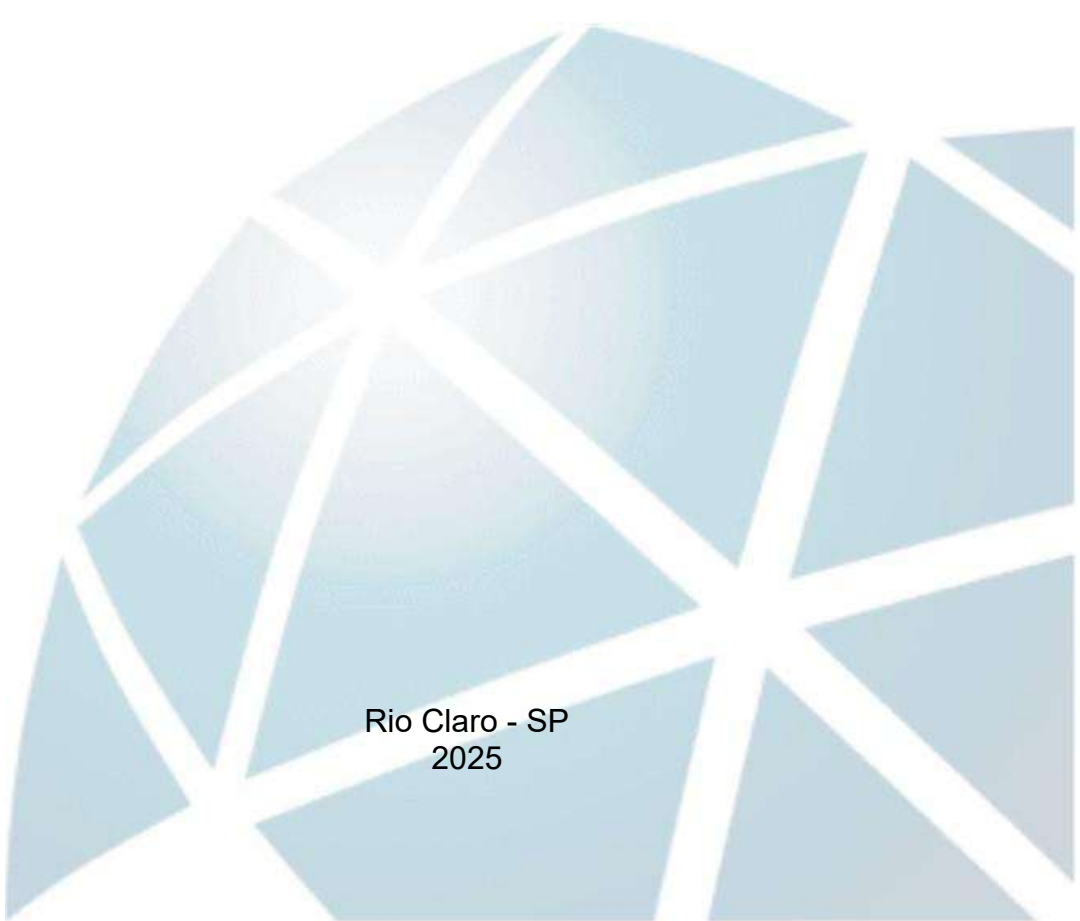




CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TITO MANSILHA DA COSTA MINA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE
CAMUNDONGOS *Mus musculus* AO EXTRATO
DA *Cannabis sativa*: MORFOHISTOLOGIA DOS
RINS E FÍGADO E ANÁLISE CLÍNICA DA URINA**



Rio Claro - SP
2025

TITO MANSILHA DA COSTA MINA

ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* AO EXTRATO DA *Cannabis sativa*: MORFOHISTOLOGIA DOS RINS E FÍGADO E ANÁLISE CLÍNICA DA URINA

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 Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador(a): Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador(a): Milena de Lima Rodrigues

Rio Claro - SP
2025

M663e

Mina, Tito Mansilha da Costa

Estudo dos efeitos da exposição de camundongos *Mus musculus* ao extrato da *Cannabis sativa*: Morfohistologia dos rins e fígado e análise clínica da urina / Tito Mansilha da Costa Mina. -- Rio Claro, 2025

46 p. : il., 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: Milena de Lima Rodrigues

1. Controle. 2. Toxicologia. 3. Morfohistologia. 4. Cannabis sativa. 5. Hepatotoxicologia. I. Título.

TITO MANSILHA DA COSTA MINA

ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* AO EXTRATO DA *Cannabis sativa*: MORFOHISTOLOGIA DOS RINS E FÍGADO E ANÁLISE CLÍNICA DA URINA

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 Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador(a): Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador(a): Milena de Lima Rodrigues

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Maria Izabel Souza Camargo

Prof. Dr. Claudio José Von Zuben

Prof. Dr. Odaiza da Silva

Aprovado em: 10 de novembro de 2025

Documento assinado digitalmente
 TITO MANSILHA DA COSTA MINA
Data: 27/11/2025 09:58:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do discente

Documento assinado digitalmente
 MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Data: 28/11/2025 18:08:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 MILENA DE LIMA RODRIGUES
Data: 01/12/2025 10:14:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) coorientador(a)

Dedico este trabalho à memória de minha prima Amanda e de minha avó Lia. Duas mulheres maravilhosas que lutaram bravamente contra o câncer, mas não puderam testemunhar a conclusão desta jornada. Sua força e legado me inspiram a buscar a realização de um trabalho significativo e que fizesse a diferença.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/01012-7. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP. A conclusão deste Trabalho de Conclusão de Curso representa não apenas uma conquista acadêmica, mas o resultado de um percurso apoiado por pessoas e instituições essenciais, principalmente à Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

Em primeiro lugar, dedico minha profunda gratidão à minha família. Em especial, agradeço ao meu pai Reynaldo, minha mãe Adriana e meu irmão Yago pela base sólida, pelo amor incondicional e pelo suporte constante que me permitiu focar integralmente ao longo de toda a minha vida.

