UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lívia Maria Almeida Barros da Silva

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA *Cannabis sativa* (CARRAPATICIDA) SOBRE A PARÓTIDA E O TIMO DE CAMUNDONGOS (MODELOS HOSPEDEIROS)

Rio Claro - SP

2025

Lívia Maria Almeida Barros da Silva

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA *Cannabis sativa* (CARRAPATICIDA) SOBRE A PARÓTIDA E O TIMO DE CAMUNDONGOS (MODELOS HOSPEDEIROS)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profª Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador(a): Ma. Odaiza da Silva

Rio Claro - SP

2025

S586e

Silva, Lívia Maria Almeida Barros da

Efeito da exposição ao extrato da inflorescência da Cannabis sativa (carrapaticida) sobre a parótida e o timo de camundongos (modelos hospedeiros) / Lívia Maria Almeida Barros da Silva. -- Rio Claro, 2025

53 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

Coorientadora: Odaiza da Silva

1. Histologia. 2. Morfologia. 3. Cannabis sativa. 4. Glândula Parótida. 5. Timo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Lívia Maria Almeida Barros da Silva

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA *Cannabis sativa* (CARRAPATICIDA) SOBRE A PARÓTIDA E O TIMO DE CAMUNDONGOS (MODELOS HOSPEDEIROS)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Maria Izabel Souza Camargo
Profª. Dra.Tatiana Schneider Vieira de Moraes
Ma. Melissa Carolina Pereira

Aprovado em: 17 de Novembro de 2025

gov.br Documento assinado digitalmente
LIVIA MARIA ALMEIDA BARROS DA SILVA
Data: 30/11/2025 21:14:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do discente

gov.br Documento assinado digitalmente
MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Data: 28/11/2025 17:57:39-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do(a) orientador(a)

gov.br Documento assinado digitalmente
ODAIZA DA SILVA
Data: 30/11/2025 17:33:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do(a) coorientador(a)

Dedico este trabalho ao meu maior
exemplo de força e inspiração,
minha mãe Mara.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mara, por me impulsionar a viver meus sonhos, por me dar suporte, colo e tranquilidade. Obrigada por sempre acreditar em mim. Você é meu maior exemplo e meu maior amor na vida.

Ao meu pai Marcelo, minha avó Luci, minha irmã Gabriela, meu tio Marcus, por todo o suporte e ajuda, e também por todo o carinho e afeto, que significam muito para mim.

À todos os meus familiares, que sempre me apoiaram, me incentivaram e me ajudaram ao longo da vida.

Ao meu grande amor, Aline, por me mostrar as cores mais vibrantes que a vida tem a oferecer, e por sempre me impulsionar (e me inspirar) a ser minha melhor versão.

Aos meus amigos, Ana, André, Angelo, Caio, Catharina, Gabriel, João Vitor, Maria Vitória, Tito, Victor Hugo, Yolanda e aos demais que também estiveram nessa jornada. Com vocês, vivi as melhores histórias e os melhores anos da minha vida, e me sinto sortuda por ter encontrado pessoas tão incríveis pelo caminho. Em mim, vocês sempre encontrarão apoio, amor, carinho e amizade!

À todos os meus amigos de São Luiz, com carinho para Darline e Larissa. A saudade e a distância física sempre foram grandes, mas carreguei vocês em meu coração em todos os momentos. Vocês são a minha casa.

À minha orientadora, Maria Izabel, por me conceder a oportunidade de iniciar minha carreira científica em seu laboratório. Obrigada por toda a compreensão, correções, conversas e possibilidades que a senhora me ofereceu. Sempre a lembrarei com muito carinho.

Aos colegas e colaboradores do BCSTM, em especial, Odaiza, Milena, Duda, Melissa e Marina, por toda a ajuda, paciência e ensinamentos durante os anos em que estive com vocês. Vocês fazem parte da minha trajetória acadêmica.

À UNESP e à todos os professores e professoras que cruzaram meu caminho nesses seis anos. Muito obrigada por todos os ensinamentos!

Por fim, à todos àqueles que moram em meu coração. Obrigada por nunca me deixarem caminhar sozinha.

“Despite knowing the journey… and where it leads… I embrace it. And I welcome every moment of it.”
(Arrival, 2016).

RESUMO

Carrapato-marrom-do-cão é o nome popular da espécie *Rhipicephalus linnaei*, um ectoparasito responsável por transmitir patógenos letais para cães e humanos, como *Ehrlichia canis* e as bactérias do gênero *Rickettsia*. No entanto, seu controle enfrenta desafios devido à resistência desenvolvida contra os carrapaticidas atuais. Extratos de plantas, como os da *Cannabis sativa*, apresentam propriedades carrapaticidas comprovadas, mas, apesar de sua efetividade, é necessário investigar a toxicidade desse extrato em organismos não-alvo. As glândulas salivares, principalmente as parótidas, são fundamentais tanto na digestão quanto na homeostase, enquanto o timo é o sítio de maturação de linfócitos T, primordial para a imunidade adaptativa; porém, ambos os órgãos podem sofrer alterações morfológicas decorrentes da exposição a produtos químicos que impactam suas funções. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo morfohistológico da glândula salivar parótida e do timo de fêmeas de camundongos *Mus musculus* expostas ao extrato da inflorescência da *Cannabis sativa* (carrapaticida). Para isso, os animais foram expostos a diferentes concentrações do extrato (2,5; 10 e 20 mg/mL), e os órgãos foram analisados a partir da histologia e da histoquímica. Os resultados mostraram que a parótida sofreu alterações morfológicas já em 2,5 mg/mL, enquanto o timo apresentou perda de celularidade e espaços intercelulares em todas as concentrações (2,5; 10 e 20 mg/mL), comprometendo a maturação de linfócitos T. Por fim, conclui-se que, mesmo eficaz contra carrapatos, o extrato da *C. sativa* apresenta toxicidade para organismos não-alvo.

Palavras-chave: *Rhipicephalus linnaei*; *Cannabis sativa*; timo; glândula salivar; parótida; morfologia; histologia.

ABSTRACT

The brown dog tick is the common name for the species *Rhipicephalus linnaei*, an ectoparasite responsible for transmitting lethal pathogens to dogs and humans, such as *Ehrlichia canis* and bacteria of the genus *Rickettsia*. However, controlling it is challenging due to the resistance it has developed against current tickcide. Plant extracts, such as those from *Cannabis sativa*, have proven properties against ticks, but despite their effectiveness, it is necessary to investigate the toxicity of this extract in non-target organisms. The salivary glands, especially the parotid glands, are essential for both digestion and homeostasis, while the thymus is the site of T lymphocyte maturation, which is essential for adaptive immunity. However, both organs can undergo morphological changes resulting from exposure to chemicals that impact their functions. Thus, the present study aimed to perform a morphohistological study of the parotid salivary gland and thymus of female *Mus musculus* mice exposed to *Cannabis sativa* inflorescence extract (tickcide). For this purpose, the animals were exposed to different concentrations of the extract (2,5; 10, and 20 mg/mL), and the organs were analyzed using histology and histochemistry. The results showed that the parotid gland underwent morphological changes at concentrations as low as 2,5 mg/mL, while the thymus presented loss of cellularity and intercellular spaces at all concentrations (2,5; 10, and 20 mg/mL), compromising T lymphocyte maturation. Finally, it was concluded that, although effective against ticks, *C. sativa* extract is toxic to non-target organisms.

Keywords: *Rhipicephalus linnaei*; *Cannabis sativa*; thymus; salivary glands; parotid; morphology; histology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 11
1.1 A história da *Cannabis sativa* e sua utilização na medicina.....13
1.2 Estrutura e função das Glândulas Salivares Parótidas dos hospedeiros.....14
1.3 O papel do Timo no sistema imunológico do hospedeiro.....19
2 OBJETIVOS..... 21
2.1 Objetivos gerais.....21
2.2 Objetivos específicos.....21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....22
3.1 Obtenção do extrato da *Cannabis sativa*..... 22
3.2 *Mus musculus*.....22
3.3 Exposição das fêmeas de camundongos ao extrato da *C. sativa* via aspersão.. 22
3.4 Análise morfológica da Parótida e do Timo dos camundongos *M. musculus*..... 23
3.4.1 Histologia.....23
3.5 Coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) (Junqueira & Junqueira, 1983).....24
3.6 Histoquímica.....24
3.6.1 Coloração pelo azul de bromofenol (detecção de proteínas totais) (Pearse, 1985)..... 24
3.6.2 Reação pelo PAS (detecção de polissacarídeos neutros) (Junqueira & Junqueira, 1983).....25
3.7 Fotodocumentação e confecção de esquemas.....25
4 RESULTADOS..... 26
4.1 Parótida..... 26
4.1.1 Grupo Controle (Água Destilada)..... 28
4.1.2 Grupo Tratado com 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa*..... 29
4.2 Timo.....29
4.2.1 Grupo Controle (Água Destilada)..... 30
4.2.2 Grupo Controle (Etanol)..... 32
4.2.3 Grupo Tratado com o extrato da *C. sativa* (2,5 mg/mL)..... 34
4.2.4 Grupo Tratado com o extrato da *C. sativa* (10 mg/mL)..... 36
4.2.5 Grupo Tratado com o extrato da *C. sativa* (20 mg/mL)..... 38
5 DISCUSSÃO GERAL.....39
6 CONCLUSÃO..... 47
REFERÊNCIAS.....48

1 INTRODUÇÃO

A espécie de carrapato *Rhipicephalus linnaei*, popularmente conhecida como carrapato-vermelho-do-cão, foi definida a partir de descrições genéticas e morfológicas detalhadas (Šlapeta et al., 2021). Esses ectoparasitos hematófagos obrigatórios são vetores de diversos patógenos que infectam os animais domésticos, especialmente os canídeos (Abreu et al., 2020; Dantas-Torres, 2008; Šlapeta et al., 2022), e também os humanos (Paguem et al., 2023). Quando fixados ao hospedeiro, podem originar inúmeras manifestações clínicas, como lesões cutâneas, teciduais e anemia, principalmente em casos severos de infestações (Paguem et al., 2023).

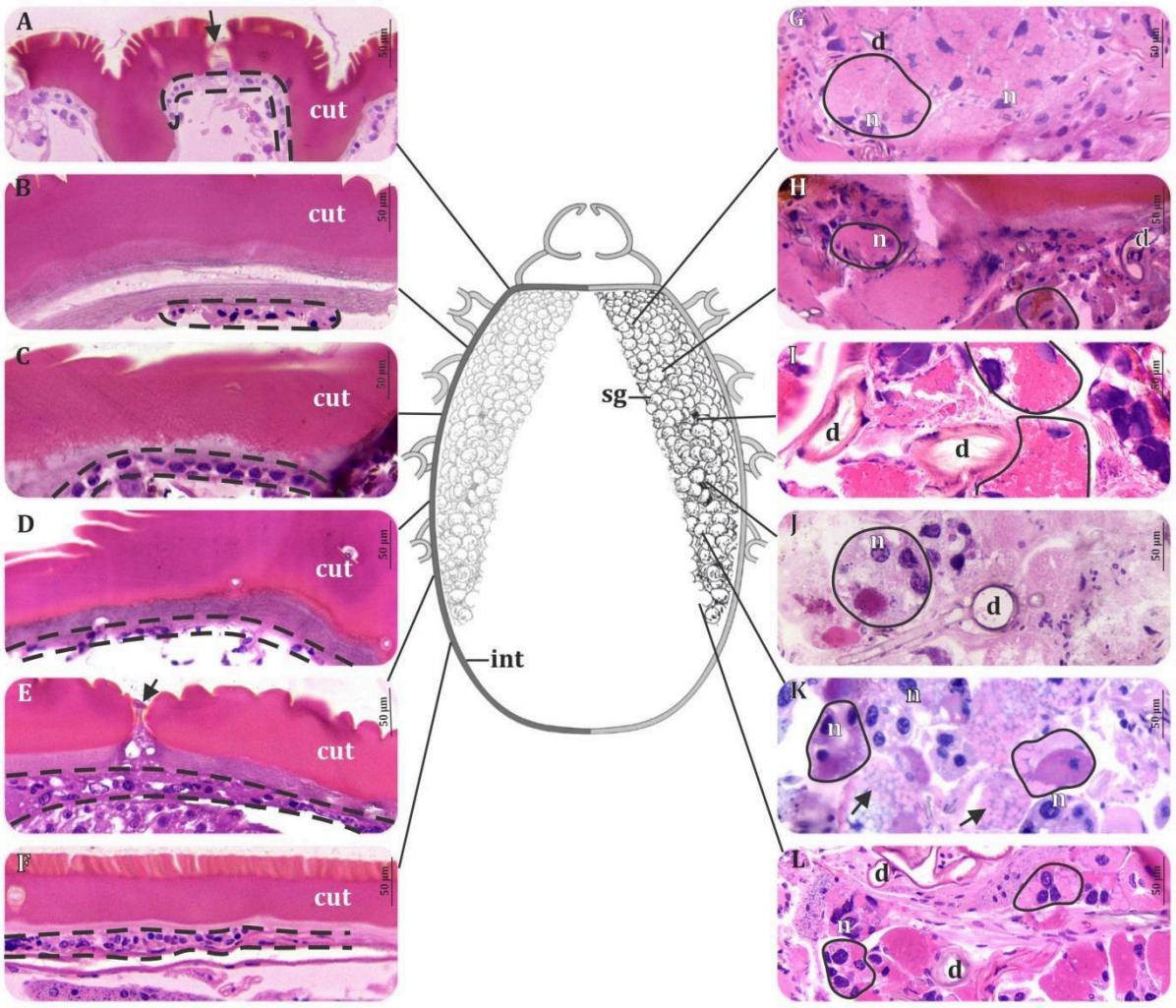
Esses carrapatos transmitem aos cães domésticos, seus hospedeiros preferenciais, patógenos letais, como a *Ehrlichia canis*, uma bactéria gram-negativa da ordem *Rickettsiales* que ataca monócitos circulantes, originando a Síndrome Ehrlichiose Monocítica Canina (Chaber et al., 2022). Aos humanos, podem transmitir as bactérias do gênero *Rickettsia*, agentes etiológicos da Febre Maculosa, uma doença que pode levar o portador à morte em questão de dias (Dantas-Torres, 2008). Além desses patógenos, sabe-se que o *R. linnaei* também pode transmitir as bactérias do gênero *Anaplasma* e *Borrelia spp.*, bem como protozoários do gênero *Babesia* e *Hepatozoon* (Abreu et al., 2020; Dantas-Torres, 2008).

