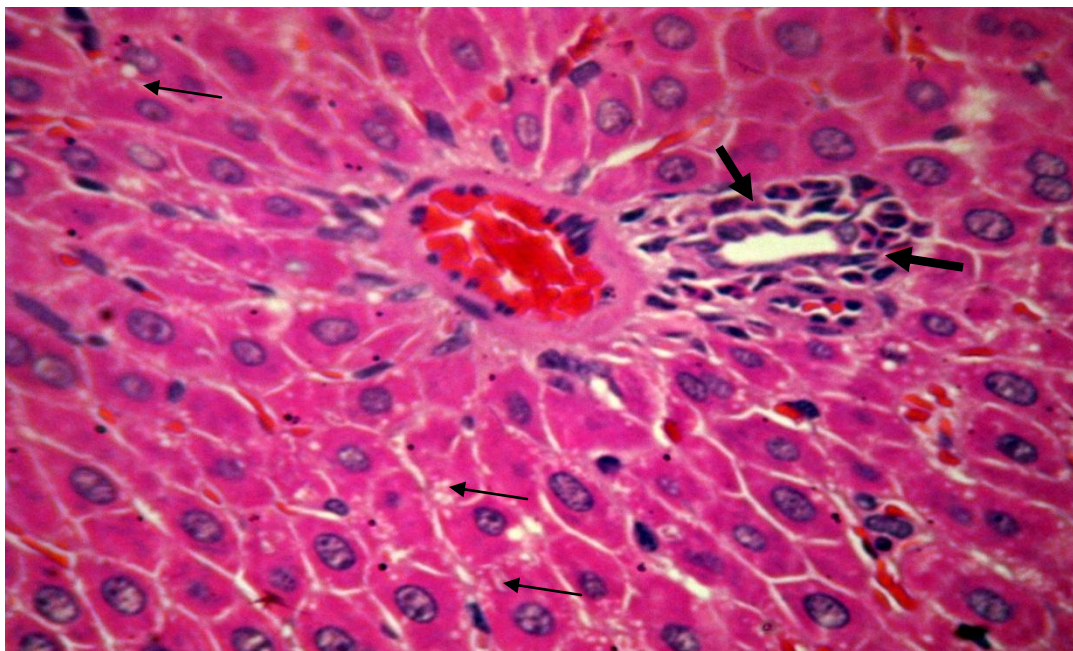


Figura 19. Inflamação portal grau 1 (discreta) - leve aumento do número de linfócitos no espaço porta (setas grossas) associada a degeneração hidrópica hepatocitária (setas finas), após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).

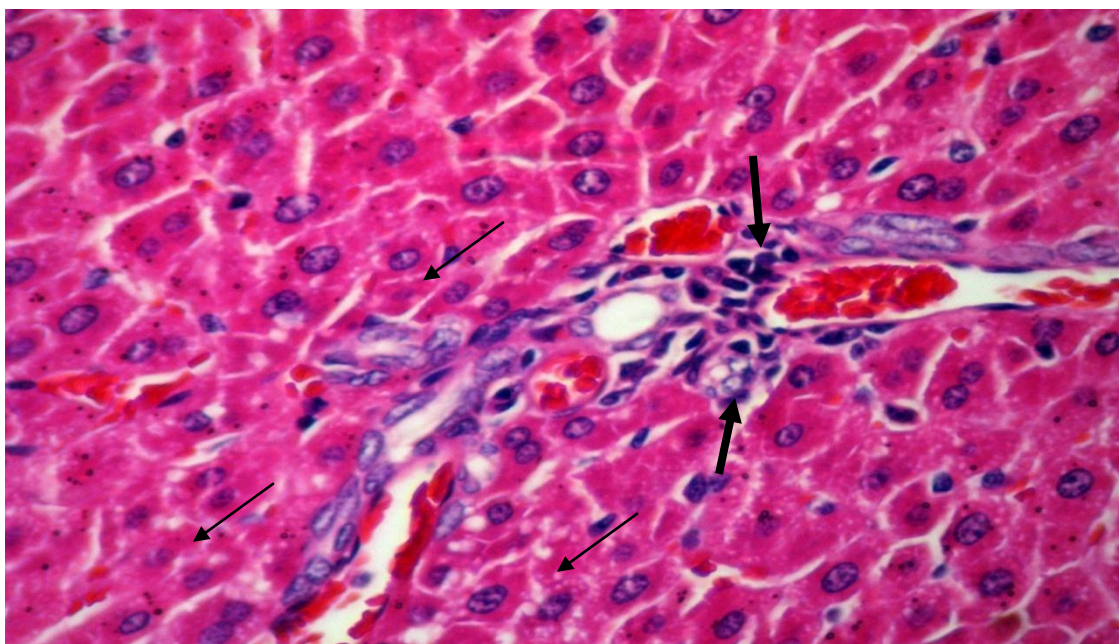


Figura 20. Inflamação portal grau 1 (discreta). Leve aumento do número de linfócitos portais (setas espessas); microvacuolizações citoplasmáticas são expressão de degeneração hidrópica (setas finas). após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).

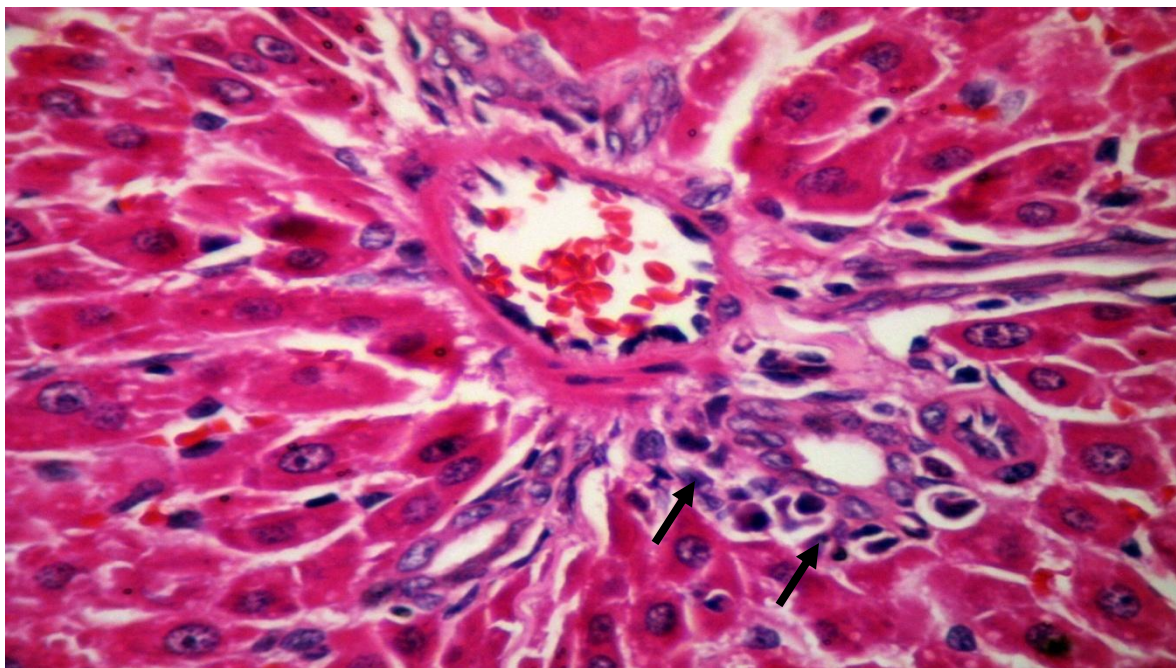


Figura 21. Inflamação portal grau 1, com aumento discreto do número de linfócitos portais (setas), após tratamento com DL 25 mg/kg/dia (HE X 400).

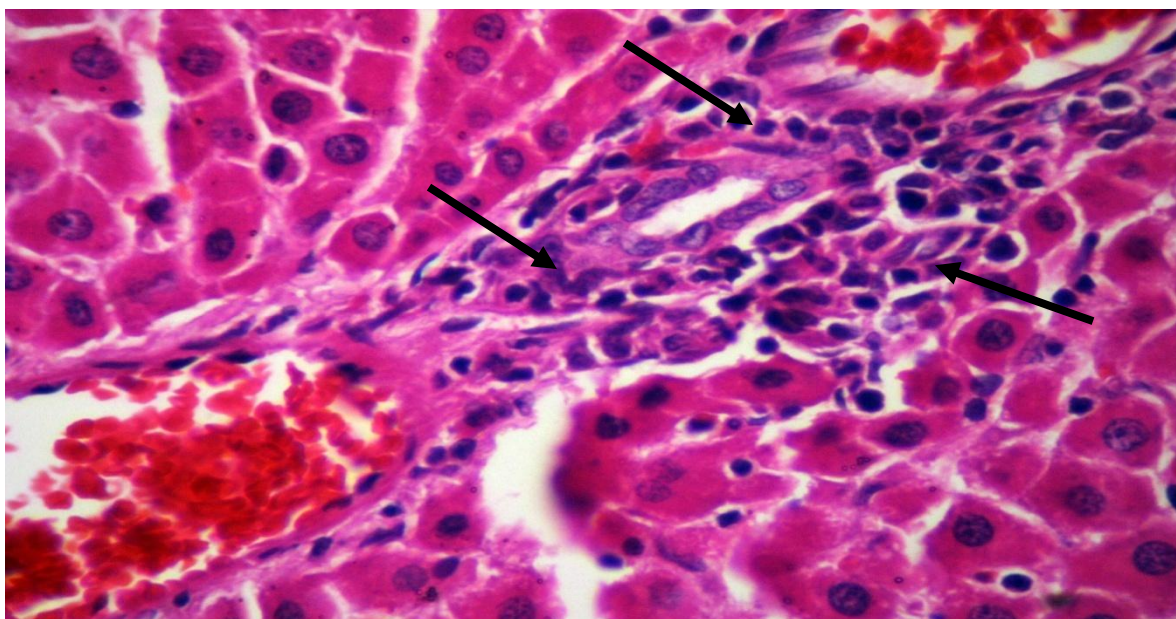


Figura 22. Inflamação portal grau 2, com aumento moderado do número de linfócitos portais (setas), em fígado de ratos, após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 400).