Estendo meus agradecimentos à minha orientadora, a Prof. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, pela confiança em meu potencial, pela orientação técnica rigorosa e pela paciência dedicada, que foram cruciais para a concretização desta pesquisa. À equipe e aos colegas do Laboratório “Brazilian Central of Studies of Ticks Morphology” (BCSTM) — minha coorientadora Milena e aos integrantes Odaiza, Duda, Davy, Marina, Melissa, Bruna e Gerson —, sou grato pelo ambiente de aprendizado e pela colaboração técnica e intelectual, além dos inúmeros cafés e pela amizade construída no meio do caminho.

Aos meus amigos da graduação — Ana Carolina, André, Caio, Catharina, Gabriel Felicio, Gabriel Pennachioni, João Vitor, Leonardo, Lívia, Luiza Helena, Maria Vitória, Natália, Victor Hugo e demais —, pela parceria nos estudos, pelo apoio nos momentos de desafio e pela construção de memórias inesquecíveis.

Um agradecimento especial aos amigos de São Paulo, minha cidade natal — como André, Cau, Davi, Fábio, Felipe Bacal, Felipe Achôa, Henrique, Jade, João Tadeu, Julia, Lucas, Manu, Nina, Otávio, Pedro Pimentel, Rafael, Rodrigo Buscato e Tomás —, cuja amizade e carinho se mantiveram inabaláveis, mesmo à distância, servindo como uma fonte constante de energia.

Aos amigos que compartilharam a moradia e o dia a dia — Carol, Enzo, Fábio Costa, Gabriel Batista, Gabriel Mazzuco, Gabriel Pinto, Giulia, Igor Matheus, Igor Benedito, Jorge, Pedro Gutierrez, Rhuan e Rodrigo Sousa —, pela compreensão, pelas conversas e pelo apoio mútuo, transformando a rotina universitária em uma segunda casa.

Finalmente, sou grato aos companheiros do Basquete da Unesp Rio Claro que trouxeram leveza e equilíbrio à rotina intensa, reforçando a importância do trabalho em equipe e da disciplina.

Agradeço a todos aqueles que, em algum momento, cruzaram meu caminho e contribuíram para o meu crescimento, seja com um incentivo ou um gesto de apoio. O meu sincero muito obrigado a todos que participaram de alguma forma nesta

jornada chamada vida, aos que já tive contato e aos que permanecem ao meu lado. Esta vitória não é solitária; é um testemunho da força da comunidade e da importância de cada elo que compõe esta jornada.

RESUMO

Os carrapatos, reconhecidos como transmissores de doenças, têm sido tradicionalmente controlados por produtos químicos sintéticos que causam problemas ambientais e de resistência. Bioativos de plantas, como os da *Cannabis sativa*, emergiram como alternativas promissoras. Diante do potencial desses extratos de alterar células/tecidos/órgãos dos carrapatos, bem como dos hospedeiros, o presente projeto propôs investigar morfohistologicamente se os mesmos, nas concentrações de 2,5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL (previamente testadas e eficientes contra *Rhipicephalus linnaei*), também alterariam órgãos como os rins e o fígado de camundongos (*Mus musculus*), aqui utilizados como bioindicadores de toxicidade. Os resultados mostraram que na exposição à dose de 2,5 mg/mL, os rins não apresentaram danos significativos, mas o fígado desenvolveu esteatose (hepatócitos com vacuolização citoplasmática e acúmulo de lipídios). À de 10 mg/mL, observou-se nos rins indícios de alterações morfológicas, tais como aumento do lúmen tubular (distal e proximal) e hiperplasia das células epiteliais tubulares. Já no fígado houve progressão do dano observado na concentração de 2,5 mg/mL, e hepatócitos com perda de seus limites, picnose e fragmentação nuclear, indicando morte dessas células. A exposição à maior concentração aqui testada, a saber a de 20 mg/mL, provocou os danos mais severos/extensos em ambos os órgãos; nos rins, ocorreu necrose no tecido, com redução do diâmetro do lúmen tubular e edema intersticial; no fígado, houve desorganização tecidual e esteatose intensas, acompanhadas de morte celular generalizada e fusão nuclear. Os níveis da creatinina urinária dos camundongos, aqui mensurados não sofreram alterações em nenhuma das concentrações testadas. De forma geral, o desenvolvimento do presente trabalho revelou resultados inéditos mostrando que o extrato da planta *Cannabis sativa* atua no controle dos carrapatos com bastante eficiência, porém, os efeitos que o mesmo provoca nos organismos não-alvo (camundongos), incluíram prejuízos hepáticos e renais dose-dependentes, comprometendo a fisiologia de ambos os órgãos, sendo o fígado o mais sensível às exposições.

Palavras-chave: controle, toxicologia, morfohistologia, *Cannabis sativa*, carrapato do cão, hepatotoxicidade.

ABSTRACT

Ticks, recognized as disease vectors, have been traditionally controlled by synthetic chemical products that cause environmental and resistance problems. Plant bioactives, such as those from *Cannabis sativa*, have emerged as promising alternatives. Given the potential of these extracts to alter cells/tissues/organs of ticks, as well as hosts, the present project proposed to morphohistologically investigate whether the same, at concentrations of 2,5 mg/mL, 10 mg/mL, and 20 mg/mL (previously tested and efficient against *Rhipicephalus linnaei*), would also alter organs such as the kidneys and liver of mice (*Mus musculus*), here used as bioindicators of toxicity. The results showed that upon exposure to the 2.5 mg/mL dose, the kidneys did not show significant damage, but the liver developed steatosis (hepatocytes with cytoplasmic vacuolization and lipid accumulation). At 10 mg/mL, signs of morphological changes were observed in the kidneys, such as an increase in the tubular lumen (distal and proximal) and hyperplasia of tubular epithelial cells. In the liver, there was a progression of the damage observed at the 2,5 mg/mL concentration, and hepatocytes with loss of their boundaries, pyknosis, and nuclear fragmentation, indicating the death of these cells. Exposure to the highest concentration tested here, namely 20 mg/mL, caused the most severe/extensive damage in both organs; in the kidneys, tissue necrosis occurred, with a reduction in the diameter of the tubular lumen and interstitial edema; in the liver, there was intense tissue disorganization and steatosis, accompanied by generalized cell death and nuclear fusion. The levels of urinary creatinine of the mice, here measured, did not suffer alterations at any of the tested concentrations. Overall, the development of the present work revealed unprecedented results showing that the extract of the *Cannabis sativa* plant acts in the control of ticks with great efficiency, however, the effects that it causes in non-target organisms (mice) included dose-dependent hepatic and renal damage, compromising the physiology of both organs, with the liver being the most sensitive to the exposures.