Diante do exposto, e dada sua importância médica e veterinária, é notável que a busca por estratégias para o controle de carrapatos trata-se de uma temática de extrema relevância. Para tanto, veterinários e especialistas prescrevem o uso regular de carrapaticidas para evitar infestações de *R. linnaei* nos cães domésticos, os mais afetados. Entretanto, os produtos carrapaticidas utilizados atualmente são químicos sintéticos e, além do seu alto custo, a aplicação inadequada, o uso persistente e a superdosagem são fatores que aceleram a aquisição de resistência por parte dos ectoparasitos (Camargo-Mathias et al., 2024; Obaid et al., 2022), dificultando ainda mais seu controle e eliminação.

Há, portanto, a necessidade de desenvolver outras estratégias para o controle efetivo de carrapatos, sem prejudicar os organismos não-alvo, inclusive os próprios hospedeiros. Para isso, estudos recentes vêm demonstrando que bioativos extraídos de diversas partes de espécies de plantas seriam fontes de moléculas com propriedade carrapaticida, capazes de combater ectoparasitos (Gonçalves, Huerta,

Freitag, 2016; Camargo-Mathias et al., 2018). Recentemente, Camargo-Mathias et al. (2024) demonstraram que o extrato da *Cannabis sativa* é capaz de alterar, morfohistologicamente, o epitélio cuticular do integumento de fêmeas de *R. linnaei*, causando severas modificações, bem como nas glândulas salivares, destruindo os ácinos secretores e levando o órgão a uma degeneração precoce (Figura 1). Ressalta-se que esses órgãos desempenham um papel vital no sucesso biológico do ectoparasito, e alterações desse nível influenciam diretamente o equilíbrio do organismo e a sobrevivência da espécie.

Figura 1 – Desenho esquemático de *R. linnaei* mostrando as alterações causadas pela exposição ao extrato da *Cannabis sativa*.



Fonte: Camargo-Mathias et al. (2024).

Legenda: A figura mostra a localização do integumento (**int**) e das glândulas salivares (**sg**). **A-F:** Secções histológicas do integumento (coradas por HE). **G-L**: Secções histológicas das glândulas salivares (corada por HE).

1.1 A história da *Cannabis sativa* e sua utilização na medicina

A *C. sativa*, popularmente conhecida como “maconha”, está entre as primeiras plantas cultivadas pelo homem (Zuardi, 2006). Estudos paleobotânicos confirmaram que a *Cannabis* já estava presente há 11.700 anos na Ásia Central e, a partir de então, forneceu diversos recursos importantes aos seres humanos, como fibras para fabricação de redes e cordas, alimentos e sementes para extração de óleos (Crocq, 2020). Ademais, o uso desta planta na medicina alternativa data de 2.500 a.C. na farmacopeia *Pen-ts'ao Ching*, uma espécie de livro de remédios baseado em tradições orais transmitidas através de gerações. Nessa época, a *C. sativa* era indicada para alguns tratamentos, como dores reumáticas, problemas no sistema reprodutor feminino, constipações, entre outros (Zuardi, 2006). Também no papiro de *Ebers*, no Egito, há cerca de 1.500 a.C., há uma descrição da aplicação tópica da *Cannabis* para o tratamento de inflamações (Crocq, 2020).

Apesar de seu histórico, foi somente no século XX que importantes descobertas a respeito dos componentes da *C. sativa* ocorreram. O Δ9-tetraidrocanabinol (THC) foi o primeiro registro de obtenção de um princípio ativo da *Cannabis* em sua forma mais pura, em 1964, através dos experimentos de Gaoni e Mechoulam (Honório et al., 2006). O professor e pesquisador Raphael Mechoulam também foi responsável por isolar o canabidiol (CBD), o canabinoide não psicotrópico mais investigado e o THC, principal responsável pelos efeitos psicoativos (Guilherme et al., 2014).

Desde então, pesquisas e ensaios pré-clínicos vêm sendo realizados com a finalidade de avaliar as propriedades medicinais da *Cannabis*. Nos últimos anos, estudos publicados afirmam que os canabinóides, componentes químicos presentes na *C. sativa*, possuem propriedades analgésicas, anticonvulsivantes, antitumorais e anticancerígenas, além de atuar como estimulante de apetite em pacientes com câncer e pessoas com *AIDS* (Pugazhendhi et al., 2021).

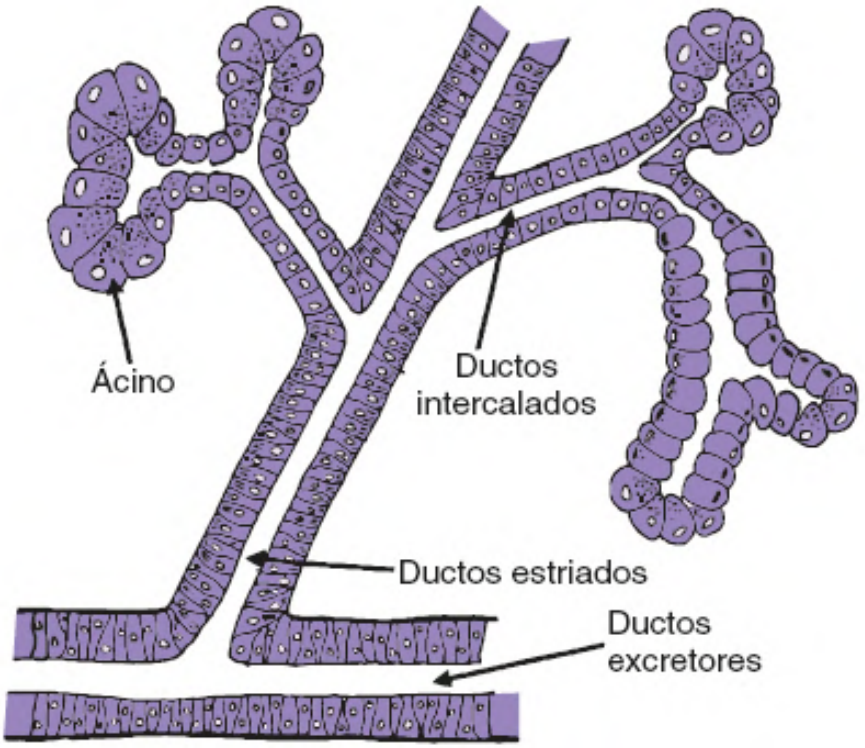
Dada a crescente utilização da *Cannabis* em pesquisas que exploram seu potencial nos mais diversos campos, incluindo a medicina humana e, mais recentemente, na veterinária, juntamente com todas as informações anteriormente expostas, torna-se evidente a necessidade de se averiguar os níveis de toxicidade dessa espécie, considerando seu comprovado potencial carrapaticida. É de suma importância que estratégias para o combate de carrapatos, apesar de efetivas, não prejudiquem os organismos não-alvo. Dessa forma, há um incentivo para o desenvolvimento de estudos com foco não somente no controle eficiente dos carrapatos, mas que também investiguem relações que envolvam a segurança de sua aplicação nos hospedeiros.

De forma geral, mesmo a *C. sativa* mostrando ser uma alternativa para o controle eficiente de ectoparasitos, ainda não se sabe ao certo quais são seus reais efeitos no organismo dos hospedeiros e muito menos se seria capaz de alterar o funcionamento de importantes órgãos e estruturas. Para tanto, o presente estudo buscará analisar, por meio de uma avaliação morfohistológica, se o timo e a parótida, importantes órgãos do hospedeiro, sofrem alterações em decorrência da exposição ao extrato da *C. sativa*, quando utilizada como carrapaticida. Este estudo visa complementar uma série de avaliações que vêm sendo desenvolvidos pelos demais colaboradores do *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM), trazendo à luz resultados e análises referentes a toxicidade do extrato em órgãos como a tireóide, os rins e o fígado de animais expostos.

1.2 Estrutura e função das Glândulas Salivares Parótidas dos hospedeiros

As glândulas salivares (Figura 2) são estruturas anexas ao sistema digestório, com função de sintetizar e secretar a saliva, um fluido complexo com diversos componentes orgânicos e inorgânicos, que mantém a cavidade oral úmida e protegida (Jaeger & Freitas, 2016). Além disso, atua em processos importantes no organismo, como a própria digestão, por exemplo. De acordo com Jaeger & Freitas (2016), qualquer alteração nessa glândula ocasionará uma diminuição do fluxo salivar na cavidade oral que, por sua vez, acarretará em um aumento significativo na incidência de: cárie dentária, doença periodontal e demais infecções virais.

Figura 2 – Representação esquemática de glândula salivar (ductos e ácinos) em mamíferos.



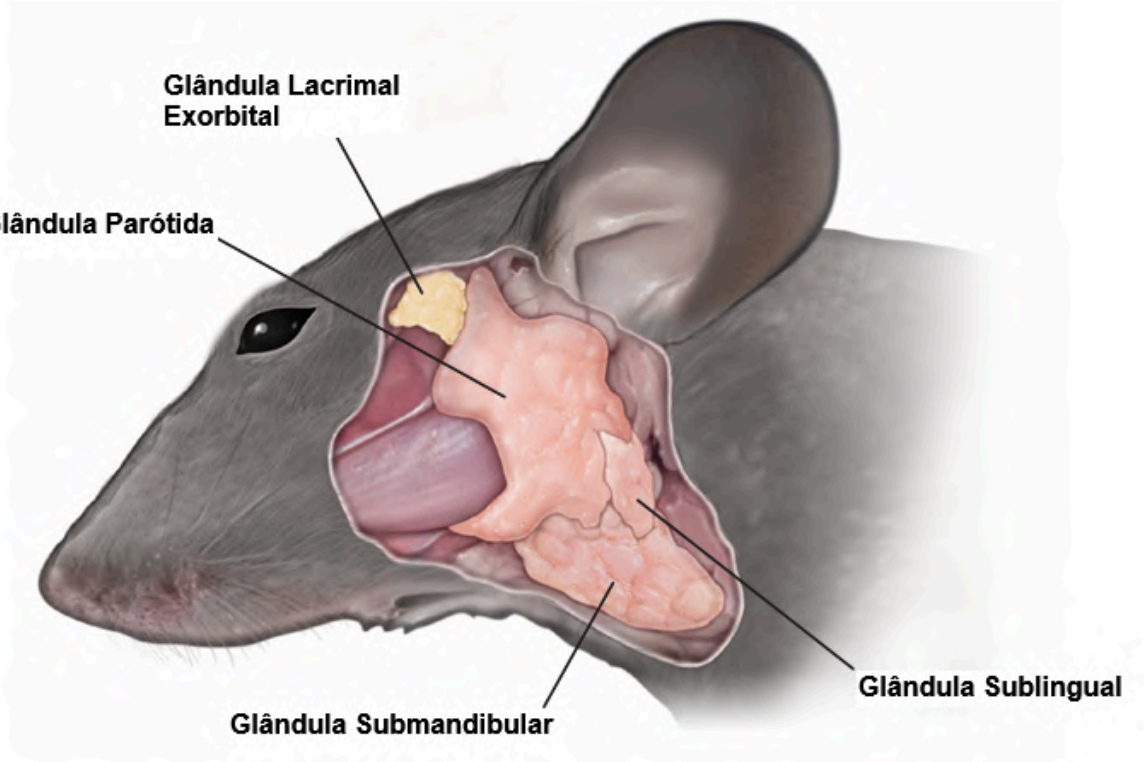
Fonte: Klein, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2021.

Legenda: Representação esquemática das partes de uma glândula salivar. A saliva é inicialmente sintetizada e secretada pelas células acinares e posteriormente modificada quando percorre os ductos intercalares.

As Glândulas Salivares da maioria dos mamíferos são classificadas em três: parótida, submandibular (submaxilar) e sublingual; os cães, por exemplo, possuem também a glândula zigomática. A parótida (Figuras 3 e 4), foco do presente estudo, é uma glândula acinosa composta, com sua porção secretora sendo constituída inteiramente por células serosas que possuem, no seu citoplasma, grânulos de secreção com altos índices de proteína e elevada atividade de amilase, sendo ela a responsável por iniciar a digestão de carboidratos já na cavidade oral (Junqueira & Carneiro., 2023). Nos cães (Figura 5), no entanto, a parótida não é puramente serosa (Singh, 2019). Em associação às estruturas comentadas, há o sistema de ductos, no qual o ducto principal de cada glândula salivar maior desemboca na

cavidade oral, e morfologicamente encontra-se revestido por um epitélio pavimentoso estratificado e não queratinizado (Junqueira & Carneiro., 2023).

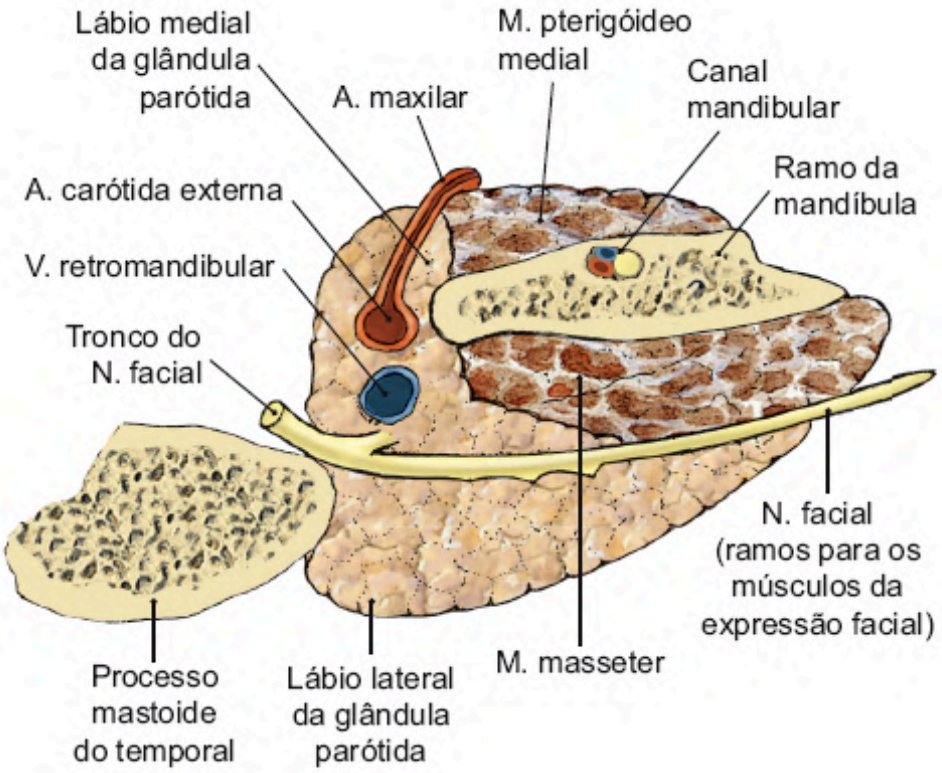
Figura 3 – Representação esquemática referente à anatomia da Glândula Parótida de roedores.



Fonte: Traduzido de Treuting, P. M., Doyle, S. M., Montine, K. S. (Eds.). **Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.** 2. ed. San Diego: Academic Press, 2017.