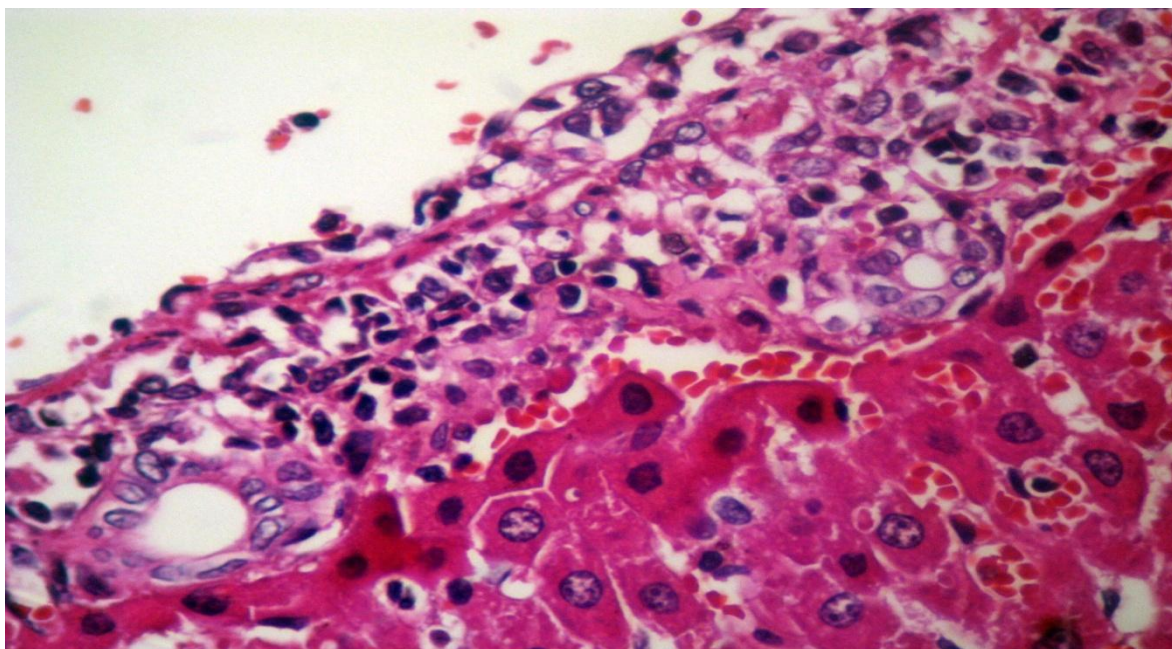


Figura 23. Inflamação portal grau 2 (moderado). Aumento moderado do número de linfócitos portais, em fígado de ratos, após tratamento com DL 75 mg/kg/dia (HE X 400).

A intensidade da resposta inflamatória foi avaliada separadamente, nos compartimentos portal/septal e parenquimatoso (quadros 6 a 9).

De acordo com os escores apresentados no quadro 7, a reação linfomonocitária, restrita ao espaço portal, foi considerada como discreta ou grau 1, em 50% ou mais de todos os fígados estudados (tabela 5)

A reação linfomonocitária portal moderada ou grau 2 não foi observada nos grupos I, II (tween) e no grupo VII (LS75). Não foram registrados casos com inflamação portal/septal grau 3 ou 4.

Tabela 5 – Grau de inflamação portal em ratos dos grupos controle I e II (tween) e dos grupos tratados com etanol 20% (3,5 ml/kg/dia -grupo III), com DL (25 mg/kg/dia – grupo IV e 75 mg/kg/dia - grupo V) durante 45 dias; com DL durante 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VI); com DL, administrado durante 30 dias e suspenso por 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VII e 75 mg/kg/dia - grupo VIII).

Grupos	Grau de inflamação hepática portal			
	0	1	2	3 ou 4
Grupo I (controle)	2 (25%)	6 (75%)	0	0
Grupo II (tween)	3 (30%)	7 (70%)	0	0
Grupo III (álcool)	0	6 (60%)	4 (40%)	0
Grupo IV (L25)	0	5 (50%)	5 (50%)	0
Grupo V (L75)	2 (20%)	7 (70%)	1 (10%)	0
Grupo VI (L25/30)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	0
Grupo VII (LS25)	0	3 (60%)	2 (40%)	0
Grupo VIII (LS75)	1 (20%)	4 (80%)	0	0

Quando se analisa a significância do grau de resposta inflamatória portal, constata-se haver diferenças apenas entre o grupo controle (tween) e o grupo IV (L25), que foi tratado com DL na dose de 25 mg/kg/dia, durante 45 dias ($p < 0,05$). Os dados referentes aos animais tratados com d-limoneno ou álcool por 45 dias (grupos II, III, IV e V) e d-limoneno durante 30 dias (grupos I, VI, VII e VIII) estão especificamente representados nos gráficos 10 e 11.

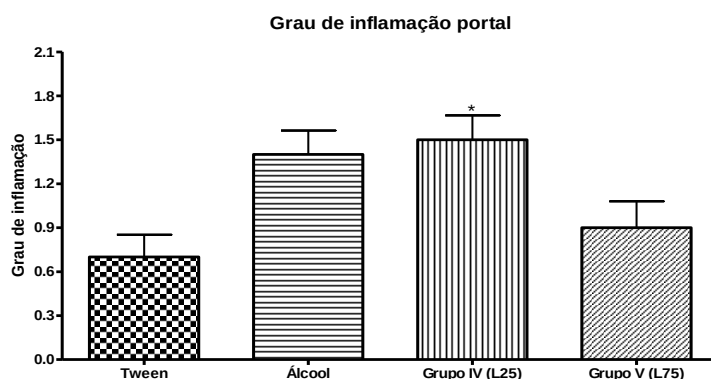


Gráfico 9 - Valores médios dos graus de inflamação portal dos fígados de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, (3,5 ml/kg/dia - grupo III) e com DL (25 mg/kg/dia - grupo IV ou L25; 75 mg/kg/dia - grupo V ou L75).

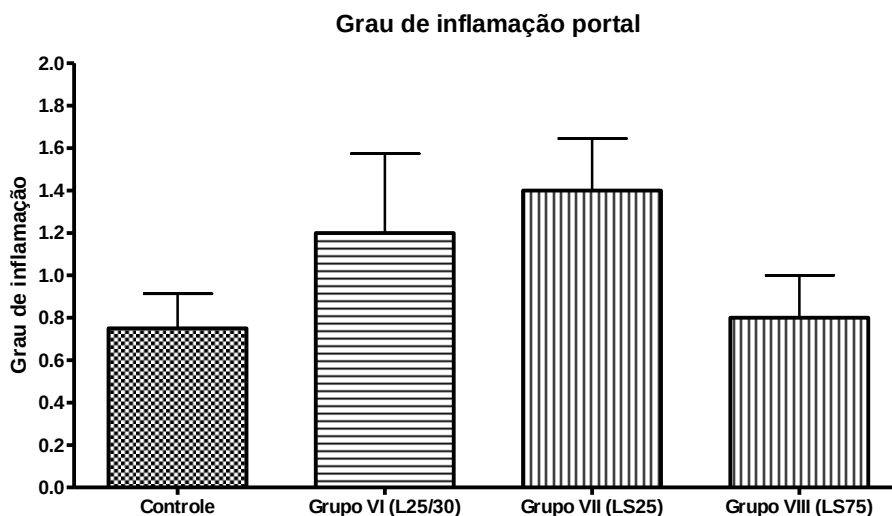


Gráfico 10 – Valores médios dos graus de inflamação portal no fígado de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75).

Considerando-se a intensidade da infiltração inflamatória linfomonocitária no parênquima hepático (inflamação lobular), em conformidade com os parâmetros indicados no quadro 9, não há reações grau 2 ou maior, nos grupos controle (tabela 6).

Inflamação lobular discreta (grau 1) ocorreu de forma predominante nos grupos satélites (VII/LS25 e VIII/LS75), presente em 50% dos fígados do grupo V (L75), conforme detalha a tabela 6.

Inflamação lobular moderada (grau 2) ocorreu em 50% dos fígados do grupo V (L75), tendo sido a intensidade predominante nos animais do grupo IV (L25), conforme demonstra a tabela 6.

Tabela 6 – Grau de inflamação parenquimatosa (lobular) em ratos dos grupos controle I e II (tween) e dos grupos tratados com etanol 20% (3,5 ml/kg/dia -grupo III), com DL (25 mg/kg/dia – grupo IV e 75 mg/kg/dia - grupo V) durante 45 dias; com DL durante 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VI); com DL, administrado durante 30 dias e suspenso por 30 dias (25 mg/kg/dia - grupo VII e 75 mg/kg/dia - grupo VIII)

	Grau de inflamação hepática lobular			
	0	1	2	3 ou 4
Grupo I (Controle)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0	0
Grupo II (Controle/tween)	6 (60%)	4 (40%)	0	0
Grupo III (álcool)	4 (40%)	2 (20%)	4 (40%)	0
Grupo IV (L25)	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)	0
Grupo V (L75)	0	5 (50%)	5 (50%)	0
Grupo VI (L25/30)	0	2 (40%)	3 (60%)	0
Grupo VII (LS25)	1 (20%)	4 (80%)	0	0
Grupo VIII (LS75)	0	3 (60%)	2 (40%)	0

Quando se analisou estatisticamente o grau de atividade inflamatória no compartimento parenquimatoso, constataram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados dos grupos controle (I e II) e os dos grupos IV e V. Entretanto, não há significância ao comparar-se a intensidade inflamatória dos grupos controles (I e II) com os grupos satélites (VI e VII) e o grupo III (gráficos 13 e 14).

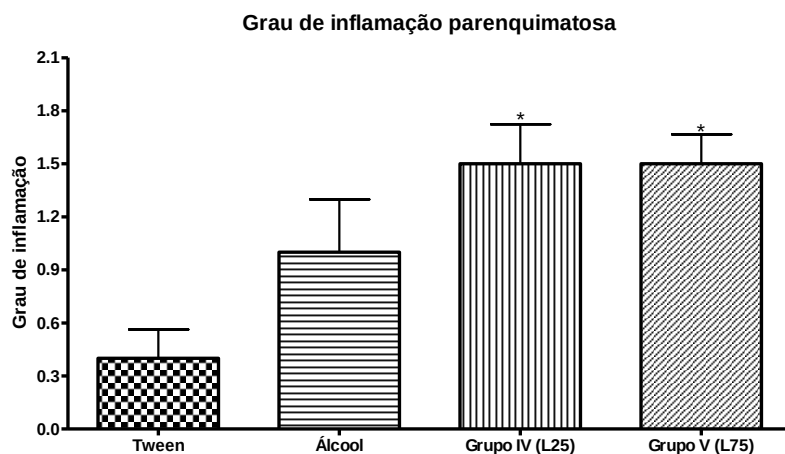


Gráfico 11 – Valores médios dos graus de inflamação parenquimatosa em fígados de ratos, após 45 dias de tratamento com tween (grupo II/controle); com etanol 20%, (3,5 ml/kg/dia - grupo III) e com DL (25 mg/kg/dia - grupo IV ou L25; 75 mg/kg/dia - grupo V ou L75).

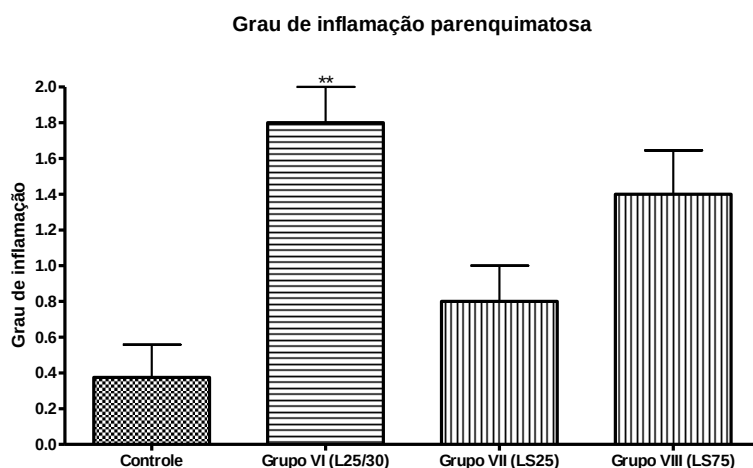


Gráfico 12 – Valores médios dos graus de inflamação parenquimatosa no fígado de ratos dos grupos I (controle) e dos grupos VI (L25/30), tratados com DL, 25 mg/kg por 30 dias e dos grupos satélites, após 30 dias de suspensão dos respectivos tratamentos - DL 25 mg/kg/dia/30 dias (grupo VII – LS25) e 75 mg/kg/dia/30 dias (grupo VIII – LS75).