Keywords: control, toxicology, morphohistology, *Cannabis sativa*, red dog ticks, hepatotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático de um carrapato.....	16
Figura 2 - Secções histológicas da região cortical do rim de camundongos.....	24
Figura 3 - Secções histológicas do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> (HE e Fosfatase Ácida)	33
Figura 4 - Secções histológicas do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> (Xylidine Ponceau)	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Análise clínica da urina, com valores de creatinina.....	23
Tabela 2 – Alterações morfológicas que foram observadas no tecido hepático de camundongos.....	31
Tabela 3 – Alterações morfológicas que foram observadas no fígado e nos rins de camundongos.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Justificativa	15
1.2 Objetivo Geral	15
1.3 Objetivos Específicos.....	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 Obtenção do extrato da <i>Cannabis sativa</i>	17
2.2 <i>Mus musculus</i>	17
2.3 Coleta da urina e exames laboratoriais das amostras	17
2.4 Análise clínica da urina	18
2.5 Exposição das fêmeas ao extrato da <i>C. sativa</i> via aspersão.....	18
2.6 Análise morfológica dos rins e fígado dos camundongos <i>M. musculus</i>	19
2.7 Coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE).....	19
2.8 Histoquímica	19
2.8.1 Coloração pelo Xylidine Ponceau	19
2.8.2 Detecção da atividade de Fosfatase Ácida	20
2.9 Fotodocumentação	20
3 RESULTADOS	21
3.1 Creatinina	21
3.2 Morfologia dos rins.....	21
3.2.1 Grupos Controle.....	21
3.2.2 Grupo Tratado T1 - (2,5 mg/mL do extrato de <i>C. sativa</i>)	22
3.2.3 Grupo Tratado T2 - (10 mg/mL do extrato de <i>C. sativa</i>)	22
3.2.4 Grupo Tratado T3 - (20 mg/mL do extrato de <i>C. sativa</i>)	23
3.3 Morfologia do fígado	30
3.3.1 Grupos Controle.....	30
3.3.2 Grupo Tratado T1 - (2,5 mg/mL do extrato de <i>C. sativa</i>)	30
3.3.3 Grupo Tratado T2 - (10 mg/mL do extrato de <i>C. sativa</i>)	30
3.3.4 Grupo Tratado T3 - (20 mg/mL do extrato de <i>C. sativa</i>)	31
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos transmitem representam um risco à saúde de humanos e animais de estimação, por serem vetores de vírus, bactérias, protozoários e nematódeos causadores de importantes doenças (Kwak & Nakao, 2025). Os carrapatos têm ganhado nos últimos tempos grande significância médica e na área da saúde, devido também a ocorrência de diversos casos de infecções, registradas em humanos no interior do Estado de São Paulo por diversas espécies, incluindo as do carrapato do cão (*Rhipicephalus linnaei*), a do carrapato-estrela (*Amblyomma cajennense*) e a do boi (*R. microplus*) (Cotes-Perdomo, 2023), todas elas consideradas agressivas quando infestam seus hospedeiros trazendo aos mesmos grandes prejuízos, não só pela espoliação do corpo, mas também pelos danos que causam aos seus derivados, como por exemplo, no caso do carrapato do boi, danos ao couro, leite e carne.

Especificamente o *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826), popularmente conhecido como carrapato-vermelho-de-cão, possui como principal hospedeiro os canídeos, porém já existem registros de infestações ocorrendo em outros animais domésticos e até mesmo em animais silvestres (Šlapeta *et al.*, 2022). *Rhipicephalus linnaei* tem sido considerada uma espécie de grande importância, visto parasitar animais “pets”, os quais hoje em dia convivem com as famílias em seus lares, sendo mesmo considerados como membros delas. A importância do seu parasitismo reside também na transmissão de patógenos que causam diversas doenças, tais como: *Ehrlichia canis* (erliquiose), *Babesia vogeli* (babesiose) e *Hepatozoon canis* (Hepatozoonose) em cães, e *Rickettsia conorii* e a *R. rickettsii* que leva ao desenvolvimento da febre maculosa em humanos (Abreu *et al.*, 2019; Sodelli *et al.*, 2023).

Dessa forma, muitos estudos têm procurado encontrar maneiras eficientes para controlar esses ectoparasitas e, atualmente, os acaricidas químicos sintéticos têm sido a primeira estratégia/opção para eliminação das infestações, os quais, embora eficientes, têm trazido alguns inconvenientes aos organismos não alvos, incluindo-se aqui os próprios hospedeiros, bem como provocado danos ao ambiente em geral, devido ao uso excessivo dessas substâncias o que pode levar a problemas como o surgimento de carrapatos mais resistentes, obrigando a indústria veterinária a formular de tempos em tempos (estima-se que a média é de 5 anos) novos produtos. Tem-se registrado também os altos riscos de toxicidade para os animais hospedeiros e seres humanos (organismos não alvos dessas bases químicas), devido aos resíduos deixados os quais além de provocarem o surgimento de várias patologias, ficam depositados no ambiente poluindo solo e águas (Lima-de-Souza *et al.*, 2023; Tian *et al.*, 2023). Desta forma e diante

desses agravantes, torna-se cada dia mais urgente encontrar-se substâncias que possam controlar esses ectoparasitas, as quais sejam ao mesmo tempo eficientes no seu combate e que não provoquem danos aos organismos não alvos, incluindo os hospedeiros (Abreu, 2023; Gonçalves, Huerta & Freitag, 2016).