Legenda: Localização das glândulas nos roedores.

Figura 4 – Representação esquemática mostrando a anatomia da glândula parótida (humana).



Fonte: Reher, P.. **Anatomia Aplicada à Odontologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020.

Legenda: Glândula parótida humana, para fins de observação, em vista lateral.

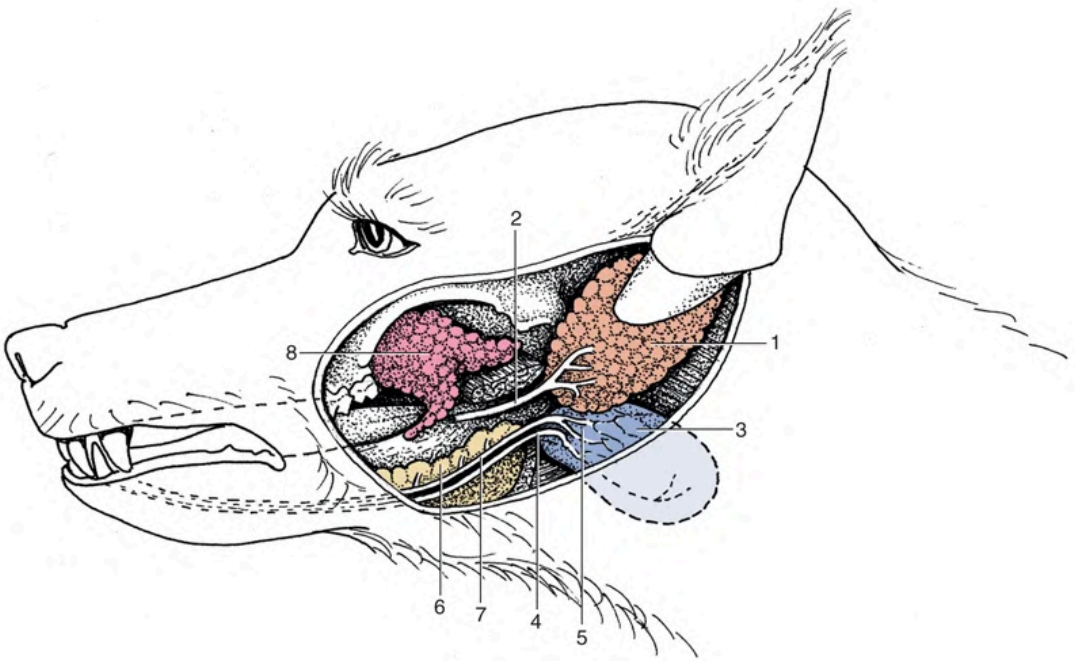
Ademais, especialmente nos cães, os principais alvos dos carrapatos *R. linnaei*, as glândulas salivares desempenham também, mesmo que de maneira secundária, um papel na termorregulação, pois a salivação é considerada um mecanismo de resfriamento evaporativo (Mota-Rojas et al., 2021). Foi demonstrado que, nos cães domésticos, altas temperaturas induzem a vasodilatação cutânea, respiração ofegante e salivação (Jimenez et al., 2023; Petersen, 1979), o que salienta então alguns mecanismos utilizados pela espécie para resfriar o corpo.

A composição da saliva dos mamíferos inclui constituintes inorgânicos, como os íons cálcio e fosfato, que atuam na manutenção da integridade mineral do dente, e o bicarbonato, que age como um tampão salivar. Os constituintes orgânicos são majoritariamente as proteínas, como a amilase salivar, as proteínas ricas em prolina, lisozima, IgA e peroxidases; o componente orgânico mais abundante, no entanto,

são as mucinas, capazes de prevenir a dessecação, além de se ligar a toxinas, aglutinar bactérias e interagir com células hospedeiras (Dodds, Johnson, Yeh, 2005).

Os carrapatos *R. linnaei*, os principais ectoparasitos que infestam os canídeos (Abreu et al., 2020; Dantas-Torres, 2008; Šlapeta et al., 2022), possuem hábitos que incluem a fixação no corpo do hospedeiro (na infestação) em locais específicos, principalmente na região do pescoço e da cabeça (Dantas-Torres & Otranto, 2010). Essas regiões, em especial a cabeça, é onde estão, interna e geograficamente, situadas as parótidas (Figura 4), e é justamente neste local onde se concentra a borrifação de carrapaticidas, podendo causar alterações nessa estrutura.

Figura 5 – Representação esquemática mostrando a localização das glândulas salivares maiores no cão.



Fonte: Singh, B.. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2019.

Legenda: 1: Glândula parótida; 2: ducto parotídeo; 3: glândula mandibular; 4: ducto mandibular; 5: parte caudal da glândula sublingual compacta; 6: parte rostral da glândula sublingual compacta; 7: ducto sublingual principal; 8: glândula zigomática.

Esse contexto enfatiza a necessidade de uma avaliação sobre a toxicidade e segurança do extrato da *C. sativa*, tanto devido à posição anatômica da parótida nos hospedeiros, quanto à sua função, tendo em vista seu papel essencial em processos

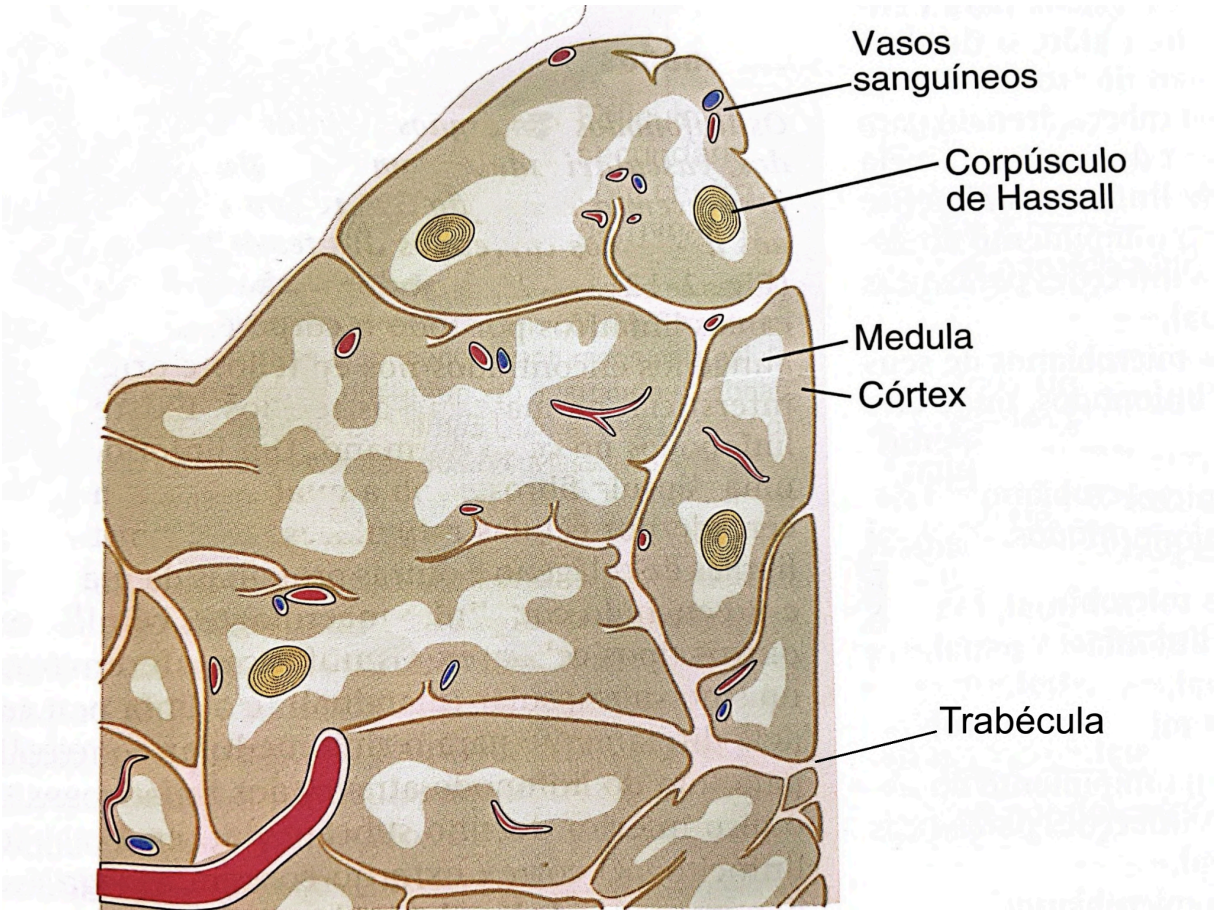
fisiológicos, como digestão e homeostase. Logo, qualquer alteração estrutural pode comprometer essas funções, o que indicaria possíveis efeitos adversos do extrato no corpo dos hospedeiros afetados pelos ectoparasitos.

1.3 O papel do Timo no sistema imunológico do hospedeiro

O timo é considerado um importante órgão linfóide, pois desempenha um papel essencial na maturação de linfócitos T, atuantes da imunidade adaptativa e responsáveis pela proteção do organismo contra patógenos invasores, distúrbios imunológicos e câncer (Gulla et al., 2022). No timo, o linfócito T passa por processos de diferenciação para que expressem receptores de células T (TCR) em sua superfície; nesse contexto, há a seleção negativa de linfócitos T potencialmente reativos e a seleção positiva de linfócitos T com capacidade de reconhecer antígenos nas periferias, garantindo, então, que essas células sejam capazes de combater patógenos, mas que não possuam autorreatividade, evitando a ocorrência de doenças autoimunes (Thapa & Farber, 2019).

Localizado no mediastino, em frente ao coração, o timo está dividido, histologicamente, em duas regiões: o córtex e a medula (Figura 6), sendo que o primeiro abriga os timócitos, ou seja, linfócitos ainda imaturos em processo de maturação, e também células epiteliais tímicas (TECs), que contribuem para eliminar células T autorreativas por meio da seleção negativa; a medula do órgão, por sua vez, é o principal local onde estão alojados os linfócitos T maduros (Lins & De Melo, 2024). Por fim, tem-se a matriz extracelular, constituída por diversos componentes, como colágeno, fibronectina e laminina, que dão suporte às demais células presentes no local (Campinoti et al, 2020; Li et al, 2023; Lins & De Melo, 2024).

Figura 6 - Representação esquemática do timo, mostrando a distribuição anatômica e celular dos seus componentes.



Fonte: Adaptado de Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Legenda: Esquema didático do timo ilustrando uma porção do lobo dividido em múltiplos lóbulos pela trabécula fibrosa.

Ao longo dos anos, a literatura tem registrado estudos que se dedicaram a analisar os efeitos da *C. sativa* no timo, e os resultados obtidos identificaram que os compostos presentes na planta podem: induzir a atrofia tímica (Pertwee, 1974; Baczynsky & Zimmerman, 1983; Benevenuto et al., 2017; Chen et al., 2017), influenciar vias de sinalização críticas que regulam a maturação das células T (Yebra, Klein & Friedman, 1992; Herring et al., 1998; Herring et al., 2001), além de ocasionar mudanças na expressão gênica (Thapa & Farber, 2019) que impactam diretamente a função tímica e a homeostase do organismo (Lins & De Melo, 2024).

Logo, fica evidente a importância de investigar e analisar, histopatologicamente, os possíveis efeitos do extrato de *C. sativa* (carrapaticida)

sobre o timo de organismos que simulam o hospedeiro. Alterações nesse órgão podem comprometer funções cruciais, como a maturação dos linfócitos T, resultando na redução da resposta imunológica contra patógenos, podendo levar a complicações severas no organismo, comprometendo sua integridade e funcionalidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo morfohistológico da glândula salivar parótida e do timo, de fêmeas de camundongos *Mus musculus* expostas ao extrato da inflorescência da *Cannabis sativa* (carrapaticida), afim de verificar se as concentrações do extrato (2,5 mg/mL para a parótida e 2,5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL para o timo), previamente estabelecidas por Camargo-Mathias et al (2024), alteram a morfofunção dos órgãos investigados.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a concentração do extrato de *C. sativa* de 2,5 mg/mL, altera a morfofunção da glândula parótida, trazendo, por exemplo, alterações como lesões ou apoptose das células locais acompanhadas por danos consideráveis, interferência na produção da saliva e infiltrações de células inflamatórias no tecido glandular.

Avaliar se as concentrações do extrato de *C. sativa* de 2,5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL são capazes de causar alterações no timo, como imunotoxicidade, atrofia, morte celular e demais alterações que venham impactar no processo de maturação de linfócitos T.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos apresentados neste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, Instituto de Biociências, UNESP – Campus Rio Claro), sob o protocolo nº 000549.

3.1 Obtenção do extrato da *Cannabis sativa*

O extrato bruto da inflorescência da *C. sativa* foi cedido pela Associação Canábica Maria Flor, situada na cidade de Marília – SP, e produzido sob a supervisão técnica da Dra. Caroline Marroni Cremonez, Diretora Científica da Associação. A análise fitoquímica foi realizada pela DALL Soluções Analíticas e Empresariais, localizada em Curitiba – PR, e supervisionada pelo Dr. Gustavo Bertol, Gerente Técnico da empresa, em parceria com a Associação Canábica Maria Flor.

O extrato bruto sofreu diluições em etanol 30% nas concentrações de: 2,5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL (Nasreen et al., 2020), baseadas em estudos prévios realizados com carrapatos da espécie *R. microplus* e *R. linnaei* pela BCSTM.

3.2 *Mus musculus*

Dez fêmeas *Swiss*, da espécie *Mus musculus*, saudáveis, com peso aproximado de 40g, e idade entre 8 e 10 semanas, adquiridas do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) da UNESP de Botucatu - SP, Brasil, foram alocadas em sala do Biotério do IB, em caixas retangulares de polipropileno (30x20x13cm) identificadas (2 animais/caixa) em condições normais de temperatura 22°C ± 2° C, e umidade (50%), ventilação apropriada, exaustor, fotoperíodo de 12 horas e alimentadas com ração e água *ad libitum*.

3.3 Exposição das fêmeas de camundongos ao extrato da *C. sativa* via aspersão

As 10 fêmeas (2/grupo) de camundongos *Mus musculus* foram expostas:

Grupo Controle Água Destilada (AD): à água destilada;

Grupo Controle Etanol (CE): ao etanol 30%, solvente do extrato;

Grupo Tratamento (T1): ao extrato na concentração de 2,5 mg/mL;

Grupo Tratamento (T2): ao extrato na concentração de 10 mg/mL;

Grupo Tratamento (T3): ao extrato na concentração de 20 mg/mL.

As exposições foram realizadas em 3 dias consecutivos, com intervalos de 24h entre elas, utilizando-se sprays esterilizados, segundo protocolo já descrito por (Cunha et al., 2017), simulando a aplicação de carrapaticidas comerciais em animais hospedeiros. O extrato da *Cannabis* foi borrifado no dorso dos animais, protegendo a cabeça e prevenindo que o composto penetre por outras vias, a saber: nariz, olhos, orelhas e boca.