As análises qualitativas das imunomarcações com a utilização de anticorpos monoclonais demonstraram que nos presentes modelos experimentais:

1) Os infiltrados inflamatórios em tecido hepático tinham componente histiocítico, estando associadas a leve hiperplasia de células de Kupffer evidenciadas pelo marcador de macrófago, clone HAM-56 (figura 24)

2) O infiltrado inflamatório era predominantemente constituído por células T citotóxicas, conforme resultados de expressões obtidos com CD3- anti-células T humanas, clone UCHT1 (fig. 22) e CD8- anti-células T citotóxicas, clone M707 (figura 23)

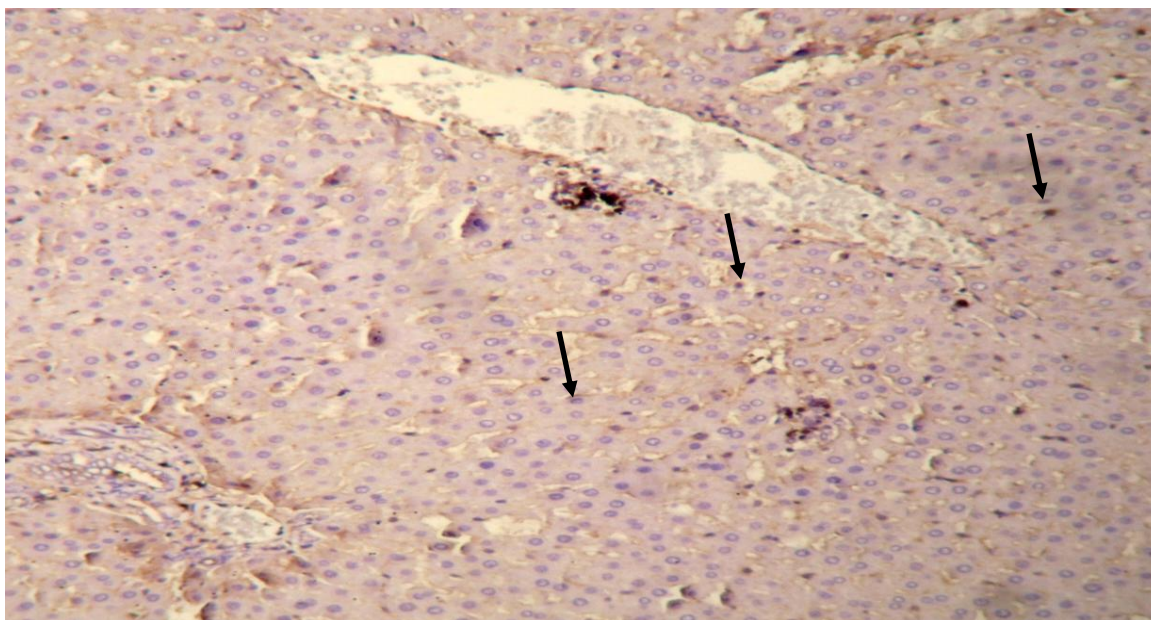


Figura 24. Imunomarcção positiva de HAM56 (marcador de macrófago), em infiltrado inflamatório de zona 3 hepática e em células de Kupffer, em fígado de rato tratado com DL 25 mg/kg/dia (imunoperoxidase X 100).

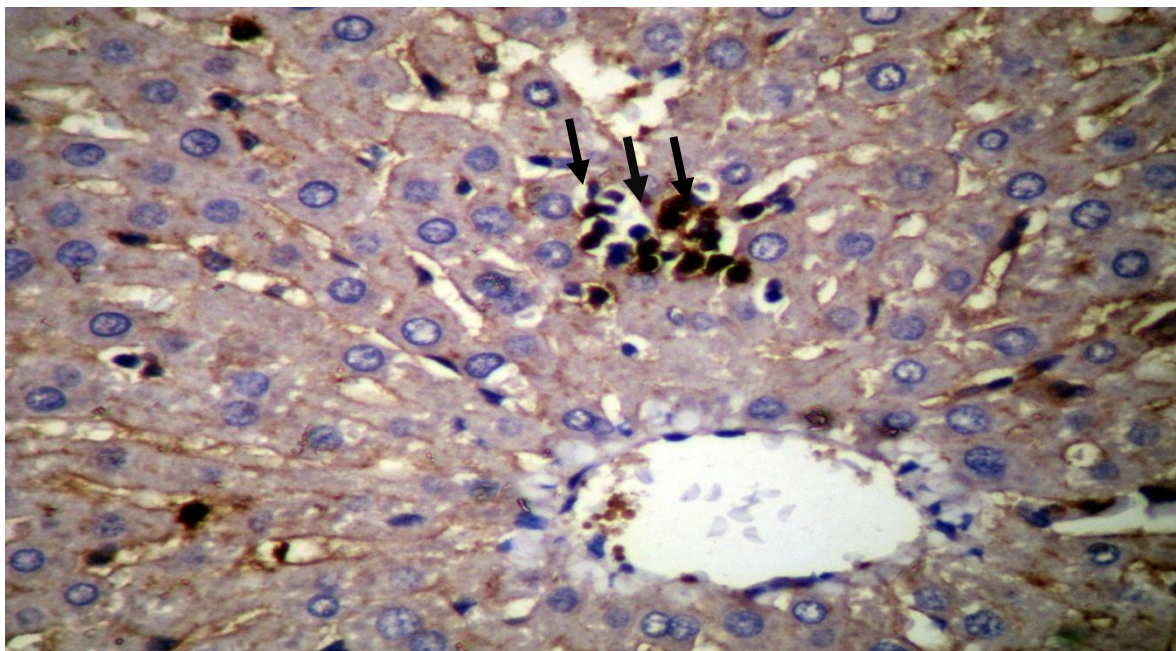


Figura 25. Imunoexpressão de CD3, em infiltrado inflamatório linfocítico, perivenular, grau 1, em fígado de rato tratado com DL 25 mg/kg/dia/45 dias (imunoperoxidase X 400).

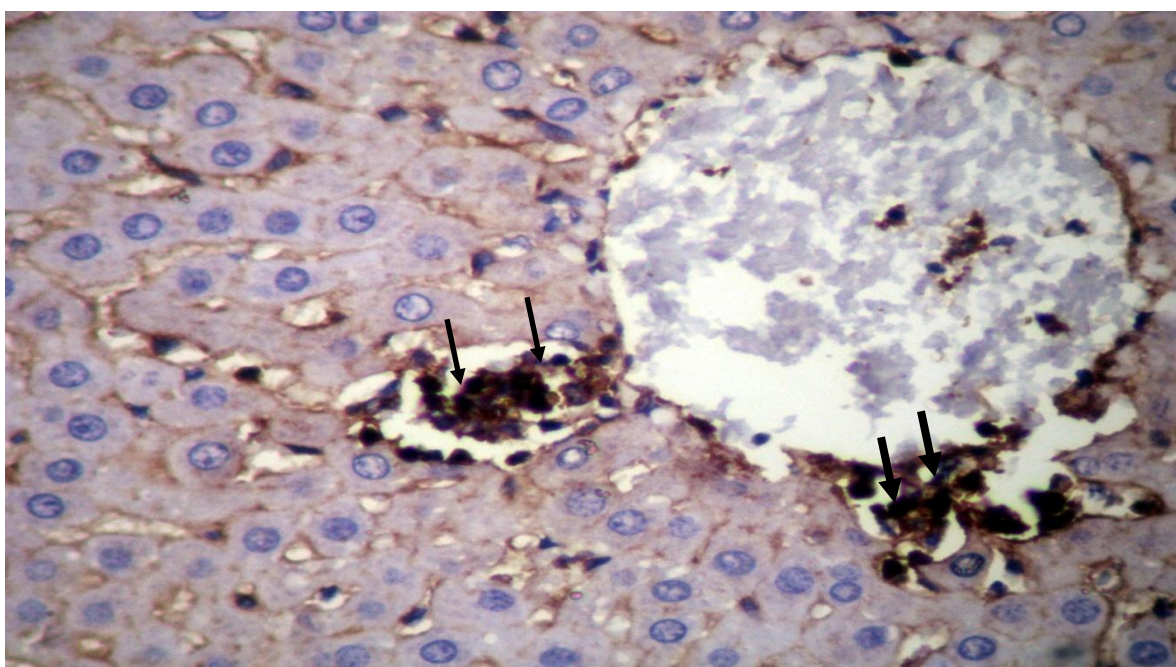


Figura 26. Imunoexpressão de CD8, em infiltrado inflamatório linfocítico, perivenular, de média intensidade, em fígado de rato tratado com DL 75 mg/kg/dia/45 dias (imunoperoxidase X 400).

O exame microscópico de rins, coração e pulmões não revelou alterações inflamatórias ou proliferações matriciais, sendo todos esses órgãos enquadrados dentro de parâmetros de normalidade histológica, conforme quadros a seguir.

Quadro 10 - Avaliação histológica dos rins de animais dos grupos controle (I e II) e tratados com DL (25 mg/kg/dia ou 75 mg/kg/dia - grupos IV, V, VI, VII) e etanol 20% (grupo III).

Parâmetros analisados	Morfologia
Arquitetura	Lobos bem definidos (pirâmide medular e tecido cortical recobrindo a sua base e lados) Lóbulos preservados e formados pelos raios medulares, tecido cortical adjacente e arteríolas interlobulares.
Néfrons	Glomérulo (corpúsculo de Mapighi) preservados numericamente, envolvidos por fina cápsula de Bowman. Tufo capilar sustentado por delicado mesângio. Polarização vascular e urinária mantida. Túbulos contorcidos proximais, parte espessa das alças de Henle e túbulos contorcidos distais sem particularidades histológicas. Escasso tecido fibroconjuntivo interveniente.
Região medular	Representada por túbulos contorcidos proximais e túbulos contorcidos distais em continuidade com as alças de Henle, sendo revestidos por epitélio cilíndrico simples. Partes delgadas e curvilíneas das alças de Henle revestidas por células achatadas Túbulos coletores direcionados para as papilas, delineados por células altas, com citoplasmas claros (anfófilicos) Tecido fibroconjuntivo interveniente delicado
Pélvis	Tecido fibroconjuntivo denso, estando formada por junção de estruturas caliciais
Rede vascular	Artérias e veias interlobares e interlobulares regularmente distribuídas

Quadro 11 - Avaliação histológica dos pulmões de animais dos grupos controle (I e II) e tratados com DL (25 mg/kg/dia ou 75 mg/kg/dia - grupos IV, V, VI, VII) e etanol a 20% (grupo III).

Parâmetros analisados	Morfologia
Arquitetura	Arquitetura parenquimatosa lobular normal. Trama alveolar delicada e estruturas bronquiais e bronquiolares, relativamente equidistantes
Vias áreas intrapulmores	Bronquíolos pervingos destituídos de cartilagem, irregularmente dicotomizados. Camada basal sem glândulas. Revestimento epitelial ciliado, simples ou pseudoestratificado, nas estruturas mais calibrosas. Núcleos basais e normocromáticos.
BALT (Tecido linfóide associado a brônquios)	Pequenos agregados linfóides não encapsulados peribronquiolares.
Agregados linforreticulares em septo interlobular	Focais
Trama alveolar – revestimento e parede	Paredes finas revestidas por pneumócitos. Matriz alveolar escassa com capilares congestos
Macrófagos intra-alveolares	Escassos
Rede vascular	Fina e regularmente distribuída

Quadro 12 - Avaliação histológica do coração de animais dos grupos controle (I e II) e tratados com DL (25 mg/kg/dia ou 75 mg/kg/dia - grupos IV, V, VI, VII) e etanol 20% (grupo III).