Sob essa perspectiva, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com bioativos extraídos de plantas ou mesmo de outros animais. As plantas (medicinais ou não) são ricas fontes de bioativos provenientes do seu metabolismo secundário, e grande parte deles já tem comprovada em laboratório sua ação carrapaticida (Gonçalves, Huerta & Freitag, 2016; Camargo-Mathias, *et al.*, 2018; Lima-de-Souza *et al.*, 2023).

A planta *Cannabis sativa* é hoje considerada uma dessas fontes de bioativos com papel carrapaticida (informação pessoal), visto o extrato de suas inflorescências agirem sobre o epitélio cuticular de fêmeas de carrapatos *R. linnaei* desorganizando-o e provocando nas suas células vacuolização intensa e picnose nuclear, indicativos de que elas estariam passando por processo de morte celular. O mesmo efeito carrapaticida foi observado nas glândulas salivares desses ectoparasitas, quando a exposição ao extrato provocou a total desorganização do órgão, o que as análises histológicas mostraram ser esses, danos irreversíveis (Camargo-Mathias *et al.*, 2024). Além desse potencial carrapaticida recém-descoberto, essa planta também é fonte de muitos bioativos que oferecem diversos benefícios terapêuticos e que vem sendo aplicados na terapia de doenças crônicas, neurológicas, ansiedade, bem como dor neuropática, inflamatória e osteoartrose (Justo & Oliveira, 2022; Reis *et al.*, 2023), além do seu uso recreativo.

A *C. sativa*, é popularmente conhecida como maconha ou “cânhamo da Índia”. É uma planta antiga da família Canabaceae e sua utilização acompanhou a trajetória da humanidade, tendo seu reconhecimento aumentado significativamente desde 2000. Originária da Ásia, existem evidências de seu uso para fins medicinais, industriais e até alimentares, dada a extração do óleo de cânhamo de suas sementes (Reis *et al.*, 2023). Países como China e Índia reconhecem seus benefícios há muito tempo em razão dessa planta ser objeto de estudos há muitos anos. No entanto, no Brasil, seu uso ainda é recente e tem sido limitado pelas agências reguladoras, porém a mesma tem sido indicada pelos seus potenciais benefícios terapêuticos para a saúde, obtidos por meio dos bioativos nela presentes, dentre os quais se destacam os canabinoides Tetrahydrocannabinol (THC) e o Canabidiol (CBD) (Lima, Alexandre & Souza, 2021; Follador, Miketen & Kuchla, 2022).

Em 2017, no Brasil, a ANVISA classificou a *C. sativa* como planta medicinal na “Denominações Comuns Brasileiras (DCB)” através da RDC Nº 156, de 5 de maio de 2017, lista que engloba diversas substâncias e plantas medicinais essenciais para a indústria

farmacêutica nacional. Essa inclusão não alterou as legislações sobre a maconha no país, mas reconheceu oficialmente que a *C. sativa* pode ser utilizada com fins medicinais ou como componente de medicamentos registrados, com base em pesquisas científicas (Brasil, 2017). No mesmo ano, o Mevatyl, um medicamento à base de *Cannabis*, foi aprovado no Brasil para tratar espasmos severos associados à esclerose múltipla (Lima, Alexandre & Souza, 2021). Na sequência das aprovações das agências reguladoras brasileiras, a ANVISA, Resolução RE nº 3.893 de 24 de novembro de 2022, reconheceu a *Cannabis* como planta medicinal. No entanto, apenas a importação de Canabidiol (CBD) é permitida para pacientes com condições crônicas (ANVISA, 2022; Lima *et al.*, 2022). Ressalte-se ainda que mais recentemente os bioativos extraídos da *Cannabis* tem sido utilizados em fármacos ou mesmo em óleos essenciais também no tratamento de animais, e, experimentos já têm demonstrado sua eficiência no controle de patologias como a osteoartrite em cães, diminuindo a dor e aumentando a atividade física desses animais. Em cães com epilepsia idiopática, há redução significativa da frequência das convulsões e controle do comportamento agressivo (Gamble *et al.*, 2018; McGrath *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2022).

Assim, a partir das informações expostas, e visto que apesar da comprovação em laboratório da ação carrapaticida dos extratos das inflorescências da *C. sativa*, ainda não se tem obtido dados de como esses extratos agiriam nos sistemas dos hospedeiros, a presente proposta visa investigar morfohistologicamente qual é a ação dos mesmos sobre os rins e fígado de camundongos (*Mus musculus*), a eles expostos, visto que: os rins são os principais órgãos do sistema excretor tendo a função de manter tanto o volume quanto a composição dos fluidos corporais (plasma sanguíneo e o líquido entre as células nos tecidos) (Junqueira & Carneiro, 2023); o fígado, glândula associada ao sistema digestório, é onde os nutrientes absorvidos são transformados e armazenados para serem posteriormente utilizados por outros órgãos, funcionando como uma conexão entre o sistema digestório e a corrente sanguínea (Junqueira & Carneiro 2023). Assim, pela sua importância ambos os órgãos se tornam bons bioindicadores de danos no corpo dos vertebrados. Além do estudo morfohistológico pretende-se também realizar a análise clínica da urina desses camundongos expostos aos extratos com o objetivo de se verificar se os bioativos da *C. sativa*, quando utilizados como carrapaticidas provocariam efeitos tóxicos/danosos no organismo não-alvo, ou seja, no próprio hospedeiro, sinalizando assim se essa poderia ser uma alternativa para o controle de carrapatos.