Desde a primeira exposição, os animais foram observados diariamente por 14 dias. No 14º dia, todos foram eutanasiados, por meio de superdosagem de analgésicos com cloridrato de ketamina (80 mg/kg MC/IP) e cloridrato de xilasina (20mg/kg MC/IP), para a coleta da glândula parótida e do timo.

Os procedimentos de remoção dos órgãos foram realizados pelos médicos veterinários Brunna Fernanda Arraez Alvez, CRMV nº 26756 e Gabriel Correa de Camargo, CRMV nº 52730. Essas estruturas, tão logo coletadas, foram fragmentadas e imediatamente fixadas em mistura aquosa de Bouin e em paraformaldeído 4%.

3.4 Análise morfológica da Parótida e do Timo dos camundongos *M. musculus*

3.4.1 Histologia

Após a coleta, a parótida e o timo foram imediatamente fragmentados e fixados em mistura aquosa de Bouin e em paraformaldeído 4% por 7 dias. Após a fixação, foram lavados em solução tampão fosfato de sódio 2 vezes. Em seguida,

foram desidratados em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 95%) com intervalos de 20 minutos cada, e logo após, embebidos em historesina Leica® por 7 dias. O material foi incluído em moldes plásticos contendo resina e polimerizador e levado à estufa à temperatura de 37ºC por mais 7 dias. Após, os blocos foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255®, com 3µm de espessura, cujas secções foram recolhidas em lâminas de vidro, e então armazenadas em estufa para secagem e posteriormente coradas pela hematoxilina e eosina.

3.5 Coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) (Junqueira & Junqueira, 1983)

As lâminas contendo as secções histológicas foram hidratadas em água destilada por um minuto, coradas com hematoxilina durante 10 minutos e então lavadas por quatro minutos em água parada e depois em água corrente. Em seguida, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. As lâminas secaram em temperatura ambiente até a montagem.

3.6 Histoquímica

3.6.1 Coloração pelo azul de bromofenol (detecção de proteínas totais) (Pearse, 1985)

Os fragmentos dos órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na 2 HPO 4 2,38 g/L e KH 2 PO 42,72 g/L) onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após, os blocos foram seccionados (3 µm) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro para posterior coloração pelo azul de bromofenol, por uma hora, à temperatura ambiente. Após serem passadas em ácido acético 0,5% por 5 minutos e lavadas em água corrente por 15 minutos, as lâminas passaram rapidamente pela solução de álcool butílico

terciário. A seguir, secaram ao ar livre e foram montadas em bálsamo do Canadá. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

3.6.2 Reação pelo PAS (detecção de polissacarídeos neutros) (Junqueira & Junqueira, 1983)

Fragmentos dos órgãos foram fixados em mistura aquosa de Bouin por cinco dias. Depois foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), em banhos de 30 minutos cada. Na sequência, foram embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo também um polimerizador (Leica Historesin Kit). Após, os blocos foram seccionados (3 µm) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Após, foram lavadas em água destilada por 1 minuto e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Foram então lavadas por 30 minutos em água corrente, secas à temperatura ambiente e montadas em bálsamo do Canadá. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

3.7 Fotodocumentação e confecção de esquemas

As lâminas permanentes foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750 alocado no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/RC.

Também foram confeccionados esquemas para demonstrar, de forma didática e comparativa, a presença das alterações em ambos os órgãos.

4 RESULTADOS

4.1 Parótida

Após todo o processamento, foi confeccionado um esquema para demonstrar a localização da glândula no animal, bem como os resultados histológicos e histoquímicos na glândula Parótida referentes ao Grupo Controle (GC) e ao Grupo Tratado (GT) com 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa*.

Figura 7 – Fotodocumentação da parótida e esquema didático.

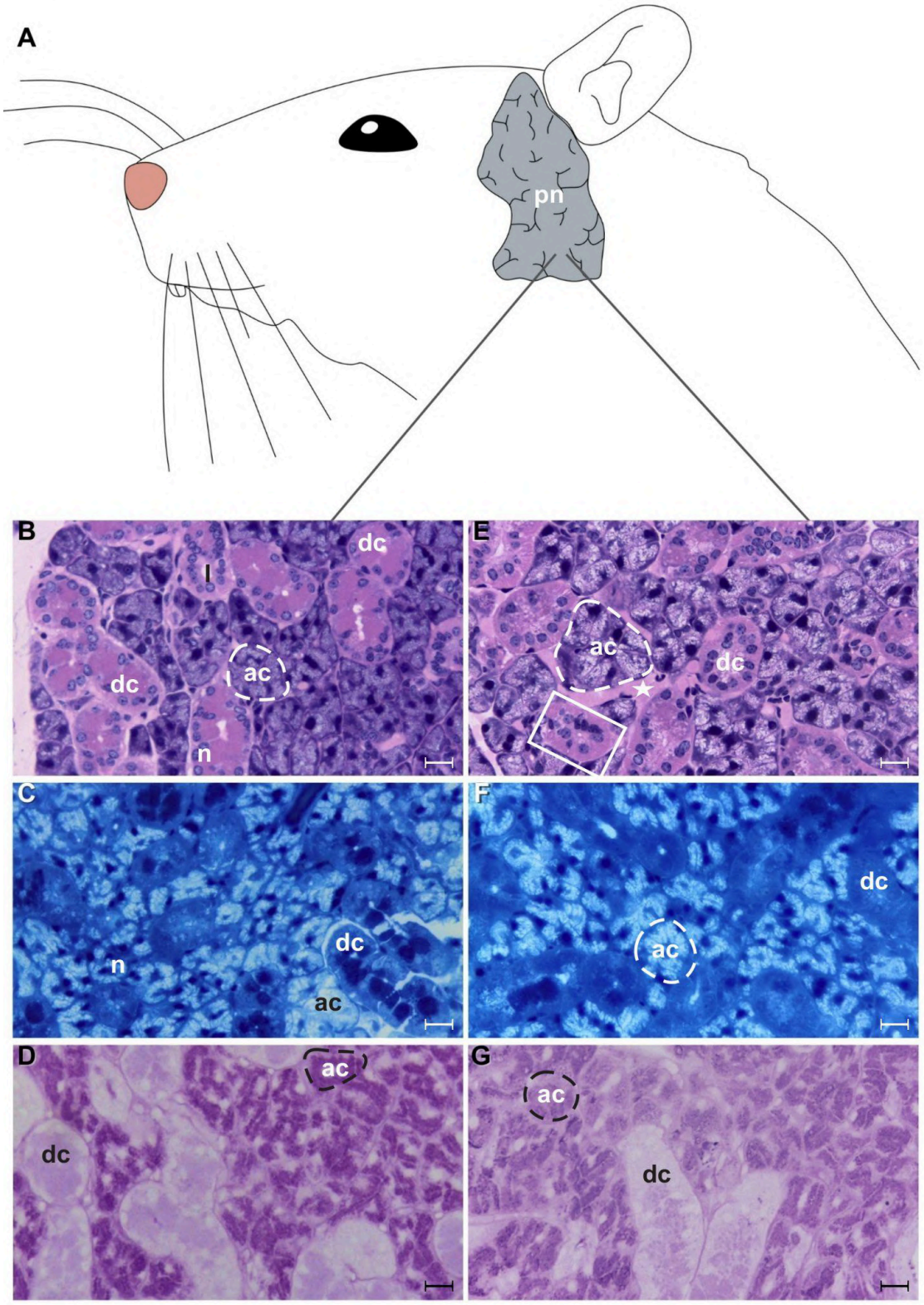


Figura 7: Secções histológicas da parótida: B-D = **GC**; E-G = **GT**. Barras de escala: B-G = 200 µm. Legendas: pn (glândula parótida), dc (ductos), ac (ácinos), l (lúmen), n (núcleo). Símbolos: * (tecido conjuntivo), tracejado (morfologia dos ácinos), retângulo (morfologia dos ductos).

4.1.1 Grupo Controle (Água Destilada)

Os resultados histológicos obtidos no presente estudo trouxeram à luz informações que mostram como as glândulas parótidas reagem à exposição ao extrato da *Cannabis sativa*, na concentração de 2,5 mg/mL, com a finalidade de controlar carrapatos da espécie *R. linnaei* (carrapato do cão).

As glândulas parótidas são constituídas por um sistema de ductos que interliga os ácinos secretores e coleta a secreção sintetizada e liberada pelas células acinares.

Nas glândulas dos animais do Grupo Controle (Figura 7B-D), como era esperado, não foram observadas alterações histológicas ou histoquímicas, visto que os ácinos apresentavam morfologia preservada, e suas células produtoras de secreção (exclusivamente serosa) continham, em seu citoplasma, grânulos ricos em proteínas, além de alta atividade de amilase (para digestão de carboidratos). Nessas células, observam-se limites bem definidos, assim como a presença de núcleos preservados (Figura 7B).

Não foram observadas alterações no sistema de ductos (intercalares e estriados). Vale ressaltar que o sistema de ductos, assim como os ácinos, é formado por células cúbicas e possui, ainda, um núcleo deslocado para a região mais basal da célula (Figura 7B); de forma geral, observa-se que o tecido glandular foi preservado.

A aplicação do teste histoquímico para detecção de proteínas revelou uma resposta positiva dos ácinos, com intensidade variando de moderada a fraca no citoplasma de suas células. Por outro lado, os ductos demonstraram uma forte reação positiva ao teste (Figura 7C). Ademais, os núcleos de ambas as células demonstraram uma forte marcação (Figura 7C).

Quanto à aplicação do teste para detecção de polissacarídeos neutros, verificou-se que as células acinares reagiram fortemente, enquanto os ductos não reagiram, o que indica a ausência de elementos polissacarídicos nessas estruturas (Figura 7D).

4.1.2 Grupo Tratado com 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa*

Ao contrário do que foi observado no Grupo Controle, a parótida dos animais expostos à concentração de 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa* apresentou alterações tanto nos ácinos quanto nos ductos (intercalares e estriados) (Figura 7E). No caso dos ácinos, foi possível verificar que as células secretoras abrigavam grandes quantidades de vacúolos em seu citoplasma, quando, em uma situação normal, deveria haver um armazenamento de secreção (Figura 7E).

Essa mesma condição de vacuolização foi extensamente observada no citoplasma das células dos ductos secretores (Figura 7E), as quais também apresentaram desorganização do epitélio, principalmente quanto à posição dos núcleos, que, no Grupo Controle, ocupavam a região basal, e na exposição ao extrato, passaram a se localizar na porção mediana da célula (Figura 7E). Além dessas alterações, observou-se a região extracelular preenchida por tecido conjuntivo (Figura 7E), além de encolhimento no diâmetro dos ácinos e dos ductos intercalares e estriados, ocasionando o surgimento de espaços maiores do que aqueles encontrados nas glândulas do Grupo Controle.

A aplicação do teste para detecção de proteínas confirmou o achado histológico, o qual, ao contrário do Grupo Controle, não houve marcação para proteínas no interior das células acinares (Figura 7F), além de os ductos intercalares e estriados terem reagido medianamente a presença do corante (Figura 7F).

Os polissacarídeos nesse grupo exposto, ao contrário do observado no Grupo Controle, reagiram com menor intensidade (Figura 7G), e os ductos, assim como no Grupo Controle, não reagiram ao teste (Figura 7G).

4.2 Timo

No presente trabalho realizou-se a histologia e a histoquímica (detecção de proteínas) do timo dos camundongos (Figuras 8-12) que foram expostos à água destilada (Grupo Controle-GC1), ao etanol 30% (Grupo Controle-GC2), e ao extrato da *Cannabis sativa*, nas concentrações de 2,5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL para se verificar alterações neste órgão em função da exposição.

4.2.1 Grupo Controle (Água Destilada)

Figura 8 – Esquema e secções histológicas mostrando a localização do Timo no animal, bem como os resultados histológico e histoquímicos (fotomicrografias) dos animais expostos à Água Destilada.

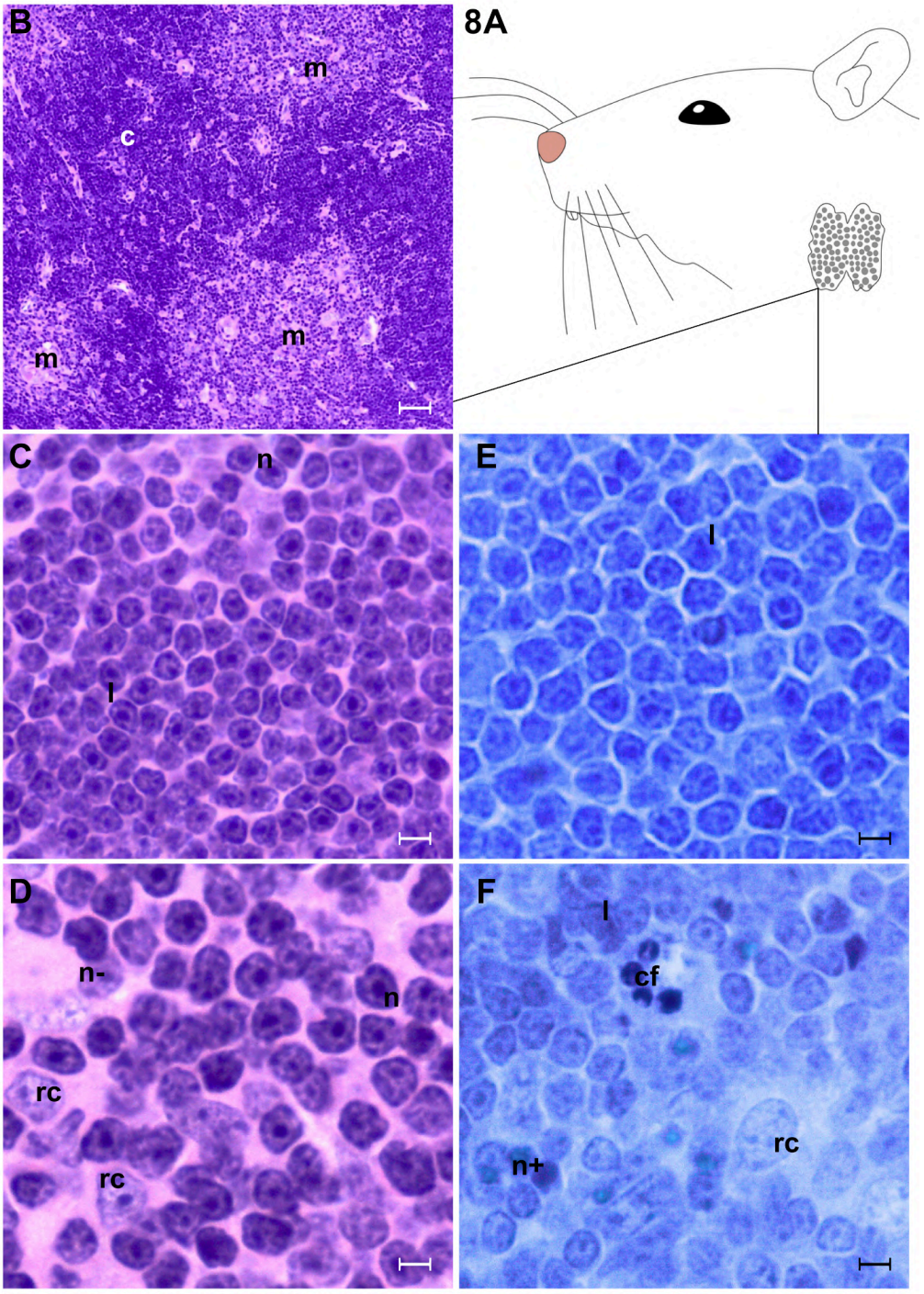


Figura 8: Esquema e secções histológicas e histoquímicas do timo: B-F = **GC (Água Destilada)**. Barras de escala: B = 200 µm; C-F = 20 µm.