Estruturas histológicas	Análise
Epicárdio	Tecido fibroconjuntivo, laxo, com vasos e filetes neurais, às vezes, em meio a tecido adiposo. Apresenta revestimento por mesotélio, que está em contato com o miocárdio
Miocárdio	Fibras musculares, em arranjos plexiformes cujos cortes histológicos mostram orientação em várias direções. As fibrocélulas são anatomosantes e mostram estriações transversais e núcleos únicos ou duplos, centralmente posicionados.
Endocárdio	Endotélio, apoiado em delgada membrana basal, reveste as cavidades e válvulas cardíacas. No espaço virtual subendocárdico, vasos e finos filetes neurais, são, ocasionalmente, identificados, nos cortes histológicos.
Válvulas cardíacas	Porção central formada por tecido fibroconjuntivo denso e revestimento endotelial

5. DISCUSSÃO

5.1 O MODELO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO

Neste experimento, ratos foram utilizados como modelo animal, pela facilidade e baixo custo de sua aquisição, além de serem considerados animais com baixa mortalidade, alta resistência às infecções e fisiologia amplamente conhecida. (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Objetivando identificação de lesões hepatocelulares associadas com a administração oral de d-limoneno, o presente estudo utilizou 63 roedores, separados em grupos, que receberam a substância testada ou serviram de controle. Para a realização de um estudo comparativo, inclui-se, nessa série, um grupo de animais, ao qual pequenas doses (3,5 ml/kg) de etanol a 20% foram administradas diariamente.

A administração de agentes potencialmente hepatotóxicos pode ser experimentada em diversos modelos animais, inclusive com a utilização de manipulação genética. As lesões hepáticas resultantes são de vários tipos, na dependência dos agentes causais. O quadro 13 indica os principais tipos de injúria hepática e os correspondentes efeitos citopáticos. No quadro 14, exemplificam-se drogas associadas com lesões hepáticas, associadas a doses altas ou cumulativas.

Quadro 13 – Exemplos de drogas associadas a reações do tipo indiossincrásica e seus respectivos efeitos citopáticos.

Tipo de injúria	Efeitos na célula	Exemplo de drogas
Hepatocelular	Injúria celular direta pela formação de compostos enzima-droga e resposta T citotóxica	Izoniazida, diclofenaco, lovastatin, trazodona
Colestase	Injúria à membrana canalicular e transportadores	Clorpormazina, estrógeno, eritromicina
Imunoalérgica	Formação de compostos enzima-droga na superfície celular	Halotano, fentoína sulfametoxazol
Granulomatosa	Macrófagos, infiltração linfocítica em lóbulo hepático	Sulfas, quinidina, diltiazem
Esteatose microvesicular	Respiração mitocondrial alterada, beta-oxidação, com acidose láctica	Didanosine, tetraciclina, AAS
Esteato-hepatite	Multifatorial	Amiadorona, tamoxifen
Autoimune	Resposta linfocítica citotóxica contra componentes da membrana celular	Nitrofurantoína, metildopa, minociclina
Fibrose	Ativação de células estelares	Metotrexato, excesso de vitamina A

Quadro 14 – Exemplos de drogas associadas a reações dependentes de doses elevadas (DE) ou cumulativas (DC) e seus respectivos efeitos citopáticos

Droga	Tipo de dose-dependência	Efeito citopático
Acetaminofen	DE	Necrose hepatocitária, apoptose
Amiodarone	DC	Esteato-hepatite
Bromfenac	DC	Necrose hepatocitária
Cocaína, Fenciclidina	DA	Necrose isquêmica
Ciclofosfamida	DA	Necrose hepatocitária
Ciclosporina	DE	Colestase
Metotrexate	DE ou DC	Necrose hepatocitária, fibrogênese
Niacina	DE	Necrose isquêmica
Contraceptivos orais	DC	Adenomas hepáticos

Substâncias dietéticas ou medicamentosas podem induzir reações hepatotóxicas, que, em fases precoces, não repercutem nas avaliações laboratoriais. Os mecanismos fisiopatológicos desses processos são mais adequadamente investigados com a utilização de modelos animais, que também possibilitam a identificação das lesões teciduais incipientes e o estudo da evolução dos processos citotóxicos, após suspensão dos agentes causais.

5.2. A INJÚRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO D-LIMONENO

5.2.1. Anormalidades bioquímicas

Neste estudo, os níveis séricos de ALT, AST e FA registrados em todos os grupos experimentais não podem ser considerados indicadores de doença hepática. As alterações só seriam valorizadas se os valores referentes às aminotransferases estivessem em patamares pelo menos três vezes acima dos observados nos grupos controle. Na prática médica, aumentos leves nos níveis dessas enzimas não têm significado clínico (MADDREY, 2005).

Na evolução de uma injúria hepática droga-induzida, mecanismos adaptativos pouco conhecidos desenvolvem-se com o uso continuado da substância, havendo a possibilidade de recuperação da normalidade bioquímica, no sangue periférico. Por outro lado, a inibição do transporte de elétrons mitocondriais nos estágios precoces da agressão hepática não se reflete nos níveis de ALT (CANDELLI et al., 2008; SPAHR et al., 2001). Para ocorrer injúria hepática, deve ser ultrapassado um limiar de agressão.

Em testes bioquímicos, o espectro de injúria droga-induzida varia de alterações mínimas, não específicas, clinicamente sem consequências, até hepatite aguda, hepatite crônica, insuficiência hepática e mesmo cirrose (MADDREY, 2005). Injúria subclínica induzida por droga pode apresentar-se só como anormalidade de um ou mais testes bioquímicos, detectados durante uma avaliação periódica ao acaso. As elevações das aminotransferases frequentemente não estão associadas com sintomas e são transitórias e não progressivas. São mais raros os casos de injúria hepática droga-induzida que se desenvolvem com princípio abrupto de insuficiência hepática grave e mortal (MADDREY, 2005). As limitadas alterações dos níveis séricos de indicadores bioquímicos, como aminotransferases e FA não excluem a ocorrência de lesões hepáticas, se são identificadas exposições do organismo a agentes potencialmente hepatotóxicos. As observações do atual trabalho estão em harmonia com os dados da literatura, que não considera as alterações nos níveis de ALT, AST e FA como indicadores seguros de injúria hepática precoce.

5.2.2. Anormalidades histopatológicas

Não obstante a ausência de alterações bioquímicas mais significativas, neste trabalho, a avaliação histológica permitiu a observação de lesões discretas ou moderadas no tecido hepático, que podem estar relacionadas com as substâncias administradas aos roedores (d-limoneno e álcool). Foram identificadas, de forma predominante, a infiltração leucocitária e a presença de focos de degeneração hidrópica e/ou necrose hepatocitárias.

A degeneração hidrópica (tumefação turva) significa edema intracelular reversível, consequente a agressões de diversas naturezas (tóxicas, infecciosas e imunológicas). Há aumento de volume e palidez celular, que se associam à formação de microvacúolos ou de espaços claros citoplasmáticos. É resultado da ação de agentes lesivos, que interferem nos processos de troca de íons e água regulados pela membrana, provocando acúmulo de sódio e aumento do teor hídrico intracelulares. Essa lesão foi observada em todos os fígados dos animais que receberam d-limoneno, quer na menor ou na maior dose. Por outro lado, a lesão não foi identificada nos grupos controle e nos animais tratados com etanol a 20% (3,5 ml/kg/dia). Também não foi observada após a suspensão da droga (grupos satélites), em acordo com a reversibilidade desse tipo de lesão celular.

Esteatose ou acúmulo de gordura hepatocelular ocorreu de forma muito discreta e focal, em um número reduzido de animais, dos grupos expostos ao d-limoneno ou ao etanol. Essa é também uma lesão reversível, relacionada com distúrbios no metabolismo lipídico. As pequenas doses de álcool administradas aos animais do grupo III foram insuficientes para provocar esteatose mais significativa. As técnicas histológicas de rotina (HE) não revelaram a ocorrência de colestase ou fibrose.

Reações inflamatórias com a participação de células mononucleares, notadamente linfócitos, ocorreram em graus variáveis na maioria dos animais tratados com o d-limoneno, durante 30 ou 45 dias. As células inflamatórias distribuíram-se nas zonas III/II e/ou I, isto é, em compartimentos parenquimatosos perivenulares, médio-zonais e periportais, bem como em espaços portais, havendo também comprometimento simultâneo de ambos os setores porto-parenquimatosos (figura 27).

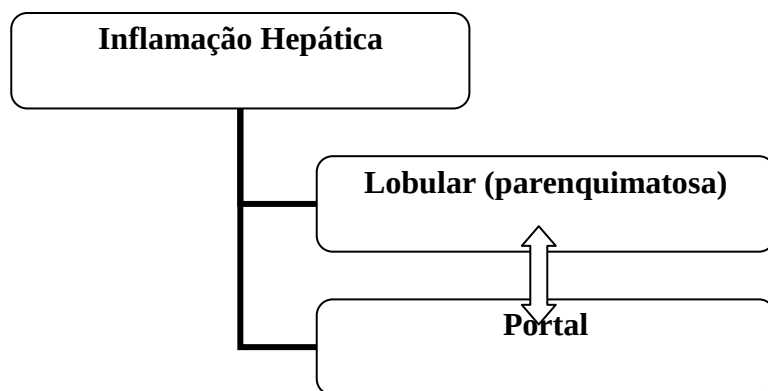


Figura 27. Localização do infiltrado inflamatório linfomonocitário observado no fígado de ratos tratados com DL: inflamação parenquimatosa, inflamação portal ou inflamação mista (parenquimatosa e portal).

A mobilização inflamatória foi significativa ($p < 0,05$) nos tecidos portais (dose de 25 mg/kg/dia) e parenquimatosos (doses de 25 mg/kg/dia e 75 mg/kgdi). No lóbulo, as zonas perivenulares (zona III) foram preferencialmente afetadas.

Os achados morfológicos podem estar relacionados com a administração oral de d-limoneno (25 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia), evocando um possível efeito hepatotóxico dessa substância, em ratos (figura 28).

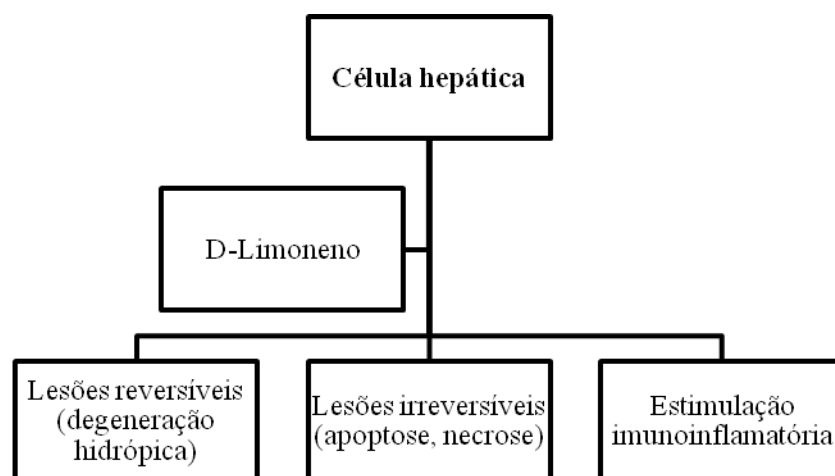


Figura 28 – Demonstração do provável potencial hepatocitotóxico do DL

Na literatura científica, há poucos relatos sobre os efeitos histopatológicos ocasionados pela administração de d-limoneno, em modelos experimentais. Um conjunto

de trabalhos aborda as consequências de tal consumo em nível bioquímico, enquanto voltam-se principalmente para demonstração das propriedades anti-tumorais, anti-oxidativas e antimicrobianas desse terpeno.