1.1. Justificativa

A *C. sativa*, ao longo da história, encontrou aplicação em uma variedade de propósitos, abrangendo desde a obtenção de grãos e fibras até o seu emprego em contextos recreativos, medicinais e rituais (Ren *et al.*, 2019), além da produção de repelentes para insetos (Arthropoda) (Bonini *et al.*, 2018). Para fins medicinais, a planta apresenta propriedades terapêuticas que auxiliam no tratamento de patologias, agindo como anti-inflamatório, antineoplásico, antimicrobiano, analgésico, relaxante muscular e antioxidante (Torres *et al.*, 2023). Apesar dessas informações, na literatura pertinente nota-se uma lacuna significativa de dados provenientes de estudos que mostrem como o emprego de produtos derivados da *C. sativa* podem atuar no controle de ectoparasitas, notadamente no que concerne ao carrapato do cão *R. linnaei* (Audouin, 1826), informação essa que aliada às novas perspectivas quanto à utilização de bioativos extraídos de plantas, impulsionou o desenvolvimento da presente proposta. Os objetivos delineados visam avaliar nesse trabalho quais são os efeitos da exposição do extrato da planta *C. sativa* sobre fêmeas de camundongos *Mus musculus* (escolha essa que se deu em razão do seu comportamento mais dócil, que facilita o manejo e a experimentação), avaliando a interferência desse extrato na morfohistologia e consequentemente na fisiologia dos rins e do fígado.

1.2. Objetivo Geral

Diante da busca por carrapaticidas que sejam efetivos no controle dos ectoparasitas e ofereçam riscos mínimos aos organismos não alvos, o presente projeto tem como objetivo analisar os efeitos da exposição de fêmeas de camundongos *Mus musculus* ao extrato das inflorescências da *C. sativa*, uma vez que já foi comprovado em laboratório por pesquisadores do grupo “Brazilian Central Studies of Ticks Morphology” (BCSTM), estabelecido na Unesp do campus de Rio Claro, que carrapatos do cão *R. linnaei* têm seu integumento e suas glândulas salivares alterados (desorganizado no caso do integumento e degeneradas precocemente no caso das glândulas salivares) em função da exposição (**Figura 1**, Camargo-Mathias *et al.*, 2024).

1.3. Objetivos Específicos

Pretende-se responder à questão que diz respeito diretamente ao hospedeiro, no sentido de se verificar como a exposição dos mesmos aos bioativos da *C. sativa* alteraria:

a) a morfofisiologia dos rins e do fígado, importantes órgãos com papel na filtração de metabólitos (rins) e na eliminação de substâncias tóxicas (fígado);

b) os resultados das análises clínicas da urina desses camundongos expostos, com ênfase na concentração dos metabólitos ureia e creatinina, em decorrência da exposição.

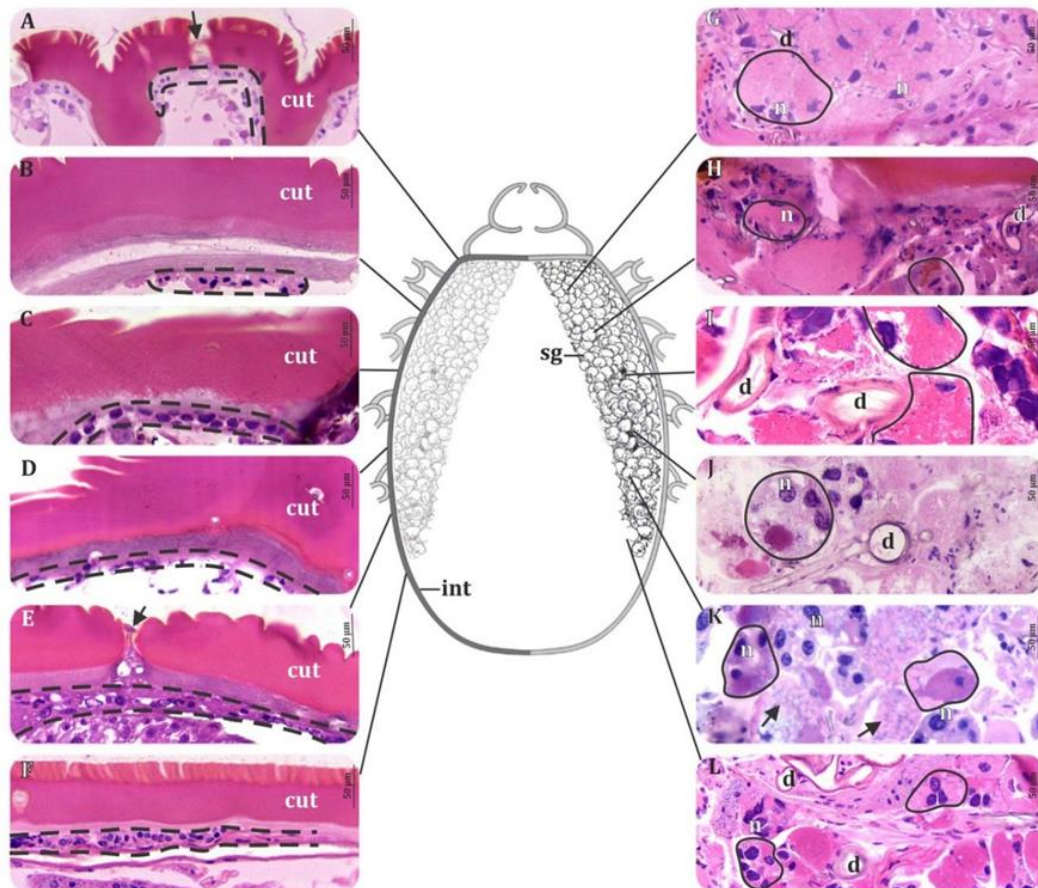
Figura 1: Ao centro, desenho esquemático de um carrapato mostrando a localização do tegumento (int) e das glândulas salivares (sg). A-F: Secções histológicas de tegumento (coradas por HE). G-L: Secções histológicas de glândulas salivares (coradas por HE).