Legendas: c (córtex), m (medula), l (linfócitos), n (núcleo), n- (núcleo menos corado), n+ (núcleo mais corado), rc (célula reticular), cf (fragmento celular).

Os dados obtidos revelaram que no GC1 (Figura 8), o córtex dos lobos do timo estava, como já era esperado, mais intensamente marcada pela hematoxilina, uma vez existir nessa região uma alta e densa população de linfócitos T, ou timócitos, células com núcleo exibindo cromatina condensada (Figura 8B-C). Ao contrário, observou-se na região medular, porção central dos lobos tímicos, menor agregado dessas células, e consequentemente marcação menos intensa pelos corantes utilizados, do que o observado na região cortical (Figura 8B, 8D).

O núcleo dos linfócitos medulares, também se apresentaram arredondados, com limites bem definidos, estando, porém, alguns deles com cromatina mais ou menos condensada e, o citoplasma intensamente corado, contrapondo aquelas células que possuíam no núcleo a cromatina mais dispersa e o citoplasma menos marcado, sinalizando ser essas diferenças provavelmente devidas aos diferentes estágios de diferenciação e maturação do mesmo tipo celular (Figura 8D).

Ademais, principalmente na região medular, pode-se identificar as células reticulares epiteliais tímicas, cujas características incluem tamanhos maiores que os próprios linfócitos, núcleos com cromatina dispersa e fracamente corado, assim como o próprio citoplasma das mesmas (Figura 8D).

Historicamente, a marcação para proteínas totais também deixou claro, na região cortical do lobo, a delimitação de cada célula, com núcleos e citoplasma reagindo positivamente ao corante Azul de Bromofenol (Figura 8E). Na região medular, além das células tímicas, ficou evidente a presença das células reticulares, bem maiores do que as tímicas e fracamente positivas para o corante aplicado (Figura 8F). Foram observados fragmentos celulares, provavelmente de células em apoptose, onde regiões fortemente marcadas ficaram evidentes, sugerindo serem núcleos ou fragmentos de núcleos apoptóticos, típicos desta região (Fig. 8F).

4.2.2 Grupo Controle (Etanol)

Figura 9 – Esquema e secções histológicas mostrando a localização do Timo no animal, bem como os resultados histológico e histoquímicos (fotomicrografias) dos animais expostos ao Etanol.

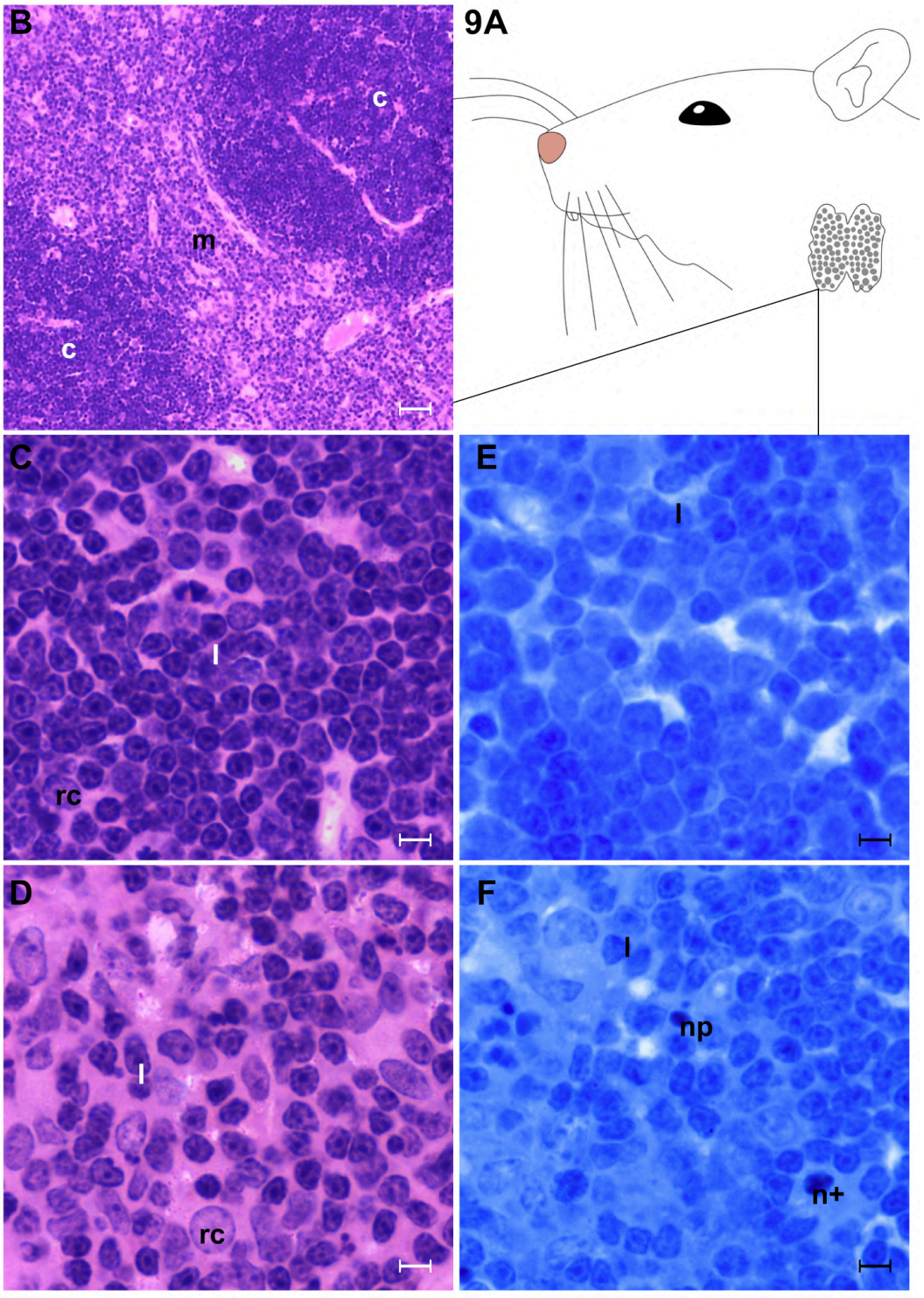


Figura 9: Esquema e secções histológicas e histoquímicas do timo: B-F = **GC (Etanol)**. Barras de escala: B = 200 µm; C-F = 20 µm.
Legendas: c (córtex), m (medula), l (linfócitos), n (núcleo), n+ (núcleo mais corado), rc (célula reticular), np (núcleo picnótico).

No grupo controle exposto ao etanol 30% (GC2), aqui utilizado como solvente do extrato da *C. sativa*, observou-se características histológicas bastante similares àquelas do CG1, em ambas as regiões (cortical e medular) (Figura 9B); ou seja, forte marcação nas células da porção cortical (Figura 9C) e um menor agregado de células na porção medular (Figura 9D).

No teste para detecção de proteínas totais a partir do corante Azul de Bromofenol, observou-se praticamente as mesmas características do GC1 (Água Destilada), porém as células da região medular reagiram com mais forte positividade ao corante empregado (Figura 9F) quando comparadas às células da região cortical (Figura 9E).

4.2.3 Grupo Tratado com o extrato da *C. sativa* (2,5 mg/mL)

Figura 10 – Esquema e secções histológicas mostrando a localização do Timo no animal, bem como os resultados histológico e histoquímicos (fotomicrografias) dos animais expostos ao extrato da *C. sativa* (2,5 mg/mL).

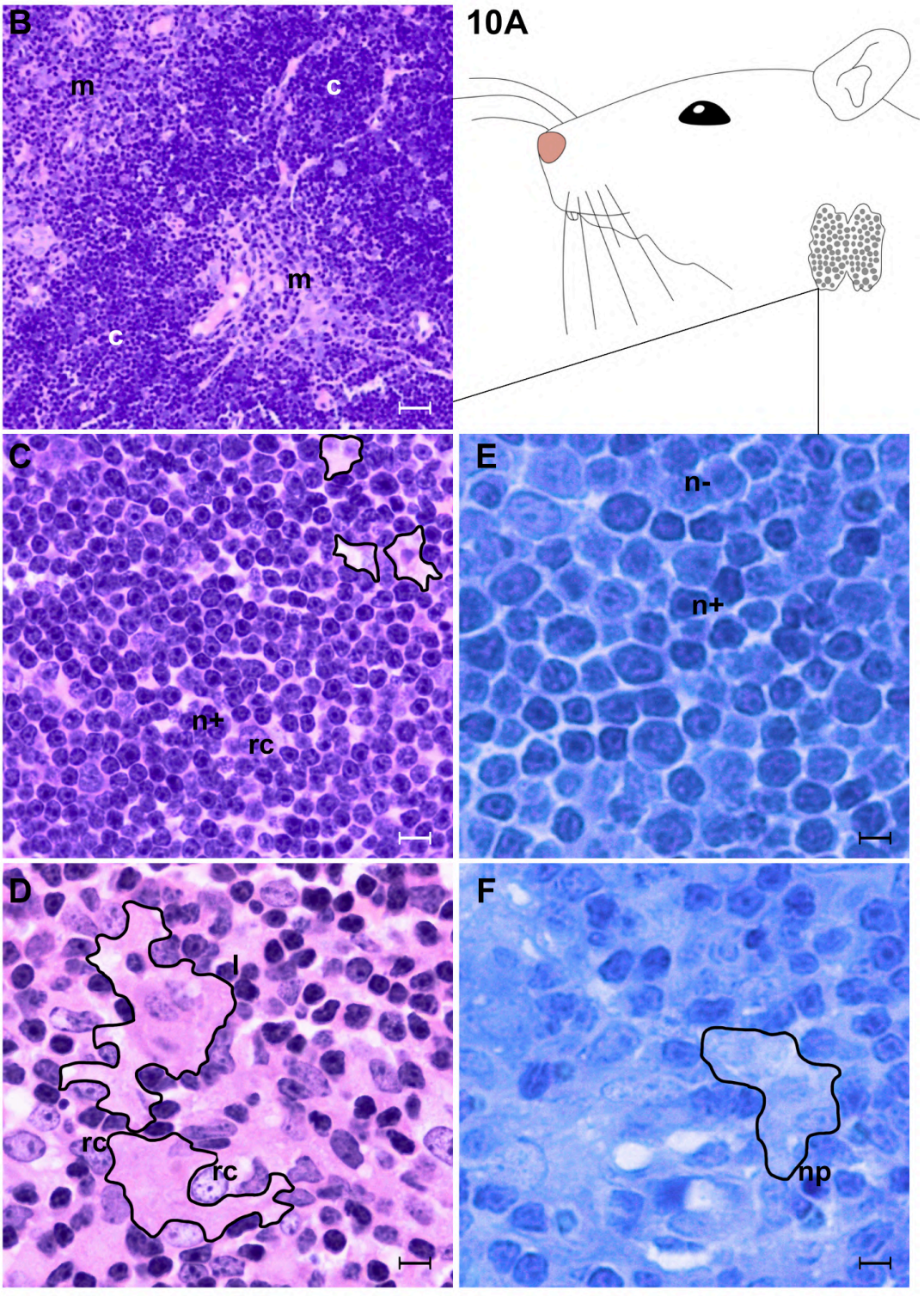


Figura 10: Esquema e secções histológicas e histoquímicas do timo: B-F = **GT (2,5 mg/mL)**. Barras de escala: B = 200 µm; C = 50 µm; D-F = 20 µm.
Legendas: c (córtex), m (medula), n- (núcleo menos corado), n+ (núcleo mais corado), rc (célula reticular). Símbolos: traço contínuo (espaços intercelulares).

No grupo exposto a 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT1), o timo mostrou-se morfologicamente semelhante à região cortical dos grupos anteriores, porém, na região medular, pode-se observar espaços corados pela eosina, que sugeriram estar preenchidos por tecido conjuntivo, provavelmente devido a morte de linfócitos (Figura 10B, 10D). Na região medular, ficou evidente o aumento das células reticulares, grandes e fracamente marcadas pela HE, com seus núcleos e nucléolos também evidentes (Figura 10D). No córtex do timo foram observadas zonas com aumento da densidade linfocitária, resultado da agregação de linfócitos, cujos núcleos foram intensamente marcados pela hematoxilina (Figura 10B-C). Já na região medular, extensas populações de linfócitos foram encontradas, que ao contrário da zona cortical, estavam compostas por células com tamanhos variados, sinalizando provavelmente que estivessem em vários estágios de maturação (Figura 10D).

A histoquímica mostrou resultados semelhantes àqueles dos grupos anteriormente descritos, com exceção da região cortical, onde foram detectadas células com núcleo maior e com menor positividade ao Azul de Bromofenol, indicando uma variação de conteúdo proteico nestas células (Figura 10E). A região medular, por sua vez, demonstrou um menor agregado de células, resultando em espaçamentos maiores entre as células (Figura 10F).

4.2.4 Grupo Tratado com o extrato da *C. sativa* (10 mg/mL)

Figura 11 – Esquema e secções histológicas mostrando a localização do Timo no animal, bem como os resultados histológico e histoquímicos (fotomicrografias) dos animais expostos ao extrato da *C. sativa* (10 mg/mL).