A injúria hepática induzida por drogas pode produzir um dano celular primário, sob a forma de necrose ou apoptose. É possível que a morte celular ocorra secundariamente a respostas imunológicas específicas, com a participação de linfócitos T citotóxicos. A injúria tem como alvos potenciais as células parenquimatosas (hepatócitos), biliares ou mesenquimais. As lesões hepáticas necroinflamatórias identificadas nos grupos experimentais do presente estudo, provavelmente, ocorreram em consequência de processo de hipersensibilidade, com reações imunológicas mediadas por células. Essa hipótese é amparada pelos estudos imuno-histoquímicos realizados, que demonstraram o predomínio de linfócitos T (positividade CD3) nos focos de infiltração mononuclear parenquimatosa. Nesse meio, também ocorreram linfócitos T, do tipo CD8 ou citotóxicos, fortalecendo a idéia de que a imunidade celular é um componente da injúria hepatocelular experimental, induzida pelo d-limoneno.

Os presentes achados estão em conflito com relatos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998) de fígados histologicamente normais em ratos, após administração oral de d-limoneno, também com a utilização de doses de 30 e 75 mg/kg/dia. O mesmo trabalho ainda relata tendência para aumento relativo de peso do rim e fígado, após análise de regressão linear. Esses resultados divergem do que ora são apresentados, porque, não obstante as anormalidades histopatológicas, não se constatarem diferenças significativas de peso hepático, pareando os grupos experimentais com os respectivos controles. Estudos toxicológicos (NTP, 1990) realizados em ratas expostas a 1,0 g/kg/dia de d-limoneno, relatam diminuição de 5 a 15% do peso corpóreo, após 28 semanas de estudo, enquanto, histologicamente, referem a presença de hepatócitos multinucleados e citomegalia, nos animais machos.

A patologia hepática relacionada ao consumo de álcool foi demonstrada experimentalmente, em roedores e em humanos (NANJI et al, 2004). A ingestão igual ou superior a 40 g (mulheres) ou 60 g (homens) está associada com aumento das taxas de morbidade e mortalidade, em consequência de uma variedade de doenças que complicam o abuso etílico (MARKS, 1983). Em roedores, a infusão intragástrica de etanol resulta em

esteatose, necrose, inflamação e fibrose hepáticas (TIPOE et AL., 2008). Os mecanismos fisiopatológicos das doenças alcoólicas são extremamente complexos e ainda não completamente compreendidos. A esteatose tem causas multifatoriais, incluindo as alterações dos sistemas oxirredutores, dos mecanismos de transporte de lipídios sintetizados, inibição da oxidação de ácidos graxos e o aumento da lipogênese (ZENG, 2009). As lesões em roedores são descritas a partir da administração de álcool a 6 g/kg/dia (YUANG et al., 2006)

Para comparação dos efeitos incipientes do etanol no tecido hepático, doses de apenas 3,5 ml/kg/dia foram utilizadas neste trabalho. Nessa condição, a esteatose apareceu de forma mínima, inconstante (raros animais), como microgotículas lipídicas, isoladas, em poucos hepatócitos. Por outro lado, atividade necroinflamatória foi demonstrada no parênquima hepático desses animais, à semelhança das alterações observadas nos grupos que receberam d-limoneno. As reações foram de moderado grau, em 40% dos ratos (grupo III), enquanto nos grupos controle (I e II) percentuais semelhantes (37,5% e 40%) estão associados a uma leve resposta inflamatória. Mesmo na ausência de significância estatística desses dados, constatou-se a possibilidade de identificação de lesões necroinflamatórias, em ratos, que ingeriram doses baixas de etanol, na ausência de esteatose.

A patogênese da injúria hepática droga-induzida permanece controvertida, na literatura especializada. Na prática clínica, em homens e animais, a elevação das transaminases séricas, bem como a depleção da GSH hepática são considerados marcadores bioquímicos precoces das lesões. A GSH atua na proteção celular contra metabólitos reativos do fígado (SKOULIS et al., 1989). Muitos estudos indicam pronunciados efeitos tóxicos por exposição a diversos agentes, como acetaminofen e outros. A biotransformação dessas substâncias ocorre de forma mais rápida e extensa no fígado, embora também possa causar dano hepatocelular direto. Alguns produtos xenobióticos podem provocar acumulação lipídica (esteatose), colestase ou necrose hepatocelular, com comprometimento das funções hepáticas. As lesões clínicas e histopatológicas têm sido utilizadas para explicar os efeitos hepatotóxicos diretos (JAMES et al., 1982).

Estudos realizados com consumidores de heroína (TRIGUEIRO DE ARAÚJO, 1992) demonstraram aumento da densidade volumétrica sinusoidal, com inflamação luminal e da veia hepática terminal. Essas alterações evoluíram com fibrose perissinusoidal

e perivenular, determinando espessamento da barreira sinusoidal e da parede da veia hepática terminal, que persistiram mesmo após a retirada da droga. Essa sequência de eventos inflamatórios foi atribuída a efeitos tóxicos intrínsecos da droga e à estimulação imunológica mediada por células. Dano hepático assim induzido tem sido descrito em consequência do uso de diversas outras substâncias como propanolol, carbamazepina, retinóide aromático e azatioprina (DAVION et al., 1984; KUNZE et al., 1985; THUNE, MORK, 1980).

A inflamação hepática lobular observada no atual modelo experimental com a administração de d-limoneno a roedores pode ser considerada como resultado de hepatotoxicidade do tipo intrínseco, que é dose-dependente, e previsível, quando a droga é administrada em doses superiores a determinados patamares. O complexo mecanismo patogênico de lesões dessa natureza não pode ser completamente inferido somente a partir da injúria histopatológica.

Neste experimento, o edema celular (degeneração hidrópica) observado em todos os casos tratados com d-limoneno evoca uma possível agressão celular direta, na fase inicial do processo. É razoável supor que a metabolização do terpeno gerou uma substância potencialmente nociva à função mitocondrial, com estimulação de reações imunes específicas. Metabólitos hepatotóxicos podem ser gerados de duas formas:

1. metabolismo oxidativo de drogas (fase 1) com a participação do sistema enzimático CYP450
2. metabolismo conjugativo de drogas (fase 2)

Mecanismos da fase I provavelmente estão implicados na agressão tóxica induzida pelo d-limoneno, uma vez que, em ratos e humanos, esse terpeno é metabolizado em compostos oxigenados como ácido di-hidroperílico, ácido perílico e limoneno-8-9-diol (CROWEL et al., 1992, 1994; POON et al., 1996; VIGUSHIN et al., 1998). Adicionalmente, há relatos de elevação do CYP450 em modelos animais, após a administração da substância por via oral ou intraperitonal (AUSTIN et al., 1988; ARIOSHI et al., 1975).

Os mecanismos pelos quais os metabólitos reativos causam dano hepatocelular são vários:

- depleção de GSH,
- ligação covalente a enzimas, lipídios, ácidos nucleicos e outras estruturas celulares,

- dano hepatocítico tóxico secundário pela acumulação intracelular de substratos.

Metabólitos reativos que prejudicam a respiração mitocondrial, a produção de ATP e geram ERO, inibindo a beta-oxidação causam esteatose. Esse tipo de lesão não ocorreu de forma relevante, no atual experimento.

A segunda fase do insulto droga-induzido leva a PMT, de forma direta (estresse celular severo) ou via imunorreações específicas (via extrínseca).

A mobilização de células T é um aspecto da lesão hepática inflamatória induzida pelo d-limoneno, demonstrado no presente trabalho. Respostas imunológicas específicas envolvendo linfócitos citotóxicos, com concomitante liberação de citocinas podem ocorrer em consequência da ligação covalente de metabólitos reativos a proteínas, com formação de neo-antígenos ou haptenos (NJOKU et al., 2002; ROBIN et al., 1997). Eventualmente, a injúria atinge células hepáticas não parenquimatosas, como células epiteliais biliares (LAKEAL et al., 2001) ou células estelares (JASKIEWICZ et al., 1996)

Na terceira fase ocorrem apoptose e necrose, como resultado da função mitocondrial prejudicada. A PMT permite influxo de prótons pela membrana mitocondrial interna, que bloqueia a síntese de ATP mitocondrial.

No modelo experimental apresentado, as lesões inflamatórias do parênquima hepático tornam-se menos significativas nos grupos satélites, com animais examinados um mês após a suspensão da administração de d-limoneno. Esses resultados fortalecem a hipótese de que em ratos o d-limoneno tem potencial hepatotóxico intrínseco.

Fibrose ocorreu de forma incipiente, sem haver expansão conjuntival de espaços portais (grau F0, de acordo com os parâmetros indicados no quadro 6). A utilização de métodos especiais de coloração (picrossírius) permitiu a detecção de finos septos colagênicos perissinusoidais, associados ao processo inflamatório lobular. Tais alterações parecem ser semelhantes às observadas em inflamações hepáticas parenquimatosas de diversas causas, incluindo a intoxicação alcoólica (GOODMANN, ISHAK, 1982). Fibrose incipiente também foi descrita em consequência ao uso de heroína (TRIGUEIRO DE ARAÚJO, 1992) e de outras drogas hepatotóxicas como vitamina A, metrotrexate, azatioprina, mercaptopurina (ZAFRANI et al., 1983; ZAFRANI et al., 1988). São explicadas como decorrentes das interações entre hepatócitos, matriz extracelular e células de Kupffer, Ito e endoteliais. O processo fibrogênico inicia-se com a transformação das

células de Ito em miofibroblastos, conforme demonstrado em numerosos estudos sobre doenças que evoluem para fibrose (DARBY et al., 1990; OGAWA et al., 1986; SAPPINO et al., 1990), incluindo os estágios pré-fibróticos da hepatopatia alcoólica (NAKANO et al., 1982; NAKANO, LIEBER, 1982).

A capacidade extraordinária do fígado para regenerar pode assegurar a resolução completa das lesões, mesmo havendo morte celular extensa (MICHALOPOULOS, 2007). Modelos de hepatotoxicidade induzida por diversos compostos químicos demonstraram o papel dinâmico da regeneração mitótica hepatocítica em resposta à injúria tóxica (MEHENDALE, 2005; WANG et al., 2007). O complexo processo que promove a reparação do tecido hepático geralmente parece mostrar um relacionamento dose-resposta. Assim, a estimulação do reparo aumenta proporcionalmente ao grau de exposição às hepatotoxinas. Entretanto, acima de certos limites de toxicidade o processo regenerativo será inibido.