A-L: 40X.

1A: Exposição a água destilada e etanol / 1B: Exposição a concentração de 2,5 mg de extrato de *Cannabis* / 1C: Exposição a concentração de 5,0 mg de extrato de *Cannabis* / 1D: Exposição a uma concentração de 10,0 mg de extrato de *Cannabis* / 1E: Tegumento exposto a concentração de 20,0 mg de extrato de *Cannabis* / 1F: Tegumento exposto a concentração de 40,0 mg de extrato de *Cannabis*.

cut= cutícula; pontilhado = epitélio secretor da cutícula; seta= abertura glandular.

1G: Glândula salivar exposta a água destilada e etanol / 1H: Glândula salivar exposta a concentração de 2,5 mg de extrato de *Cannabis* / 1I: Glândula salivar exposta a concentração de 5,0 mg de extrato de *Cannabis* / 1J: Glândula salivar exposta a concentração de 10,0 mg de extrato de *Cannabis* / 1K: Glândula salivar exposta a concentração de 20,0 mg de extrato de *Cannabis* / 1L: Glândula salivar exposta a concentração de 40,0 mg de extrato de *Cannabis*.



Fonte: Camargo-Mathias *et al.*, 2024

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos aqui apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, Instituto de Biociências, UNESP – Campus Rio Claro), protocolo nº 000405.

2.1. Obtenção do extrato da *Cannabis sativa*

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

O extrato antes de ser utilizado passou por diluições em etanol 30% nas concentrações de: 2.5 mg/mL, 10.0 mg/mL e 20.0 mg/mL (Nasreen *et al.*, 2020), baseadas em estudos prévios realizados com carrapatos da espécie *R. microplus*, e que mostraram eficiência acaricida também em carrapatos *R. linnaei* (**Figura 1**). O extrato nas diferentes concentrações foi borrifado nos camundongos *Mus musculus* cuja metodologia de aplicação segue descrita no item 2.5.

2.2. *Mus musculus*

Dez fêmeas, 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 Instituto de Biociências da Unesp/Rio Claro, em caixas retangulares de polipropileno (30x20x13cm) identificadas (2 animais/caixa) em condições normais de temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e umidade (50%), ventilação apropriada, exaustor, fotoperíodo de 12 horas e alimentadas com ração e água *ad libitum*.

2.3. Coleta da urina e exames laboratoriais das amostras

A coleta da urina das fêmeas, via micção espontânea, foi realizada utilizando-se gaiola metabólica com medidas internas 20cm de diâmetro e 14 cm de altura, confeccionada em alumínio, à prova de fuga e que abrigou os camundongos. Os animais tiveram livre acesso

ao bebedouro e ao comedouro. Antes da realização das coletas, os animais passaram por um período de aclimação de 24h na gaiola metabólica e após, permanecerão por 24h para a coleta de urina, recebendo água e ração comercial marca BioTron *ad libitum* com período de iluminação e escuridão alternados (12h para cada fotoperíodo) durante todo o processo.

A urina coletada foi recolhida em tubo Falcon e refrigerada (2°C – 8°C) até a realização do teste (período menor do que 18 horas) de urinálise em laboratório de análises clínicas veterinárias (item 2.4).

2.4. Análise clínica da urina

A análise clínica foi realizada no Centro de Diagnóstico Veterinário “CediVet”, localizado na cidade de Rio Claro, SP. Os parâmetros físicos, bioquímicos e microscópicos que foram considerados são: cor, odor, número de leucócitos, urobilinogênio, bilirrubina, hemograma, nitritos, pH, densidade, proteína, glicose, corpos cetônicos, além de presença de bactérias e leveduras.

2.5. Exposição das fêmeas ao extrato da *C. sativa* via aspersão

As 10 fêmeas de camundongos *Mus musculus* foram alocadas nos seguintes grupos experimentais:

Grupo Controle Água Destilada (CA): expostas a água destilada;

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

Grupo Tratamento (T1): expostas ao extrato de *C. sativa* na concentração de 2.5 mg/mL;

Grupo Tratamento (T2): expostas ao extrato de *C. sativa* na concentração de 10.0 mg/mL;

Grupo Tratamento (T3): expostas ao extrato de *C. sativa* na concentração de 20.0 mg/mL.

As exposições foram realizadas em 3 dias consecutivos, com intervalos de 24h entre cada uma, utilizando-se frascos sprays esterilizados, segundo protocolo já descrito na literatura pertinente (Brasil, 2015), simulando a aplicação de acaricidas comerciais em animais hospedeiros de carrapatos. Os camundongos foram contidos fisicamente para que fiquem imóveis até o borrifamento dos extratos diluídos, no dorso dos mesmos, evitando assim a exposição do extrato por outras vias, como nariz, boca e olhos. Após cada exposição, os animais foram observados por 14 dias.

No 14º dia pós exposição, todos os indivíduos foram eutanasiados, por superdosagem de analgésicos com cloridrato de ketamina (80 mg/kg MC/IP) e cloridrato de xilasina (20mg/kg MC/IP) e tiveram os rins e o fígado coletados, seguindo protocolo estabelecido por Cunha, (2017).

Os procedimentos de remoção dos órgãos foram realizados pelo veterinário responsável pelo Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB, UNESP - Rio Claro, SP, MS Gabriel Correia de Camargo, CRMV-SP 52730/SP, segundo metodologia indicada pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Os órgãos coletados foram imediatamente fixados em mistura aquosa de Bouin onde permaneceram por 7 dias.