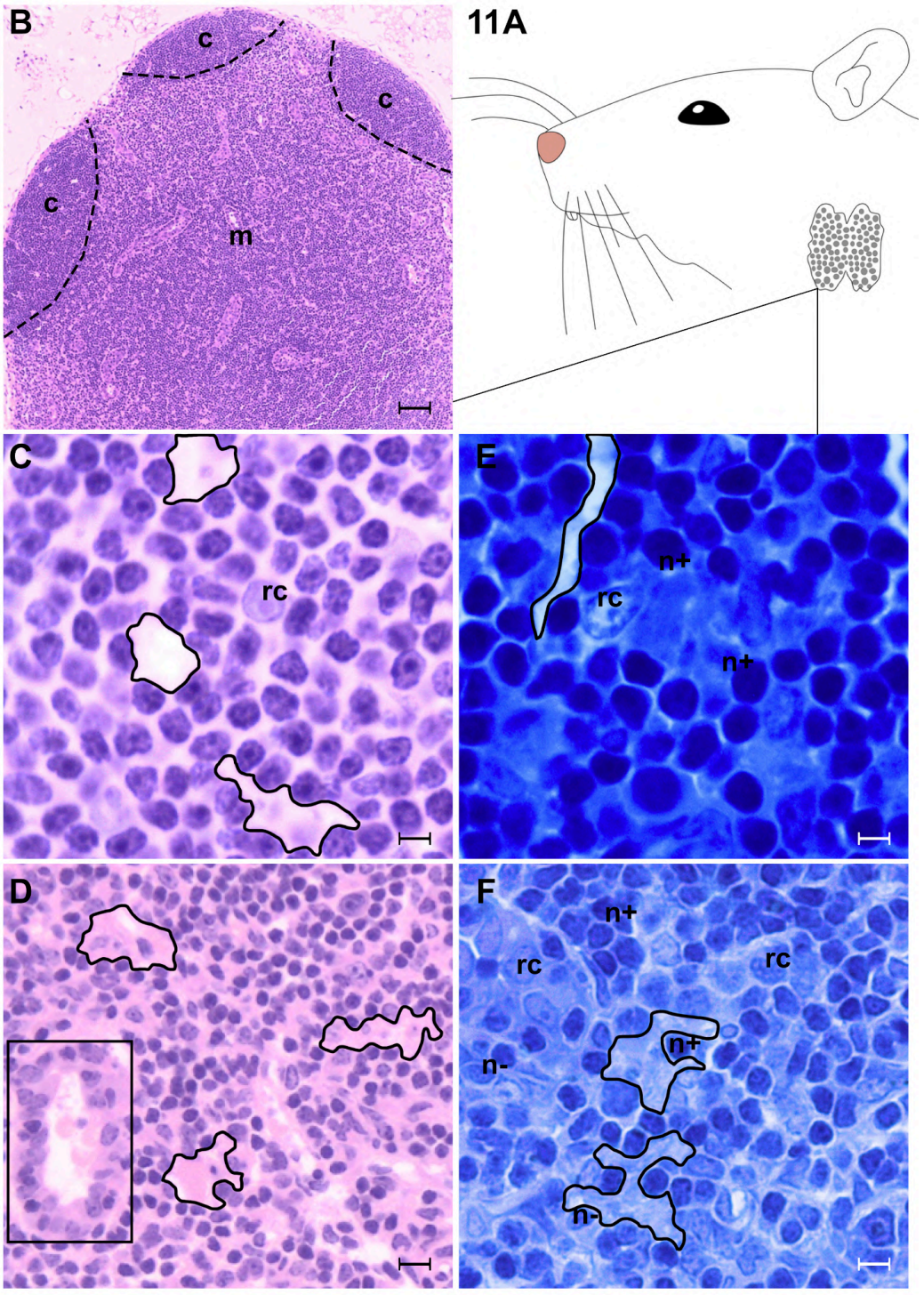


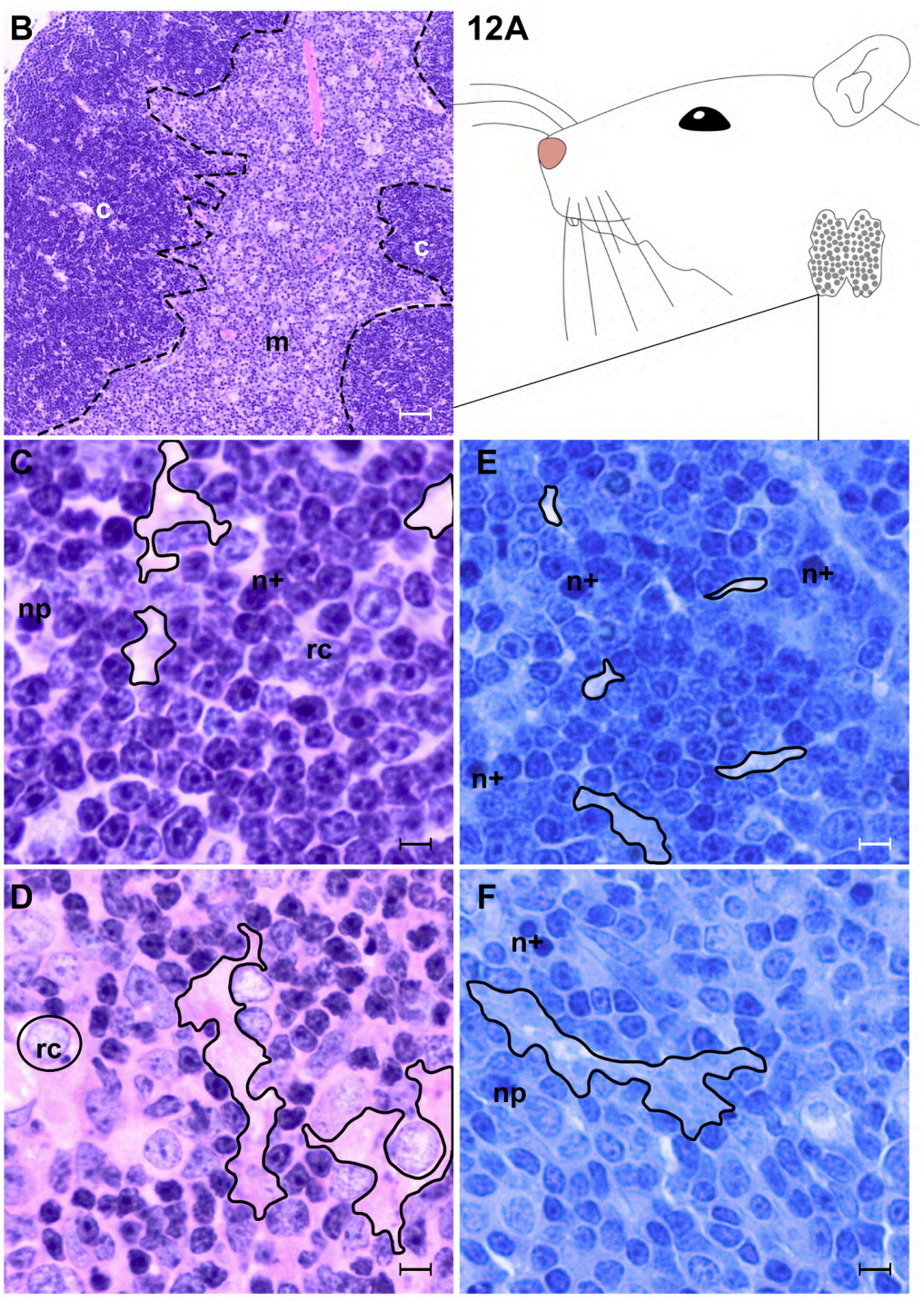
Figura 11: Esquema e secções histológicas e histoquímicas do timo: B-F = **GT (10 mg/mL)**. Barras de escala: B = 200 µm; D = 50 µm; C, E-F = 20 µm.
Legendas: c (córtex), m (medula), n- (núcleo menos corado), n+ (núcleo mais corado), rc (célula reticular). Símbolos: traço contínuo (espaços intercelulares), tracejado (morfologia do córtex), retângulo (vaso sanguíneo).

No grupo exposto ao extrato a 10 mg/mL (GT2) do extrato da *C. sativa*, a histologia mostrou total desorganização da morfologia normal do timo (Figura 11B). Observou-se maior concentração de células linfocitárias, principalmente nas bordas do córtex tímico, formando um recorte composto por células fortemente marcadas, desorganização essa que provocou uma redistribuição das células na arquitetura do órgão, ou seja, a zona medular passou a ocupar uma área muito mais extensa do lobo, do que aquelas observadas nos grupos anteriormente descritos (Figura 11B). Ainda na medula do timo, foi possível visualizar áreas de diferenciação celular circundadas por vasos sanguíneos, inclusive com hemácias no seu interior (Fig. 11D). No córtex, observou-se espaços intercelulares, possivelmente devido a apoptose de células no local (Figura 11C).

A histoquímica para detecção de proteínas totais revelou na região cortical, ou seja, a região com a forma de recortes, a presença de linfócitos muito mais fortemente corados se comparado com o grupo anterior, expostos a 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa*, além da presença de espaços entre as células que não estavam marcados pelo corante (Fig. 11E). Assim como no córtex, a região medular também mostrou a presença de células mais fortemente marcadas para proteínas, entremeadas por outras coradas com menor intensidade, além da presença de células células reticulares no local (Fig. 11F).

4.2.5 Grupo Tratado com o extrato da *C. sativa* (20 mg/mL)

Figura 12 – Esquema e secções histológicas mostrando a localização do Timo no animal, bem como os resultados histológico e histoquímicos (fotomicrografias) dos animais expostos ao extrato da *C. sativa* (20 mg/mL).



Legenda: Esquema e secções histológicas e histoquímicas do timo: B-F = **GT (20 mg/mL)**. Barras de escala: B = 200 µm; C-F = 20 µm.
Legendas: c (córtex), m (medula), n+ (núcleo mais corado), np (núcleo picnótico), rc (célula reticular). Símbolos: traço contínuo (espaços intercelulares), tracejado (morfologia do córtex), círculo (célula reticular com núcleo extravasado).

Nos animais do grupo exposto a 20 mg/mL do extrato de *C. sativa* (GT3) a disposição dos linfócitos formando um recorte na borda do lobo não foi mais observada, sugerindo que o órgão não tenha sofrido grandes danos morfológicos (Fig. 12B). Os agregados de linfócitos na região cortical ficaram bem marcados pelos corantes histológicos, e a região medular, parece ter novamente se estendido pelo lobo (Fig. 12B). Na região cortical, as células foram marcadas com forte positividade, e muitas delas sugeriram estar morfologicamente passando por processo de morte, devido a grande presença de células com núcleos picnóticos e já com indícios de fragmentação (Fig. 12C). Essa mesma característica foi também observada nas células reticulares da medula, cujos núcleos tinham ao seu redor pedaços de cromatina, provavelmente originados de fragmentos expulsos no processo de morte celular (Fig. 12D).

Histoquimicamente, as características observadas a partir da coloração por HE, se repetiram na coloração por Azul de Bromofenol, com especial atenção para a região medular do lobo (Figura 12F), na qual a maioria das células foi fracamente corada. O córtex do timo também apresentou espaços intercelulares (Figura 12E).

5 DISCUSSÃO GERAL

Os carrapatos são ectoparasitos de grande importância médica e veterinária (Dantas-Torres et al., 2019). A espécie *Rhipicephalus linnaei*, ou também popularmente conhecida como carrapato-vermelho-do-cão, é vetora de uma série de agentes patogênicos que infectam animais de estimação, especialmente os canídeos (Abreu et al., 2020; Dantas-Torres, 2008; Šlapeta et al., 2022), tendo também o potencial de infestar os humanos (Dantas-Torres et al., 2019; Paguem et al., 2023). Com isso, torna-se imprescindível a busca por estratégias para o seu

controle, que sejam efetivas e ainda seguras para os hospedeiros e outros organismos não-alvo.

Os carrapaticidas que hoje se encontram disponíveis no mercado veterinário possuem, em sua formulação, bases químicas sintéticas, e vêm sendo utilizados, muitas vezes, de modo inadequado, contínuo e, em muitos casos, em superdosagem, podendo, inclusive, acelerar a aquisição de resistência por parte dos carrapatos, dificultando, assim, o controle (Camargo-Mathias et al., 2024; Obaid et al., 2022).

Uma das estratégias recentes propostas para o controle desses ectoparasitas, segundo Camargo-Mathias et al. (2024), é a utilização de extratos obtidos a partir de inflorescências da planta *Cannabis sativa*. Segundo esses autores, diferentes concentrações desse extrato alteraram morfohistológicamente o epitélio cuticular do integumento de fêmeas de *R. linnaei*, e também degenerou precocemente suas glândulas salivares; alterações essas que causaram uma série de prejuízos à sobrevivência do carrapato. Contudo, mesmo mostrando-se como uma alternativa eficaz, em oposição aos carrapaticidas usuais, há ainda a necessidade de se garantir a segurança de sua utilização nos hospedeiros, ou organismos não-alvo, a partir de testes que façam a exposição de potenciais hospedeiros a esses extratos, como realizado no presente trabalho, que expôs camundongos *Mus musculus* ao extrato da *C. sativa*.

Dentro dessa busca por estratégias de controle eficientes contra os ectoparasitas e ainda seguras para os hospedeiros (organismos não-alvo), o presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise histopatológica da parótida, importante glândula salivar, e do timo de camundongos *Mus musculus* expostos à diversas concentrações do extrato da *C. sativa*, fazendo, para tanto, uso de técnicas histológica e histoquímicas, afim de verificar a ocorrência (ou não) de alterações nestes órgãos em função da exposição. Ressalta-se ainda que este trabalho buscou complementar análises que vêm sendo (ou que já foram) realizadas em outros órgãos de camundongos *M. musculus* também expostos ao extrato da *C. sativa*, como a tireóide, o fígado e os rins.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que as células e o tecido como um todo da parótida mantiveram-se íntegros, quando analisado o Grupo Controle, o que já era esperado. A glândula teve sua morfologia preservada, com os ácinos

secretores apresentando células com limites definidos e núcleos preservados, além do sistema de ductos (intercalares e estriados) também não ter apresentado alterações celulares, dados esses que corroboraram os resultados dos Grupos Controle dos estudos de Abd El-Fatah et al. (2024) e de Thomaz et al. (2022), que também analisaram a parótida de roedores sob diferentes condições de exposição, como ao cádmio e à dietas alimentares deficientes em colina e metionina, respectivamente.

Quando aplicou-se o teste histoquímico, para detecção de proteínas, verificou-se que tanto os ácinos (com suas células secretoras) quanto os ductos, não sofreram alterações ou qualquer tipo de desorganização, visto ácinos e ductos (com maior intensidade) terem reagido positivamente. Esses resultados levaram a inferir que, como consequência, o processo de secreção da saliva não foi prejudicado, mantendo assim sua produção inalterada, bem como sua participação nos processos de mastigação e de digestão, dados que corroboraram aqueles de Sposto (1988), referentes ao seu Grupo Controle, que analisou a parótida de ratos expostos aos raios-X para avaliar seus efeitos sistêmicos e cumulativos no órgão. Na aplicação do teste PAS para detecção de polissacarídeos neutros, nossos resultados mostraram que as células secretoras acinares reagiram fortemente devido à presença de mucinas neutras em sua composição, porém, em contraste, as células dos ductos não reagiram, permanecendo negativas ao teste, dados estes que ratificaram aqueles encontrados por Oliveira Júnior (2016) e colaboradores, quando descreveram a morfologia da parótida de cutias e registraram que, assim como o encontrado no presente trabalho, os ácinos glandulares reagiram com positividade ao PAS, confirmando que o processo de síntese e secreção de mucoproteínas e de outros carboidratos neutros na glândula permaneceu inalterado.