Um modelo é uma simplificação limitada da realidade, considerando-se as complexidades e interações entre os possíveis agentes tóxicos e os mecanismos protetores, incluindo metabolismo, reações imunológicas e regeneração. Apesar do interesse geral para extrapolação de dados de modelos animais ou *in vitro* para humanos, a demonstração de mecanismos hepatotóxicos em tais modelos não implica necessariamente que sejam aplicáveis em casos humanos de injúria hepática droga-induzida, particularmente, porque as concentrações das drogas tóxicas experimentalmente utilizadas podem não ser semelhantes nos casos humanos. A avaliação histológica só permite reconhecer qual o tipo e a intensidade da injúria, não sendo possível indicação da droga associada às lesões identificadas.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho está fundamentado em análises de dados bioquímicos e de lesões histológicas em fígado de roedores, que receberam d-limoneno (25 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia) ou etanol a 20% (3,5 ml/kg/dia), pelo período de 30 ou 45 dias.

Nesse modelo experimental:

1. Os níveis de ALT, AST e FA não indicam injúria hepática. A normalidade bioquímica não exclui o risco de injúria hepática, se é conhecida a exposição do organismo a agentes potencialmente hepatotóxicos.
2. Observaram-se lesões hepáticas inflamatórias, parenquimatosas e/ou portais, crônicas, de pequena ou média intensidade, provavelmente limoneno-induzidas;
3. Em alguns animais tratados com etanol a 20%, na ausência de esteatose, demonstraram-se reações inflamatórias hepatocelulares semelhantes às induzidas pelo limoneno. A frequência dessas lesões não alcançou significância estatística;
4. As células inflamatórias predominantes são linfócitos T, CD3 positivos, entre os quais estão presentes células citotóxicas, CD8 positivas;
5. A observação de reação inflamatória, em alguns animais tratados com etanol, pode indicar que doses pequenas de álcool têm potencial inflamatório, independente do aparecimento de esteatose;
6. Trinta dias após a suspensão da administração oral de d-limoneno, as lesões inflamatórias, em lóbulos hepáticos diminuíram ou desapareceram;
7. As lesões observadas histologicamente em variados graus foram:
 - Degeneração hidrópica hepatocitária (em todos os ratos tratados);
 - Necrose parenquimatosa, focal (nas zonas III e II);
 - Inflamação linfomonocitária, em focos (lobulares, sinusoidais ou portais);
 - Hiperplasia de células de Kupffer;
 - Esteatose microvesicular discreta (gotículas isoladas);
 - Fibrose perissinusoidal incipiente.
8. A injúria hepatocelular provavelmente está relacionada com os efeitos tóxicos diretos dos metabólitos reativos do d-limoneno;

9. O afluxo inflamatório mononuclear, predominantemente linfocítico, pode ser interpretado como manifestação de uma resposta imunológica induzida pelos metabólitos do d-limoneno;
10. A hiperplasia de células de Kupffer provavelmente contribuiu para a estimulação da resposta imunológica linfocitária;
11. Fibras colagênicas finas, perissinusoidais, foram observadas apenas com técnicas específicas de coloração (vermelho picrossírius), indicando fibrose precoce, em focos isolados, associados às lesões inflamatórias mais significativas;
12. Os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos confrontados com as informações da literatura indicaram que os mecanismos da agressão hepatocelular induzidas pelo d-limoneno estão relacionadas com o metabolismo oxidativo e a respostas imunológicas com participação de células T;
13. A frequente exposição humana ao limoneno deve estimular novas investigações sobre o potencial dessa substância para induzir hepatotoxicidade do tipo intrínseca.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA R.N.; OLIVEIRA T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: **Psicofarmacologia - Fundamentos Práticos**. 1. ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Legislação – Resoluções**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242>>. Acesso em: <23 de novembro de 2007>.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. **Princípio Ético e Prático do Uso de Animais de Experimentação**. São Paulo: Unifesp, 2004.

ANDRADE, R.J.; LUCENA, M.I.; KAPLOWITZ, N.; GARCIA-MUNOZ, B.; BORRAZ, Y.; PACHKORIA, K.; GARCIA-CORTES, M.; FERNANDEZ, M.C.; PELAEZ, G.; RODRIGO, L.; DURAN, J.A.; COSTA, J.; PLANAS, R.; BARRIOCANAL, A.; GUARNER, C.; ROMERO-GOMEZ, M.; MUNOZ-YAGUE, T.; SALMERON, J.; HIDALGO, R. Outcome of acute idiosyncratic druginduced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. **Hepatology**, vol. 44(6), 1581-1588, 2006.

ARAUJO, J.M.A. & FARIAS A.P.S.F. Redução do teor de limoneno e bergapteno do óleo essencial de bergamota adsorvido em sílica gel pelo CO₂ - supercrítico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23 (2), p.112-115, 2003.

ARIYOSHI T.; ARAKAKI M.; IDEGUCHI K.; ISHIZUKA Y.; NODA K.; IDE H.; Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene). III. Effects of d-limonene on the lipids and drug metabolizing enzymes in rat livers. **Xenobiotica**, v. 5, p. 33-38, 1975.

AUSTIN C.A.; SHEPARD E.A.; PIKE S.F.; RABIN B.R.; PHILLIPS I.R.; The effect of terpenoid compounds on cytochrome P-450 levels in rat liver. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 2223-2229, 1988.

BERSON, A.; DEBECO, V.; LÉTTÉRON, P. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 114, p. 764-774, 1998.

BOELSTERLI, U.A. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. **Drug Safety**, v. 25 (9), p. 633-648, 2002.

BOONEN, G.; HABERLEIN, H. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA binding site. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 504-506, 1998.

BORS W.; HELLER W.; MICHEL C.; SARAN. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.** v.186, p. 343-355, 1990.

BORS W.; MICHEL C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 1413-26, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

CACHAO P.; MENEZES BRANDAO F.; CARMO M.; FRAZAO S.; SILVA M. Allergy to oil of turpentine in Portugal. **Contact Dermatitis**, v. 14, p. 205-208, 1986.

CALNAN C.D. Allergy to dipentene in paint thinner. **Contact Dermatitis**, v. 5, p. 123-124, 1979.

CARLINI, E. A.; CONSTAR, J. F. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. I.; BUENO, O. V. A. Pharmacology of lemon-grass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of tears prepared for leaves on laboratory-animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17. p. 37-64, 1986.

CHALCHAT, J.C.; OZCAN, M.M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. **Food Chemistry**, v.110, p. 501-503, 2008.

CLEGG R.J; MIDDLETON B.; DUNCAN BELL G.; WHITE D.A. Inhibition of hepatic cholesterol synthesis and S-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by mono and bicyclic monoterpenes administered *in vivo*. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, p. 2125-2127, 1980.

CROWELL, P.L.; ELEGBEDE, J.A.; ELSON, C.E.; LIN, S.; BAILEY, H.H.; VEDEJS, E.; GOULD, M.N. Human metabolism of the antitumor agent *d*-limonene. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.35, p. 31-37, 1994.

CROWELL, P.L.; LIN, S.; VEDEJS, E.; GOULD, M.N. Identification of metabolites of the antitumor agent *d*-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 31, 205-212, 1992.

COOKE, B. Aromatherapy: a systematic review. **British J. Gen. Practice**, v.50, p. 493-496, 2000.

DAVION T.; CAPRON J.P.; ANDREJAK, M.; GEOFFROY, P.; CAPRON-CHIVRAC, D.; QUENUM, C. Acute hepatitis due to carbamazepine (tegretol). Study of case and review of the literature. **Gastroen Clin Biol.**, v.8, p. 52-56, 1984.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Inv.**, v. 63. p. 21-29, 1990.

DE CASTILHO, R.B.; NUNEZ, C.V.; COUTINHO, L.H.; LAGO, A.F.; BERNINI, R.B.; DE SOUZA, G.G.B. Ionic fragmentation of a natural product, limonene (C₁₀H₁₆), following core [C₁s] photoionization. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v.155, p. 77-80, 2007.

DEF 2003/04 – DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. Melo, J. M. S. (Ed). Produção JBM – **Jornal Brasileiro de Medicina**, 32 ed. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 2003.

DEFENG, W & CEDERBAUM, A.I. **Alcohol, oxidative stress, and free radical damage**. Alcohol Reserch & Health. Disponível em: <<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/277-284.htm>>. Acesso em: <10 de fevereiro de 2010>

DE MAYO, P. The Chemistry of Natural Products. **Mono and Sesquiterpenoids, Interscience Publishers Inc.**, New York, vol. II, p.58, 1959.

DER MARDEROSIAN, A.H.; LIBERTI, L.E. Natural Product Medicine. In: G.F. Stickey Co. (Philadelphia). **Appendix A: Natural Products Information - Where to Look**, 1988.

DELEVE, L.D.; SHULMAN, H.M.; MCDONALD, G.B. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). **Semin. Liver Dis.**, 22(1), p.27-42, 2002.

DIEHL AM et al. Alcoholic-like disease in nonalcoholics. A clinical and histological comparison with alcohol-induced liver injury, **Gastroenterol.**, p. 1056-62, 1988.

DOURAKIS, S. P.; PAPANIKOLAOU, I. S.; TZEMANAKIS, E. N.; HADZIYANNIS, S. J. Acute hepatitis associated with herb (*Teucrium capitatum* L.) administration. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 14 (6), p. 693-695, 2002.

DU X.L.; EDELSTEIN D.; ROSSETTI L.; FANTUS I.G.; GOLDBERG H.; ZIYADEH F. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97 (22), p.12222-6, 2000.

DUFOUR, J.F.; ST-PIERRE, M.V. Phytotherapeutika in Gastroenterologie und Hepatologie. [Phytotherapeutic drugs in gastroenterology and hepatology]. **Ther Umsch**, v.59, (6), p. 313-316, 2002.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

ELEGBEDE, J.A; ELSON C.E.; QURESHI, A.; TANNER M.A; GOULD, M.N. Inhibition of DMBA – induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. **Carcinogenesis**, v.5, p. 661-664, 1984.

ELEGBEDE, J.A.; ELSON, C.E.; TANNER, M.A.; QURESHI. A.; GOULD, M.N. Regression of rat mammary tumors following dietary d-limonene. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.76, p. 323-325, 1986.

ELSON, C.E.; MALTZMAN, T.H.; BOSTON , J.L.; TANNER, M.A.; GOULD, M.N. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 331-332, 1988.

ESCHER, M.; DESMEULES, J.; GIOSTRA, E.; MENTHA, G. Hepatitis associated with Kava, a herbal remedy for anxiety. **BMJ**, p. 322-329, 2001.

FAHRIG R. Genetic mode of action of cocarcinogens and tumor promoters in yeast and mice. **Molecular & general genetics**, v.194, p. 7-14, 1984.

FELDMANN, G.; HAOUZI, D.; MOREAU, A.; DURAND-SCHNEIDER, A.M.; BRINGUIER, A.; BERSON, A.; MANSOURI, A.; FAU, D.; PESSAYRE, D. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. **Hepatology**, v. 31(3), p. 674-683, 2000.

FLEISHER, J.H.; LUNG, C.C.; MEINKE, G.C.; PINNAS, J.L. Acetaldehyde-albumin adduct formation: Possible relevance to an immunologic mechanism in alcoholism. **Alcohol and Alcoholism**, v. 23 (2), p. 133-141, 1988.

FRENCH, S.W. The mechanism of organ injury in alcoholics: Implications for therapy. In: Kalant, H.; Khanna, J.M.; and Israel, Y., eds. **Advances in Biomedical Alcohol Research**. Oxford: Pergamon Press, p. 57-63, 1991.