2.6. Análise morfológica dos rins e fígado dos camundongos *M. musculus*

Após a fixação, o material foi lavado em solução tampão fosfato de sódio por 2 vezes, em seguida, desidratado em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 95 %) com intervalos de 30 minutos cada, e logo após, embebido em historesina Leica®. A inclusão ocorreu em moldes plásticos contendo resina+polimerizador que posteriormente foram levados à estufa com temperatura de 37°C até a polimerização da resina. Após esse período, os blocos contendo fragmentos dos órgãos (rins e fígado) foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3 µm de espessura que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas e colocadas para secagem ao ar livre.

2.7. Coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE)

Por esta técnica, é possível avaliar como se encontra a organização do tecido e a integridade das células que dele fazem parte. As lâminas contendo as secções histológicas dos rins e do fígado foram, após a fixação, 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.

2.8. Histoquímica

2.8.1. Coloração pelo Xylidine Ponceau (segundo Guerra, Medeiros Filho & Gallão, 2006, para detecção de proteínas)

As lâminas com fragmentos dos rins e do fígado foram cobertas com ácido acético glacial a 3%, pH 2,5. A coloração com o Xylidine Ponceau ocorreu durante 15 minutos à

temperatura ambiente, seguindo-se a lavagem em ácido acético 3% durante 15 minutos, água destilada por 2 minutos. Após esse processo, foram secas e montadas em Entellan® e lamínulas.

2.8.2. Detecção da atividade de Fosfatase Ácida

Para a realização desta técnica, as lâminas contendo as secções do fígado e dos rins foram incubadas cobertas a 37°C durante 48h na seguinte mistura de solutos: 5mL de soluto Stock I (tampão acetato 0,05M com 1,2g de nitrato de chumbo) e 50 mL de soluto II (soluto glicerofosfato de sódio 3% (0,1M)). Após a incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada durante 30 minutos e posteriormente incubadas em sulfeto de amônio por 2 minutos. Após esse processo, foram lavadas novamente com água destilada e contra-coradas com Hematoxilina. Foram secas em temperatura ambiente até o processo de montagem, rapidamente mergulhadas em xilol e montadas com Entellan® entre lamínula de vidro previamente limpa.

2.9. Fotodocumentação

As lâminas permanentes obtidas 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.

3 RESULTADOS

No presente trabalho estão sendo apresentados os resultados obtidos da exposição de camundongos à diversas concentrações do extrato da *C. sativa*, quando analisado a concentração de creatinina na urina, o tecido renal e hepático dos mesmos.

3.1. Creatinina

Os resultados dos níveis de creatinina um subproduto do metabolismo muscular, considerado como um bioindicador importante da regularidade da função renal (Oliveira, 2019). Os resultados obtidos estão apresentados no **Quadro 1**.

As concentrações de creatinina obtidas com a análise da urina dos animais de todos os grupos estiveram abaixo do valor de referência máximo (**Quadro 1**), o que foi interpretado como um indicativo de que não houve alterações na fisiologia renal em função da exposição a diferentes concentrações da *C. sativa*.

Quadro 1: Análise clínica da urina, com valores de creatinina

Grupos	Creatinina (mg/dL)	Valores de Referência de Creatinina (mg/dL)
CA	0,3	< 1,4
CE	0,3	< 1,4
T1	0,3	< 1,4
T2	0,4	< 1,4
T3	0,3	< 1,4

Fonte: Autor, 2025

3.2. Morfologia dos rins

3.2.1. Grupos Controle

A análise dos camundongos alocados no Grupo Controle Água (CA), como já era esperado, mostrou que a região cortical dos rins desses animais estava íntegra, com a organização tecidual e celular preservada, conforme descrito por Junqueira & Carneiro (2023). Foram identificados os corpúsculos de Malpighi, envoltos por suas respectivas cápsulas de Bowman, estas últimas com epitélio escamoso característico, observado via seus núcleos achatados e bem preservados (**Figura 2A**). Além dessa parte do néfron, também foi possível observar os túbulos contorcidos proximais e distais, os quais exibiram células cúbicas e mononucleadas, organizadas em um epitélio simples, que se manteve preservado (**Figura 2A**).

A análise histoquímica para detecção de proteínas ácidas (Xylidine Ponceau) na região cortical dos rins dos animais dos Grupos Controle (CA e CE), mostrou forte marcação nas alças capilares dos glomérulos e uma reação intensa nas células da cápsula de Bowman. O espaço de Bowman e o lúmen dos túbulos contorcidos distais não foram marcados (**Figura 2B**). Os núcleos das células epiteliais dos túbulos contorcidos, tanto proximais quanto distais, exibiram reação moderada ao corante.

A histologia dos rins no Grupo Controle Etanol (CE), mostrou dados morfológicos que foram semelhantes aos do Controle Água (CA), ou seja, sem indícios de alterações no tecido, indicando que a exposição ao solvente do extrato também não causou danos estruturais a essa região do órgão (**Figura 2B**).

3.2.2. Grupo Tratado T1 - (2,5 mg/mL do extrato de *C. sativa*)

A análise histológica mostrou que a região cortical dos rins desses animais permaneceu íntegra, assim como observado nos Grupos Controle, ressaltando que os corpúsculos de Malpighi puderam ser claramente identificados. No entanto, observou-se a ocorrência de alterações morfológicas, que implicaram na redução do diâmetro do lúmen dos túbulos contorcidos proximais e distais (**Figura 2C**). Além disso, o citoplasma das células dos túbulos proximais apresentou-se mais acidófilo (mais rosada) em relação a dos túbulos distais.

A detecção de proteínas, via teste histoquímico revelou um padrão de marcação semelhante àquele dos Grupos Controle CA e CE, porém, nos glomérulos e nas células dos túbulos contorcidos a marcação foi menos intensa, ou seja, a coloração ficou mais clara, tanto no núcleo quanto no citoplasma. O lúmen dessas estruturas foram observados mais amplos quando comparou-se com aqueles dos animais dos Grupos Controle (**Figura 2C**).