Quando fez-se a análise da parótida dos animais expostos ao extrato da *C. sativa* na concentração de 2,5 mg/mL, foram encontradas alterações que incluíram a redução no tamanho das células acinares (e consequentemente dos próprios ácinos), que também passaram a apresentar intensa e acentuada vacuolização citoplasmática, ao contrário do observado no Grupo Controle. Também, diferentemente do GC, a parótida exposta ao extrato apresentou ácinos glandulares com lúmen dilatado e, segundo a literatura, alterações como essas poderiam ter como consequência o preenchimento dos espaços deixados no tecido glandular por

tecido conjuntivo, corroborando os dados encontrados por El-Din & Fattah (2020) e por Abd El-Fatah et al. (2024), quando detectaram alterações morfoestruturais na glândula parótida de roedores expostos à diferentes tipos de compostos tóxicos, como ao óleo de *Nigella sativa* e ao cádmio, respectivamente, o que provocou a modificação na forma dos ácinos (passaram de arredondados para irregulares) e provocou o surgimento de vacuolização no citoplasma das células acinares.

Autores como Santos et al. (2022) demonstraram que a exposição indireta da prole de ratos ao flúor na concentração 50 mg/L aumentou significativamente o diâmetro do ducto das glândulas parótidas, quando comparado aos Grupos Controle de seus estudos. Ainda, Soares et al. (2025), expondo ratos ao benznidazol (100 mg/kg/dia), mostraram a ocorrência de alterações morfológicas na parótida, como atrofia acinar, dilatação dos lúmens dos ductos e desorganização da glândula, corroborando os achados do presente trabalho.

Os testes histoquímicos para detecção de proteínas mostraram que as células acinares muitas vezes tiveram o citoplasma negativo aos reagentes aplicados, mesmo que nas células acinares fosse encontrada secreção armazenada, tanto de origem proteica quanto polissacarídica. Com relação a esses dados, Sposto (1988), em seus estudos, obteve resultados que demonstraram que a parótida de roedores, expostos à agentes tóxicos e/ou radioativos, reage de forma menos intensa, à medida que a exposição ao agente perturbador se intensifica, e os estudos de Salah et al. (2019) mostraram que a parótida de roedores expostos ao MTX (um fármaco antimetabólito usado como quimioterápico e como imunossupressor) apresentou desorganização tecidual, citoplasma das células acinares fracamente corado, núcleos das células acinares deslocados para a periferia devido ao surgimento de vacúolos citoplasmáticos, além de um aumento de tecido conjuntivo no órgão como um todo; dados esses que foram corroborados por aqueles encontrados no presente estudo.

A aplicação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros, evidenciou que as células acinares reagiram fracamente quando comparadas ao Grupo Controle, corroborando dados de Elghamrawy (2015) que, ao analisar a parótida de ratos que receberam dieta líquida, os ácinos também foram fracamente marcados pelo PAS, indicando que houve redução na síntese e secreção de polissacarídeos, em especial aqueles armazenados nos grânulos localizados na porção apical das

células. Da mesma forma, os ductos (intercalares e estriados) não reagiram ao teste, indicando ausência/pouca presença de polissacarídeos nessas estruturas.

De forma geral, os resultados aqui encontrados mostraram que a parótida de animais, em seu estado normal, ou seja, não expostos a agentes tóxicos, reage mais fortemente ao PAS, devido a maior produção de secreção rica em glicoproteínas, porém, quando o animal é submetido a algum tipo de exposição/stress, seja por meio de um composto ou até mesmo de dieta alimentar, a marcação histoquímica nos ácinos e ductos ocorre com menor intensidade, possivelmente devido a menor produção de secreção rica em polissacarídeos.

Assim, diante dos resultados aqui obtidos, ficou evidente que o extrato da *C. sativa,* apesar de ser um potencial carrapaticida, foi tóxico para os animais (simulando hospedeiros de carrapatos) que foram expostos a ele, visto que as análises morfohistológicas da glândula parótida apontaram para a ocorrência de alterações estruturais comprometedoras da função glandular, o que traria, para o animal, danos como perturbação da homeostase na cavidade oral, diminuição na produção/composição e secreção de saliva, prejudicando então a salivação e, consequentemente, a correta deglutição dos alimentos, e ainda trazendo prejuízos em relação ao tamponamento, remineralização do esmalte dentário e lubrificação (Santos et al., 2022), visto que essa glândula possui um papel fundamental na hidrólise e digestão de carboidratos.

Ademais, a parótida possui também um papel secundário de defesa imunológica na cavidade oral, tendo em vista que o tecido conjuntivo dessa glândula salivar contém plasmócitos e linfócitos que secretam IgA, formando um complexo secretor resistente à digestão enzimática (Junqueira e Carneiro, 2023), mostrando que quaisquer perturbações morfoestruturais e/ou fisiológicas podem comprometer uma série de funções desempenhadas pela glândula parótida.

Quando, no presente trabalho, procedeu-se a análise do timo dos animais expostos ao extrato da *Cannabis*, ficou claro que nos Grupos Controle (animais submetidos apenas à exposição à Água Destilada e ao Etanol 30%), não foram observadas alterações morfológicas. O córtex do órgão (mais intensamente corado pela hematoxilina), exibiu alta densidade de linfócitos T, corroborando os dados de Ward, Cherian e Linden (2018), ao contrário do que se observou na região medular, com menor agregado dessas células e, consequentemente, com marcação menos

intensa pelos corantes aplicados. Da mesma forma, essa arquitetura córtico-medular e disposição histológica do órgão foi descrita por Junqueira e Carneiro (2023) e por Maynard e Downes (2019) em animais saudáveis.

As células epiteliais tímicas, que possuem a função de dar suporte (em forma de rede) para as células linfocitárias e estão localizadas majoritariamente na região medular, também não sofreram alterações nos animais dos Grupos Controle. Notou-se também que essas células exibiam núcleos maiores e preservados, e com a cromatina dispersa, se diferenciando dos linfócitos, fato também relatado por Ward, Cherian e Linden (2018) após realizarem estudos anatômicos/histológicos em que compararam a estrutura do timo entre roedores e humanos em condições normais.

A avaliação do timo dos animais expostos à concentração de 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa*, mostrou que a região cortical do órgão manteve a mesma morfologia observada no timo dos animais dos Grupos Controle (Água Destilada e Etanol 30%), ou seja, exibiu uma alta densidade de células T em desenvolvimento, corroborando também os dados obtidos por Pearse (2006) ao estudar a estrutura, função e histologia do timo de animais saudáveis, e contrapondo o achado no presente trabalho em relação às células da região medular desse mesmo grupo, que aqui exibiram menor marcação pela eosina, além de, na matriz tímica, terem surgido pequenos espaços, que sugeriram a ocorrência de morte celular. Ainda na medula, vale ressaltar que os espaços livres (onde antes se encontravam linfócitos) provavelmente indicam que o órgão sofreu, com a exposição ao extrato da *C. sativa*, alterações histopatológicas, como a diminuição da celularidade do timo, sendo esta a alteração mais comumente observada quando esse órgão é exposto à compostos tóxicos (Elmore, 2006; Pearse, 2006). Concomitantemente, os achados histoquímicos aqui relatados, corroboraram aqueles histológicos, uma vez que também evidenciaram a presença desses espaços livres de linfócitos no órgão.

Na avaliação dos animais alocados no GT2 (10 mg/mL de *C. sativa*), também ficou claro, pelos dados obtidos, que houve perda gradual de linfócitos, principalmente na região medular, o que deu lugar a espaços intercelulares, provavelmente também sinalizando uma importante alteração em decorrência da toxicidade direta do extrato sobre os linfócitos, levando-os à morte, dado também obtido por Elmore (2006) que, em seu trabalho, ao expor o timo de roedores à

dexametasona (corticosteróide), concluiu que a diminuição da celularidade linfocitária no timo seria um indicativo de toxicidade. Com efeito, Lins e De Melo (2024) por ocasião da realização de uma revisão a respeito da ação da *C. sativa* sobre o timo de roedores, e a partir da análise dos trabalhos de diversos outros autores, concluíram que o THC (tetrahidrocanabinol) teria potencial para suprimir a proliferação de linfócitos nos roedores, e o CBD (canabidiol) induziria a apoptose dos linfócitos, indicando, assim como no presente trabalho, que a morte celular de linfócitos em decorrência da exposição ao extrato da *C. sativa* deixaria, como consequência, espaços intercelulares ao longo da extensão do órgão.

A aplicação das técnicas histoquímicas no timo dos animais do GT2 confirmou os dados encontrados na histologia, principalmente com relação à presença dos espaços intercelulares da medula tímica. Ressalte-se que alterações dessa natureza também foram descritas em trabalhos realizados por Kerr (1972), ao observar o timo de roedores durante a evolução de tumores em caráter experimental, e por Vieira (2011), quando analisou a atividade imunomodulatória do extrato aquoso de *Bowdichia virgilioides* Kunth (uma espécie vegetal utilizada na medicina popular como tratamento para inflamação, conhecida como sucupira) no timo de camundongos.

Ainda nos animais do GT2, expostos à concentração de 10 mg/mL do extrato da *C. sativa*, observou-se que, na porção cortical do timo, houve uma distribuição completamente anormal das células, traduzida como uma espécie de recorte na borda do órgão, permitindo inferir que alterações morfológicas neste nível seriam capazes de comprometer o desenvolvimento e a maturação dos linfócitos T, uma vez que esses processos se iniciariam no córtex tímico, e essas células posteriormente migrariam e se diferenciariam em timócitos na medula (Lima, 2016). Assim como aqui foi observada a diminuição da extensão cortical do timo, em virtude desse novo rearranjo dos linfócitos e com consequente expansão medular, Lima (2016), após avaliar o timo de roedores durante uma infecção aguda por *Leishmania*, também observou que houve um rearranjo das células no órgão, porém com morfologia diferente daquela aqui encontrada, levando o órgão a uma expansão da região cortical e redução da medular. Em ambos os casos aqui relatados, a migração dos linfócitos do córtex para a medula do timo provavelmente tenha sido prejudicada, bem como a maturação dessas células e sua consequente liberação para órgãos

linfóides secundários, a saber, baço e linfonodos, comprovando que o timo é um órgão altamente sensível à exposição de imunotóxicos e corticosteróides endógenos, sendo os linfócitos corticais especialmente suscetíveis aos xenobióticos (Elmore, 2006).

Por fim, a avaliação do timo dos animais do GT3, expostos à 20 mg/mL do extrato da *C. sativa*, confirmou que nas doses maiores há também maiores consequências quando se refere aos danos morfológicos, muito embora, as alterações que foram aqui observadas diferem daquelas encontradas no GT2 (recorte anormal de células no córtex, aumento da extensão medular). Neste grupo, além das alterações como a ocorrência de espaços intercelulares, também observou-se menores agregados de linfócitos, além de células com núcleo picnótico indicando provável início dos processos de morte celular. Esse tipo de alteração morfológica foi também descrita por Lins e De Melo (2024). Ainda no presente trabalho, detectou-se maior presença de células epiteliais reticulares no córtex tímico (um achado relevante, levando-se em conta que a maior parte dessas células encontra-se na medula) o que dessa forma, inferiu-se que, assim como descrito por Esain et al. (2015), os canabinóides, incluindo THC e CBD poderiam atuar como potenciais moduladores da função tímica e da homeostase do animal.

Cabe ressaltar que os dados obtidos no presente trabalho deixaram claro, em todos os bioensaios realizados, expondo o timo à diferentes concentrações do extrato da *C. sativa,* a ocorrência de espaços intercelulares tanto no córtex quanto na medula do órgão. Esse achado possivelmente reflita uma perda de celularidade decorrente da exposição à *Cannabis*, dado que corroborou os estudos de Pertwee (1974), Baczynsky & Zimmerman (1983), Benevenuto et al. (2016) e Chen et al. (2017), que relataram indução de atrofia tímica por canabinóides, levando à redução do número de células no órgão (atrofia tímica) e justificando o surgimento de espaços intercelulares no tecido. A atrofia tímica é conhecida como sendo um fenômeno que pode ocorrer devido à apoptose de timócitos, perda da arquitetura tímica, perturbações no organismo, ou uma combinação de diversos fatores (Majumdar & Nandi, 2017).

Assim, após as análises aqui realizadas, verificou-se que os efeitos da exposição do timo aos canabinóides podem variar em decorrência de fatores como: tempo de exposição, concentração da amostra da *C. sativa*, tipos de células imunes

envolvidas, entre outros (Maggirwar & Khalsa, 2021). De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo indicaram que o extrato da *C. sativa,* embora sendo um potencial carrapaticida, trouxe ao hospedeiro prejuízos, visto que provocou alterações no timo, interferindo, dessa forma, no sistema imunológico e, consequentemente, na homeostase do hospedeiro.

6 CONCLUSÃO

1- A parótida dos camundongos expostos à 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa* sofreu alterações morfológicas tanto nas células acinares quanto naquelas dos ductos.

2- O timo dos animais expostos à 2,5 mg/mL do extrato, em decorrência da morte celular dos timócitos, passou a apresentar muitos espaços intercelulares no córtex e na medula.

3- O timo dos animais expostos à 10 mg/mL sofreu desorganização tecidual com redução cortical e expansão medular, comprometendo a maturação linfocitária.

4- No timo dos animais expostos à 20 mg/mL observou-se aumento de espaços intercelulares, que foram preenchidos por tecido conjuntivo e a presença de núcleos picnóticos, indicativo de morte das células T.

5- O extrato da *C. sativa* foi tóxico para os camundongos, pois alterou a parótida na exposição à concentração de 2,5 mg/mL e alterou o timo nas exposições às concentrações de 2,5; 10 e 20 mg/mL.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Acesso em: 20 jan. 2025.

ABD EL-FATAH, S. S. et al. Tempol mitigates inflammation, oxidative stress, and histopathological alterations of cadmium-induced parotid gland injury in rats. **Life Sciences**, v. 359, p. 123233, 2024. Acesso em: 27 mai. 2025.

ABREU, M. R. de. Ação in vitro e in vivo do ozônio sobre células de linhagem embrionária (RML-RSE e ISE6) e fêmeas adultas de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* semi ingurgitadas. 2023. Acesso em: 17 dez. 2024.

ARRIVAL. Direção: Denis Villeneuve. Canadá; Estados Unidos: Lava Bear Films; FilmNation Entertainment; 21 Laps Entertainment, 2016. 116 min.