FRIEDMAN, M.J.; PRETI, G.; DEEMS, R.O.; Friedman, Lawrence et al. Limonene in expired lun air of patients with liver disease. **Digestive diseases and sciences**. v.39 (8), p. 1672-1676, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Kava-containing dietary supplements may be associated with severe liver injury. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. **Food and Drug Administration, Dietary Supplements**, 2002.

GALAMBOS, J.T. Natural history of alcoholic hepatitis. III. Histological changes. **Gastroenterology**, v. 63 (6), p. 1026-1035, 1972.

GELLING, R.; LOADMAN, M.J.; SIDEK, B.D. Journal of Polymer Science: **Polymer Chemistry**, v.17, p.1383, 1979.

GOODMANN, Z.D.; ISHAK, K.G. Occlusive venous lesion in alcoholic liver disease. A study of 200 cases. **Gastroenterology**, v.83, p786-796, 1982.

GOULD, M.N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. **Environ Health Perspect**, 105 (Suppl 4): 977–979. PMCID: PMC1470060. June, 1997.

HAAG, J. D.; LINDSTROM, M.J.; GOULD, M.N. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. **Cancer Res**, v. 52, p. 4021-4026, 1992.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1989.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v.186, p. 1-85,1990.

HALLIWELL B., Cross C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, 102 Suppl 10:5-12, 1994

HAM, A W. **Tratado de Histologia**. 7 ed. Interamericana: México, 1975, p. 637-669.

HAOUZI, D.; LEKEHAL, M.; MOREAU, A.; MOULIS, C.; FELDMANN, G.; ROBIN, M.A.; LETTERON, P.; FAU, D.; PESSAYRE, D. Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 32(2), p.303-311, 2000.

HAVSTEEN, B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol**, v.32, p1141-1148, 1983.

HEBBEL, R.P.. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab Clin Med**, v.107, p. 401-4, 1986.

HENSON, S.; OLIFF, H.S.; MILOT, B.; NEUSTADT, J.; WEBB, D. Lavender -Its Historical and Contemporary Uses. **American Botanical Council**, 2005.

IGIMI H.; NISHIMURA M.; KODAMA R.; IDE H. Studies on the metabolism of *d*-limonene (p-mentha-1,8-diene). I. The absorption, distribution and excretion of *d*-limonene in rats. **Xenobiotica**, v. 4, p. 77-84, 1974.

JACOBSON-KRAM, D; KELLER, K.A.; DEKKER, M. **Toxicology Testing Handbook**. New York , 2001.

JAMES, R.C.; GOODMAN, D.R; HARBINSON, R.D. Hepatic glutathione and hepatotoxicity: changes induced by select narcotics. **J Pharmacol Exp. Ther.**, v. 221, p. 708-714, 1982.

JASKIEWICZ, K.; VOIGT, H.; BLAKOLMER, K. Increased matrix proteins, collagen and transforming growth factor are early markers of hepatotoxicity in patients on long-term methotrexate therapy. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.34(3), p. 301-305, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1990, p. 240-254.

JUNGERMANN, K.; KATZ, N. Functional Specialization of Different Hepatocyte Populations. **Physiological Reviews**, v. 69 (3), p. 708-764, 1989.

KAMATOU, G.P.P.; VAN ZYL, R.L.; VAN VUUREN, S.F. ; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; VILJOEN, A.M. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. **South African Journal of Botany**, v.74, 230–237, 2008.

KARLBERG A-T.; BOMAN A.; MELIN B. Animal experiments on the allergenicity of *d*-limonene - the citrus solvent. **Annals of Occupational Hygiene**, v.35, p 419-426, 1991.

KARLBERG A-T.; MAGNUSSON K.; NILSSON U. Air oxidation of *d*-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens. **Contact Dermatitis**, v.26, p. 332-340, 1992.

KANERVA R.L.; RIDDER G.M.; LEFEVER F.R.; ALDEN C.L. Comparison of short-term renal effects due to oral administration of decalin or *d*-limonene in young adult male Fischer-344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.25, p. 345-353, 1987b.

KAWASE, T.; KATO, S.; LIEBER, C.S. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. **Hepatology**, v.10(5), p. 815-821, 1989.

KHADRI, A.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F; NEFFATI, M.; SMITI, S., ARAÚJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and ¹³C NMR. **Food Chemistry**, v.109, p. 630–637, 2008.

KRAFT, M.; SPAHN, T.W.; MENZEL, J.; SENNINGER, N.; DIETL, K.H.; HERBST, H.; DOMSCHKE, W.; LERCH, M.M. Fulminant liver failure after administration of the herbal antidepressant Kava-Kava. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 126 (36), p. 970-972, 2002.

KRAHENBUHL, S.; BRAUCHLI, Y.; TRENDELENBURG, M.; DREWE, J.; KUMMER, O.; BODMER, M.; HASCHKE, M. Actual liver failure in two patients with regular alcohol consumption ingesting paracetamol at therapeutic dosage. **Digestion**, v.75 (4), p.232-237, 2007.

KIM, D.; PARK, M. J.; KOH, S-C.; SO, J-S.; KIM, E. Three separate Pathways for the initial oxidation of Limonene, Niphenyl, and phenol by rhodococcus sp. Strain T104. **The Journal of Microbiology**, v.40, p 86-89, 2002.

KIRAN, S. R.; DEVI, P. S.; REDDY, K. J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 1909–1914, 2008.

KLINT, T. Effect of 8-OH DPAT and buspirone in a passive avoidance test and in the elevated plus maze test in rats. **Behavioral Pharmacology**, 2, p. 481–9, 1991.

KLECAK G.; GELEICK H.; NODA K.; IDE H. Screening of fragrance materials for allergenicity in the guinea pig. I. Comparison of four testing methods. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.28, p.53-54, 1977.

KODAMA R.; YANO T.; FURUKAWA K.; NODA K.; IDE H. Studies on the metabolism of *d*-limonene (*p*-mentha-1,8-diene). IV. Isolation and characterization of new metabolites and species differences in metabolism. **Xenobiotica**, v.6, p. 377-389, 1976.

KUNZE, K.D.; PORST, H.; LOHMANN, J.; TSCHOPEL, L. Dihydralazine and propranolol induced liver lesions. **Zentralbl All Pathol**, v.130, p19-29, 1985.

LACY MJ, KENT CR, VOSS EW. *D*-Limonene: An effective vasodilator for use in collecting rabbit blood. **Laboratory animal science**, v. 37(4), p. 485-487, 1987.

LAMANNA, M.S.; GOLDSTEIN, A.H. "In situ measurements of C-2-C-10 volatile organic compounds above a Sierra Nevada ponderosa pine plantation." **Journal of Geophysical Research-Atmospheres**, v. 104 (D17), p. 21247-21262, 1999.

LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 207-213, 1999.

LEE, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **New England Journal of Medicine**, v.349, p.474-485, 2003.

LEE, W. M. Acute liver failure in the United States. **Semin. Liver Dis.**, vol. 23(3), p. 217-226, 2003.

LEKEHAL, M.; PESSAYRE, D.; LEREAU, J.M.; MOULIS, C.; FOURASTE, I.; FAU, D. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A Depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 24 (1), p. 212-2188, 1996.

LIEBER, C.S.; CASINI, A.; DECARLI, L.M.; KIM, C.; LOWE, N.; SASAKI, R.; LEO, M.A. S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. **Hepatology**, v. 11(2), p.165-172, 1990.

LIN, C-T; CHEN, C-J.; LIN, T-Y; TUNG, J.C.; WANG, S-Y. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. **Bioresource Technology**, v.99, p. 8783–8787, 2008.

LITCHFIELD, J. T.; WILCONXON, F. Simplified method of evaluating dose-effects experiments. **J Pharmacol Exp Ther.**, p. 96-99, 1949.

LUMENG, L. Genetic aspects and risk factors in alcoholism and alcoholic liver disease. In: American Association for the Study of Liver Diseases. **Postgraduate Course: Newer Aspects on Alcohol, Nutrition and Hepatic Encephalopathy**. Thorofare, NJ: The Association., p. 6-34, 1992.

MADDREY, W.C. Drug-induced hepatotoxicity 2005. In: J CLIN GASTROENTEROL. **Pancreas and liver**. v.39, 2005.

MALHI, H.; GORES, G.J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. **Gastroenterology**, v. 134(6), p.1641-1654, 2008.

MALTZMAN, T.H., HURT, L.M., ELSON, C.E., TANNER, M.A.; GOULD, M.N. The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 781-783, 1989.

MALTZMAN T.H. Anticarcinogenic mechanism of action of dietary limonene during the initiation stage of DMBA-induced mammary carcinogenesis. **Dissertation abstracts international**, v. 51, p. 4283B, 1991.

MALTZMAN T.H., CRISTOU M., GOULD M.N., JEFEOATE C.R. Effects on monoterpenoids on *in vivo* DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 2081-2087, 1991.

MANN, J.C.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBORNE, J.B. **Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance**. Harlow, Essex, England: Longman Scientific & Technical, 308-309, 1994.

MARÓSTICA, M.R. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, vol. 30 (02), 2007.

MATHEWS, J.M.; ETHERIDGE, A. S.; BLACK, S. R. Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. **Drug Metab Dispos**, v.30 (11), p. 1153-1157, 2002.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.A.; BARROS S.B.M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animal end antioxidante activity *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60. p. 111-116, 1998.

MCCULLOUGH, A. J.; BARRY O`CONNOR, J. F.. Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American college of gastroenterology. **The American Journal of Gastroenterology**, v.93, n.11, p.1-15, 1998.

MEHENDALE, H.M. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. **Toxicol. Pathol.**, v.33(1), p. 41-51. 2005.

MELLO FILHO A.C.; HOFFMAN M.E.; MENEHINI R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**, v.218, p. 273-5, 1983

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 3 ed. Ed Michalany Ltda: São Paulo, 1998. 295 p.

MILLER, L.G. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Arch Intern Med**, v.158 (20), p. 2200-2211, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 90/2004**. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2004.

MOSLEN, M T. Toxic Responses of the Liver. In: KLAASSEN, C.D.; MCGRAW-HILL. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 5 ed. New York: 1996. p. 403-415.

NAKANO, M.; LIEBER, C.S. Utrastructure of initial stages of perivenular fibrosis in alcohol-fed baboons. **Amer J Pathol**, 106, p145-155, 1982.

NAKANO, M.; WORNER, T.M.; LIEBER, C.S.. Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: utrastruture and histologic progression. **Gastroenterology**, v.83, p.777-785, 1982.

NIAAA – NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. **Alcool Alert**, n. 19, 1993. Disponível em: < <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa19.htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2010

NJOKU, D.B.; GREENBERG, R.S.; BOURDI, M.; BORKOWF, C.B.; DAKE, E.M.; MARTIN, J.L.; POHL, L.R. Autoantibodies associated with volatile anesthetic hepatitis found in the sera of a large cohort of pediatric anesthesiologists. **Anesth. Analg.**, v. 94(2), p. 243-249, 2002.

OGAWA, K.; SUZUKI J-I; MUKAI, H.; MORI, M. Sequential changes of extracellular matrix and proliferation of Ito cells with enhanced expression of desmin and actin in focal hepatic injury. **Amer J Pathol**, v.125, p.611-619, 1986.

OKABE H.; OBATA Y.; TAKAYAMA K.; NAGAI T. Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. **Drug Design and Delivery**, v. 6, p. 229-238, 1990.