BACZYNSKY, W. O. T.; ZIMMERMAN, A. M. Effects of Δ9-Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol on the Immune System in Mice: I. In vivo Investigation of the Primary and Secondary Immune Response. **Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 1983. Acesso em: 06 jan. 2025.

BENEVENUTO, S. G., DOMENICO, M. D., MARTINS, M. A., COSTA, N. S., DE SOUZA, A. R., COSTA, J. L., TAVARES, M. F., DOLHNIKOFF M., VERAS, M. M. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: An experimental study in mice. **Toxicology**, v. 376, p. 94-101, 2017. Acesso em: 06 jan. 2025.

CAMARGO-MATHIAS, M. I., de LIMA RODRIGUES, M., DA SILVA, O., DE ABREU, M. R., SAPATINI, D. *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): The use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 332, p. 110314, 2024. Acesso em: 17 dez. 2024.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.. Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. São Paulo: EDUNESP, Editora Unesp, 2018. p. 198, 2018. Acesso em: 18 dez. 2024.

CAMPINOTI, S., GJINOVCI, A., RAGAZZINI, R., ZANIERI, L., ARIZA-MCNAUGHTON, L., CATUCCI, M., BOEING, S., PARK, J. E., HUTCHINSON, J.C., MUÑOZ-RUIZ M., MANTI, P. G., VOZZA, G., VILLA, C. E., PHYLACTOPOULOS, D. E., MAURER, C., TESTA, G., STAUSS, H. J., TEICHMANN, S. A., SEBIRE, N. J., HAYDAY, A. C., BONNET, D., BONFANTI, P. Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 6372, 2020. Acesso em: 06 jan. 2025.

CHABER, A. L., EASTHER, R., CUMMING, B., IRVING, R., KEYBURN, A. L., SMART, C., O'HANDLEY, R., LIGNEREUX, L.. *Ehrlichia canis* rapid spread and possible enzooty in northern South Australia and distribution of its vector

Rhipicephalus linnaei. **Australian veterinary journal**, v. 100, n. 11, p. 533–538, 2022. Acesso em: 17 dez. 2024.

CHEN, N. Y., LIU, C. W., LIN, W., DING, Y., BIAN, Z. Y., HUANG, L., HUANG, H., YU, K. H., CHEN, S. B., SUN, Y., WEI, L., PENG, J. H., PAN, S. L. Extract of fructus *Cannabis* ameliorates learning and memory impairment induced by D‐galactose in an aging rats model. **Evidence‐Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 1, p. 4757520, 2017. Acesso em: 06 jan. 2025.

CROCQ, M.. História da *Cannabis* e do sistema endocanabinóide. **Diálogos Clin Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 223-228, 2020. Acesso em: 18 dez. 2024.

CUNHA, E. L. R. da et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017. Acesso em: 21 dez. 2024.

DANTAS-TORRES, F.. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, abr. 2008. Acesso em: 17 dez. 2024.

DANTAS-TORRES, F., FERNANDES M., T., MUÑOZ-LEAL, S., ONOFRIO, V. C., BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks Tick Borne Dis**, p. 101252, 2019. Acesso em: 22 mai. 2025.

DANTAS-TORRES, F., OTRANTO, D. *Rhipicephalus sanguineus* on dogs: relationships between attachment sites and tick developmental stages. **Exp Appl Acarol**, v. 53, p. 389–397, 2011. Acesso em: 17 dez. 2024.

DODDS, M. W., JOHNSON, D. A., & YEH, C. K. Health benefits of saliva: a review. **Journal of dentistry**, v. 33, n. 3, p. 223-233, 2005. Acesso em: 27 dez. 2024.

EL-DIN, W. A. N., FATTAH, I. O. A.. Histopathological and biochemical alterations of the parotid gland induced by experimental hypothyroidism in adult male rats and the possible therapeutic effect of Nigella sativa oil. **Tissue and cell**, v. 65, p. 101366, 2020. Acesso em: 27 mai. 2025.

ELGHAMRAWY, T. A. The effect of liquid diet on the parotid gland and the protective role of L-carnitine: immunohistochemical and ultrastructural study. **Folia morphologica**, v. 74, n. 1, p. 42-49, 2015. Acesso em: 06 jul. 2025.

ELMORE, S. A. Enhanced Histopathology of the Thymus. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 656–665, 2006. Acesso em: 27 mai. 2025.

VIRGINIE ESAIN et al. Cannabinoid Receptor-2 Regulates Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development via Prostaglandin E2 and P-Selectin Activity. **Stem Cells**, v. 33, n. 8, p. 2596–2612, 2015. Acesso em: 06 jan. 2025.

GONÇALVES, V. de M., HUERTA, M., FREITAG, R. A.. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. ***Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública***, *3*(1), 14-22. 2016. Acesso em: 18 dez. 2024.

GUILHERME, C. G., SANTOS, A. E. M., DANTAS, A. E. A., MEDEIROS, L. L., OLIVEIRA-FILHO, V. F., PINTO, D. S. *Cannabis sativa* (maconha: uma alternativa terapêutica no tratamento de crises convulsivas. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 2, p. 1-8, 2014. Acesso em: 19 dez. 2024.

GULLA, S., REDDY, M. C., REDDY, V. C., CHITTA, S., BHANOORI, M., & LOMADA, D.. Role of thymus in health and disease. **International Reviews of Immunology**, v. 42, 5th ed., p. 347–363, 2022. Acesso em: 06 jan. 2025.

HERRING, A. C., KAPLAN, B. L. F., KAMINSKI, N. E. Modulation of CREB and NF-κB signal transduction by cannabinol in activated thymocytes. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 4, p. 241-250, 2001. Acesso em: 06 jan. 2025.

HERRING, A. C., KOH, W. S., KAMINSKI, N. E. Inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and nuclear factor binding to CRE and κB elements by cannabinol, a minimally CNS-active cannabinoid. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 7, p. 1013-1023, 1998. Acesso em: 06 jan. 2025.

HONÓRIO, K. M., ARROIO, A., DA SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química nova**, v. 29, p. 318-325, 2006. Acesso em: 19 dez. 2024.

JAEGER, R. G.; FREITAS, V. M. Histologia das glândulas salivares. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. Blucher Open Access São Paulo, BR, p. 227-243, 2016. Acesso em: 27 dez. 2024.

JIMENEZ, A. G., PAUL, K., ZAFAR, A., AY, A.. Effect of different masses, ages, and coats on the thermoregulation of dogs before and after exercise across different seasons. **Veterinary Research Communications**, v. *47*(2), p. 833-847, 2023. Acesso em: 21 jan. 2025.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, v. 123, 1983. Acesso em: 20 jan. 2025.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. p.345. Acesso em: 20 jan. 2025.

KERR, I. B. Atrofia do timo em animais com tumores malignos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 70, p. 167-174, 1972. Acesso em: 06 jun. 2025.

KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2021. p.319. Acesso em: 20 jan. 2025.

LI, X., YE, H., SU, T., HU, C., HUANG, Y., FU, X., ZHONG, Z., DU, X., ZHENG, Y. Immunity and reproduction protective effects of Chitosan Oligosaccharides in Cyclophosphamide/Busulfan-induced premature ovarian failure model mice. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1185921, 2023. Acesso em: 06 jan. 2025.

LIMA, L. R.. Avaliação da hiperplasia tímica e alterações imunopatológicas da medula óssea durante a infecção aguda por Leishmania amazonensis em modelo murino. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Barra do Garças, 2016. Acesso em: 06 ago. 2025.

LINS, M. P., DE MELO, I. S.. Exploring the interplay between cannabinoids and thymic functions. **Toxicological Sciences**, v. 202, 1ª ed., p. 1-12, 2024. Acesso em: 06 jan. 2025.

MAGGIRWAR, S. B.; KHALSA, J. H. The link between cannabis use, immune system, and viral infections. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1099, 2021. Acesso em: 02 jun. 2025.

MAJUMDAR, S.; NANDI, D. Thymic Atrophy: Experimental Studies and Therapeutic Interventions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 87, n. 1, p. 4–14, 28 set. 2017. Acesso em: 04 set. 2025.

MAYNARD, R. L., DOWNES, N.. The Lymphatic System. **Elsevier eBooks**, p. 97–107, 2019. Acesso em: 27 mai. 2025.

MOTA-ROJAS, D., TITTO, C. G., ORIHUELA, A., MARTÍNEZ-BURNES, J., GÓMEZ-PRADO, J., TORRES-BERNAL, F., FLORES-PADILLA, K., FUENTE, V. C., WANG, D.. Physiological and behavioral mechanisms of thermoregulation in mammals. **Animals**, v. *11*(6), p. 1733, 2021. Acesso em: 21 jan. 2025.

NASREEN, N., NIAZ, S., KHAN, A., ZAMAN, M., AYAZ, S., NAEEM, H., KHAN, N., ELGORBAN, A. The potential of *Allium sativum* and *Cannabis sativa* extracts for anti-tick activities against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Experimental and Applied Acarology.** v. 82, n. 2, p. 281 – 294, 2020. Acesso em: 21 dez. 2024.

OBAID, M. K., ISLAM, N., ALOUFFI, A., KHAN, A. Z., DA SILVA VAZ Jr, I., TANAKA, T., ALI, A.. Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 941831, 2022. Acesso em: 17 dez. 2024.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. M., BEZERRA, F. V., CÂMARA, F. V., VALE, A. M. D., OLIVEIRA, G. B. D., SILVA, A. R. D., ... & OLIVEIRA, M. F.. Morfologia das glândulas salivares maiores em cutias (Dasyprocta leporina Linnaeus, 1766). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 227-236, 2016. Acesso em: 28 mai. 2025.

PAGUEM, A.; MANCHANG, K.; KAMTSAP, P.; RENZ, A.; SCHAPER, S.; DOBLER, G.; BAKKES, D. K.; CHITIMIA-DOBLER, L.. Ticks and *Rickettsiae* Associated with

Wild Animals Sold in Bush Meat Markets in Cameroon. ***Pathogens***, v. *12*, n. 2, p. 348, 2023. Acesso em: 17 dez. 2024.

PEARSE, A. G. E.. Histochemistry theoretical and applied, 3 ed. **Livingstone: Churchill**, 214 p., 1985. Acesso em: 15 jan. 2025.

PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicol Pathol**. v 34, 2006. Acesso em: 04 set. 2025.

PETERSEN, J. N.. An experimental and theoretical study of heat transfer and temperature control in the dog. Iowa State University, 1979. Acesso em: 21 jan. 2025.

PERTWEE, R. G. Tolerance to the effect of Δ1‐Tetrahydrocannabinol on corticosterone levels in mouse plasma produced by repeated administration of *Cannabis* extract or Δ1‐Tetrahydrocannabinol. **British Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 391–397, jul. 1974. Acesso em: 04 set. 2025.

PUGAZHENDHI, A., SUGANTHY, N., CHAU, T. P., SHARMA, A., UNPAPROM, Y., RAMARAJ, R., KARUPPUSAMY, I., BRINDHADEVI, K. Cannabinoids as anticancer and neuroprotective drugs: Structural insights and pharmacological interactions—A review. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 9 – 31, 2021. Acesso em: 19 dez. 2024.

REHER, P.. **Anatomia Aplicada à Odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. p.217. Acesso em: 20 jan. 2025.

SALAH, S. et al. Oxidative Stress Changes Induced by Methotrexate on Parotid Gland Structure of Adult Male Albino Rat: Can Vitamin C Ameliorate These Changes?. **Cairo Univ**, v. 87, n. 4, p. 2555-2565, 2019. Acesso em: 21 jul. 2025.

SANTOS; K., BITTENCOURT, M., OLIVEIRA, L., et al. Maternal Fluoride Exposure Exerts Different Toxicity Patterns in Parotid and Submandibular Glands of Offspring Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7217–7217, 2022. Acesso em: 21 jul. 2025.

SINGH, B.. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2019. p.96. Acesso em: 21 jan. 2025.

ŠLAPETA, J.; CHANDRA, S.; HALLIDAY, B.. The “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus linnaei*. **International journal for parasitology**, v. 51, n. 6, p. 431-436, 2021. Acesso em: 17 dez. 2024.

ŠLAPETA, J., HALLIDAY, B., CHANDRA, S., ALANAZI, A. D., ABDEL-SHAFY, S. Rhipicephalus linnaei (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 6, p. 102024, 2022. Acesso em: 17 dez. 2024.

SOARES, C.; WATSON, W.; SANTOS, F.; et al. Investigation of the effects of benznidazole on the salivary glands: A biochemical, morphological, and functional approach. **PLoS ONE**, v. 20, n. 6, p. e0317876–e0317876, 2025. Acesso em: 21 jul. 2025.

SPOSTO, M. R. et al. Structural and histochemical considerations of parotid gland from adult rats (Holtzmann) submitted to x-rays exposure. UNESP, Araraquara, SP (Brazil). Faculdade de Odontologia, 1988. Acesso em: 28 mai. 2025.

THAPA, P., FARBER, D. L.. The Role of the Thymus in the Immune Response. **Thorac Surg Clin**, v. 29 (2), p. 123-131, 2019. Acesso em: 06 jan. 2025.

THOMAZ, M. D. S., RIBEIRO, D. A., DOS SANTOS, J. N., NAGAOKA, M. R.. Morphological changes in major salivary glands in mice treated with a choline and methionine deficient diet. **In vivo**, v. 36, n. 5, p. 2243-2247, 2022. Acesso em: 28 mai. 2025.

TREUTING, P. M., DOYLE, S. M., MONTINE, K. S. (Eds.). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2017. Acesso em: 27 fev. 2025.

VIEIRA, L. F. A.. Atividade imunomodulatória do extrato aquoso obtido da casca do caule da Bowdichia virgilioides Kunth no timo de camundongos. 2019. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011. Acesso em: 06 jun. 2025.

VIRGINIE, E.; KWAN, W.; CARROLL, K.J; et al. Cannabinoid Receptor-2 Regulates Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development via Prostaglandin E2 and P-Selectin Activity. **Stem Cells**, v. 33, n. 8, p. 2596–2612, 2015. Acesso em: 5 jun. 2025.

WARD, J. M.; CHERIAN, Sindhu ; LINDEN, Michael A. Hematopoietic and Lymphoid Tissues. **Comparative Anatomy and Histology**, p. 365–401, 2018. Acesso em: 06 jun. 2025.

YEBRA, M., KLEIN, T. W., FRIEDMAN, H. Δ9-tetrahydrocannabinol suppresses concanavalin a induced increase in cytoplasmic free calcium in mouse thymocytes. **Life sciences**, v. 51, n. 2, p. 151-160, 1992. Acesso em: 06 jan. 2025.

ZUARDI, A. W.. History of cannabis as a medicine: a review. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 28, p. 153-157, 2006. Acesso em: 18 dez. 2024.