OSTAPOWICZ, G.; FONTANA, R.J.; SCHIODT, F.V.; LARSON, A.; DAVERN, T.J.; HAN, S.H.; MCCASHLAND, T.M.; SHAKIL, A.O.; HAY, J.E.; HYNAN, L.; RIPPIN, J.S.; BLEI, A.T.; SAMUEL, G.; REISCH, J.; LEE, W.M. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. **Ann. Intern. Med.**, v.137 (12), 2002, p. 947-954.

PARRISH, K.M.; HIGUCHI, S.; DUFOUR, M.C. Alcohol consumption and the risk of developing liver cirrhosis: Implications for future research. **Journal of Substance Abuse**, v. 3(3), p. 325-335, 1991.

PAULI-MAGNUS, C.; STIEGER, B.; MEIER, Y.; KULLAK-UBLICK, G.A.; MEIER, P.J. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. **Journal of Hepatology**, v.43(2), p. 342-357, 2005.

PEQUIGNOT, G.; TUYNS, A.J.; BERTA, J.L. Ascitic cirrhosis in relation to alcohol consumption. **International Journal of Epidemiology**, v. 7(2), p. 113-120, 1978.

PETERS R.J.B., DUIVENBODE J.A.D., DUYZER J.H., VERHAGEN H.L.M. The determination of terpenes in forest air. **Atmospheric Environment**, v. 28(15), p. 2413-2419, 1994.

PLAA, G.L.; CHARBONNEAU, M. (1994) Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury. In: **Principles and Methods of Toxicology**. 3 ed. New York: Raven Press, p. 839-870.

POON G.K.; VIGUSHIN D.; GRIGGS L.J. Identification and characterization of limonene metabolites in patients with advanced cancer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Drug Metab. Dispos.**, v. 24, p.565-571, 1996.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v.78, p.1720-1725, 2006.

RAMOS, M.G.S. **Estudo da Hepatotoxicidade de um Medicamento em Hhepatócitos Isolados de Rato**. Dissertação apresentada ao programa de mestrado em controle de qualidade na área de medicamentos e plantas medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1999.

REEVES, H.L. Hepatic stellate cell activation occurs in the absence of hepatitis in alcoholic liver disease and correlates with the severity of steatosis. **Journal of Hepatology**, v.19, p. 263-64, 1996.

REIS, J.S.; MATTOS, C.A.V.; TEIXEIRA, R.; PURISH, S.; MACHADO, J.A.N. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab** . v.52(7), 2008.

RICE-EVANS C.; BAYSAL E.; FLYNN D.; KONTOGHIOGHES G. Iron-mediated free radical effects on erythrocytes: the role of desferrioxamine. **Biochem Soc Trans**, v.14, p. 368-9, 1986.

ROBIN, M.A.; LE ROY, M.; DESCATOIRE, V.; PESSAYRE, D. Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. **Journal of. Hepatology**., 26 Suppl 1, p. 23-30, 1997.

ROSS D.; MOLDEUS P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane Lipid Oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p. 151-70, 1991.

ROTHSCHILD M.A.; ORATZ, M.; SCHREIBER, S.S. Alcohol-induced liver disease: Does nutrition play a role? **Alcohol Health & Research World**, v. 13(3), p. 229-231, 1989.

RUSSMANN, S.; KULLAK-UBLICK, G. A.; GRATTAGLIANO, I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p. 3041-3053, 2009.

RUSSMANN, S.; LAUTERBURG, B.H.; HELBLING, A. Kava hepatotoxicity. **Ann. Intern. Med.**, v. 135(1), p. 68-69, 2001.

SAPPINO, A.P.; SCHÜRCH, W; GABBIANI, G. Biology of disease – Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as maker of phenotypic modulations. **Lab. Inv.**, v. 63, p. 144-161, 1990.

SAFARI M.R.; HEIDARI A.A.; SHAMS S. The Effects of Volatile Oils on Low Density Lipoprotein Glycation by Model System In Vitro (abstract). **Clin Chem Lab Med**, v. 45, Special Supplement, p. S1 – S473, 2007.

SAYYAH, M.; NADJAFNIA, L.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p. 283–287, 2004.

SEARLE, J.; Iron storage diseases. In: MACSWEEN R. N. M. **Churchill Livingstone. Pathology of the Liver.** p.261-270, 2001.

SEGUIN, B.; UETRECHT, J.; The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v.3, p. 235-242, 2003.

SHAN, X; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v.47, p. 61-71, 1990.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v.17, p. 227-36, 2004.

SLEYSTER, E.C.; KNOOK, D.L. Relation between localization and function of rat liver Kupfer cells. **Lab. Inv.**, v.47, p. 484-490, 1982.

SPAHN-LANGGUTH, H.; BENET, L.Z. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? **Drug Metab. Rev.**, v.24(1), p. 5-47, 1992.

SKOULIS, N.P.; JAMES, R.C.; HARBINSON, R.D.; ROBERTS, S.M. Depression of hepatic glutathione by opioid analgesic drugs in mice. **Toxicol. App. Pharmacol.**, v.99, p.139-147, 1989.

STICKEL, F.; BAUMULLER, H.M.; SEITZ, K.; VASILAKIS, D.; SEITZ, G.; SEITZ, H.K.; SCHUPPAN, D. Hepatitis induced by Kava (Piper methysticum rhizoma). **J. Hepatol.**, v. 39(1), 62-67, 2003.

SUN, J. **D-limonene: safety and clinical applications. (Clinical report).** Disponível em: < <http://www.encyclopedia.com/doc/1G1-170236094.html>>. Acesso em: <12 de dezembro de 2009>.

STUMPTNER, C.; FUCHSBICHLER, A.; HEID, H.; ZATLOUKAL, K.; DENK, H. **Mallory Body - A Disease-Associated Type of Sequestosome Hepatology**, v.35, p 1053-1062, 2002.

TELI, MR.; DAY, CP, BURT AD et al. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. **Lancet**, v. 346, p. 987-90, 1995.

THUMMEL, K.E.; SLATTERY, J.T.; RO, H.; CHIEN, J.Y.; NELSON, S.D.; LOWN, K.E.; WATKINS, P.B. Ethanol and production of the hepatotoxic metabolite of acetaminophen in health adults. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.67 (6), p591-599, 2000.

THUNE, P.; MORK, N.J. A case of centrolobular toxic necrosis of liver due to aromatic retinoid – Tigason (Ro 10-9359). **Dermatologica**. v.160, p. 404-408, 1980.

TIMBRELL, J.A. Toxic responses to foreign compounds. In: TAYLOR AND FRANCIS. **Timbrell J A Principles of Biochemical Toxicology**. 2ed. London: 1991, p.193- 284.

TRABER, G. P.; CHIANALE, J.; GUMUCIO, J. J. Physiologic Significance and Regulation of Hepatocellular Heterogeneity. **Gastroenterology**, v. 95, p. 1130-1143, 1988.

TRIGUEIRO DE ARAÚJO, M. S. A. **Estude Anatomo-Patologique, Ultrastructurale et Immunohistochimique. Evaluation Morphométric des Lésions Vasculaires, Cellulaires et Matricielles**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Claude Bernard – Lyon I, Lyon, 1992.

TSUJI, M.; FUJISAKI, Y.; YAMACHIKA, K.; NAKAGAMI, K.; FUJISAKA, F.; MITO, M.; AOKI, T.; KINOSHITA, S.; OKUBO A.; WATANABE I. Studies on d-limonene, as gallstone solubilizer (I): General pharmacological studies. **(Japan) Oyo Yakuri**, v. 8, p. 1439-1459, 1974.

TSUTSUMI, M.; LASKER, J. M.; SHIMIZU, M.; ROSMAN, A.S.; LIEBER, C.S. Intralobular Distribution of Ethanol-Inducible P450IIE1 in Rat and Human Liver. **Hepathology**, v.10 (4), p. 437-446, 1989.

TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J.; ALKIRE BEN, H. Essential oil of *Aeollantus suaveolens* Mart. Ex Spreng. (Lamiaceae). **Journal Essential Oil Research**, v.13, p. 198-199, 2001.

TUMA, D.J.; CASEY, C.A.; SORRELL, M.F. Effects of ethanol on hepatic protein trafficking: Impairment of receptor-mediated endocytosis. **Alcohol and Alcoholism**, v.25 (2-3), p. 117-125, 1990.

UNITED STATES. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Integrated Risk Information System d-Limonene (1993)**. Disponível em <<http://www.epa.gov/iris/subst/0682.htm>>. Acesso em 05 de fevereiro de 2010.

VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS JÚNIOR, J. G.; VIANA, G.S.B. Central effects os citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, p.709-714, 2002.

VALE T. G.; MATOS, F.J.A.; DE LIMA, T.C.M.; G.S.B., VIANA. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. chemotypes. **Journal of Etnopharmacology**, v.167, p. 127-133, 1999.

VENDEMIALE, G.; GRATTAGLIANO, I.; ALTOMARE, E.; TURTURRO, N.; GUERRIERI, F. Effect of acetaminophen administration on hepatic glutathione compartmentation and mitochondrial energy metabolism in the rat. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52(8), p. 1147-1154, 1996.

VIGUSHIN, D.M.; POON, G.K.; BODD, Y. A. Phase I and pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.42, p. 111-117, 1998.

WALDHAUSER, K.M.; TOROK, M.; HA, H.R.; THOMET, U.; KONRAD, D.; BRECHT, K.; FOLLATH, F.; KRAHENBUHL, S. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.319(3), 1413-1423, 2006.

WANG, T.; SHANKAR, K.; RONIS, M.J.; MEHENDALE, H.M. Mechanisms and outcomes of drug- and toxicant-induced liver toxicity in diabetes. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 37(5), p. 413-459, 2007.

WATKINS, P.B. Mechanisms of drug-induced liver disease. In: SCHIFF, E.F.; SORREL, M.; MADDREY, W.C. **Diseases of the Liver**. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2003. p. 1129-1145.

WEBB, D.R.; RIDDER G.M.; ALDEN C.L. Acute and subchronic nephrotoxicity of d-limonene in Fischer 344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.27, p. 639-649, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme On Chemical Safety. Concise International Chemical Assessment Document. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad05.htm>>. Acesso em: <12 de fevereiro de 2010>.

CHANG Y-C.; KARLBERG A-T.; MAIBACH, H.I. Allergic contact dermatitis from oxidized d-limonene. **Contact Dermatitis**, v. 37(6), p. 308–308, 1997.

YUAN, G.; GONG, Z.; ZHOU, X.; ZHANG, P.; SUN, X.; LI, X. Epigallocatechin-3-Gallate Ameliorates Alcohol-Induced Liver Injury in Rats. **Int. J. Mol. Sci.**, v.7, p. 204-219, 2006

ZAFRANI, E.S.; PINADEAU, Y.; DHUMEAUX, D. Drug-induced vascular lesions of the liver. **Arch Intern Med**, v.143, p. 495-502, 1983.

ZAFRANI, E.S.; FELDMANN, G. Primary lesions of the hepatic sinusoid. In: Bioulac-Sage, P; Balabaud, C. **Sinusoids in Human Liver: Health and Disease**. The Kupffer Cell Foundation. The Netherlands, p. 207-222, 1988 .

ZETTERMAN, R.K.; SORRELL, M.F. Immunologic aspects of alcoholic liver disease. **Gastroenterology**, v.81, p. 616-624, 1981.

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](#)