3.2.3. Grupo Tratado T2 - (10 mg/mL do extrato de *C. sativa*)

Os resultados histológicos mostraram alterações no lúmen dos túbulos contorcidos, visto que os mesmos tiveram seu diâmetro reduzido, quando comparou-se com aqueles do Grupo CA. Apesar da preservação da integridade das células epiteliais dos corpúsculos, houve indícios de hipertrofia das mesmas, alteração essa que pode ter contribuído para a diminuição do diâmetro luminal. Ainda que reduzido, esse diâmetro foi maior do que o observado no Grupo T1. Acredita-se também que essa hipertrofia celular possa ter pressionado os corpúsculos de Malpighi, aproximando o glomérulo da cápsula de Bowman o que reduziu o espaço entre essas estruturas (**Figura 2D**).

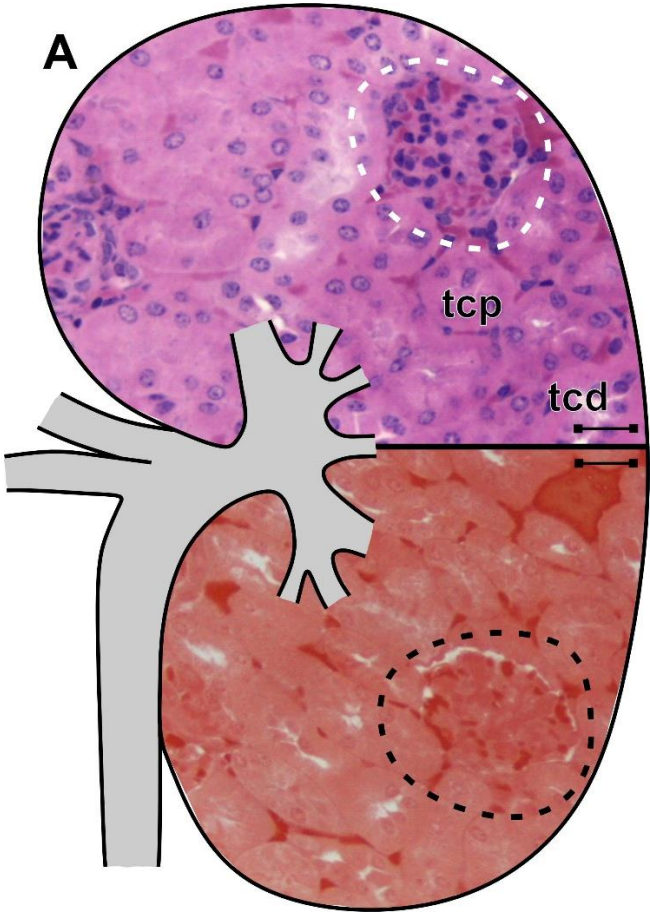
Histoquimicamente a marcação das proteínas foi fortemente positiva nos corpúsculos de Malpighi e nos túbulos contorcidos proximais e distais, com forte alaranjada, o que realçou a extensão das áreas teciduais onde uma desorganização celular se instalou (**Figura 2D**).

3.2.4. Grupo Tratado T3 - (20 mg/mL do extrato de *C. sativa*)

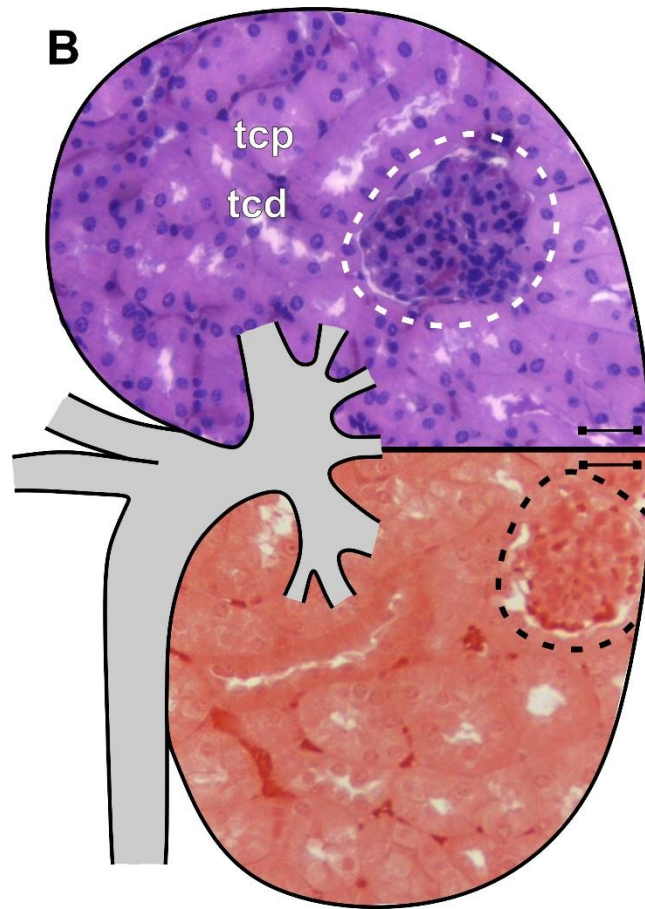
A histologia mostrou que houve uma desorganização estrutural na região cortical dos rins desses animais em função da exposição ao extrato (**Figura 2E**). Foram detectados espaços entre os túbulos contorcidos, o que afetou também a estrutura de alguns corpúsculos de Malpighi, especialmente na cápsula de Bowman (**Figura 2E**). Além disso, verificou-se que houve uma desorganização nos glomérulos, a qual foi detectada via disposição atípica dos núcleos celulares nessas estruturas (**Figura 2E**).

No grupo exposto à maior concentração do extrato de *C. sativa*, a histoquímica dos rins para marcação de proteínas revelou áreas intensamente marcadas, particularmente ao redor dos glomérulos e dos túbulos contorcidos (**Figura 2E**). Os núcleos das células dos túbulos contorcidos apresentaram contornos bem definidos, mas com evidente picnose e nítida marginalização da cromatina (**Figura 2E**).

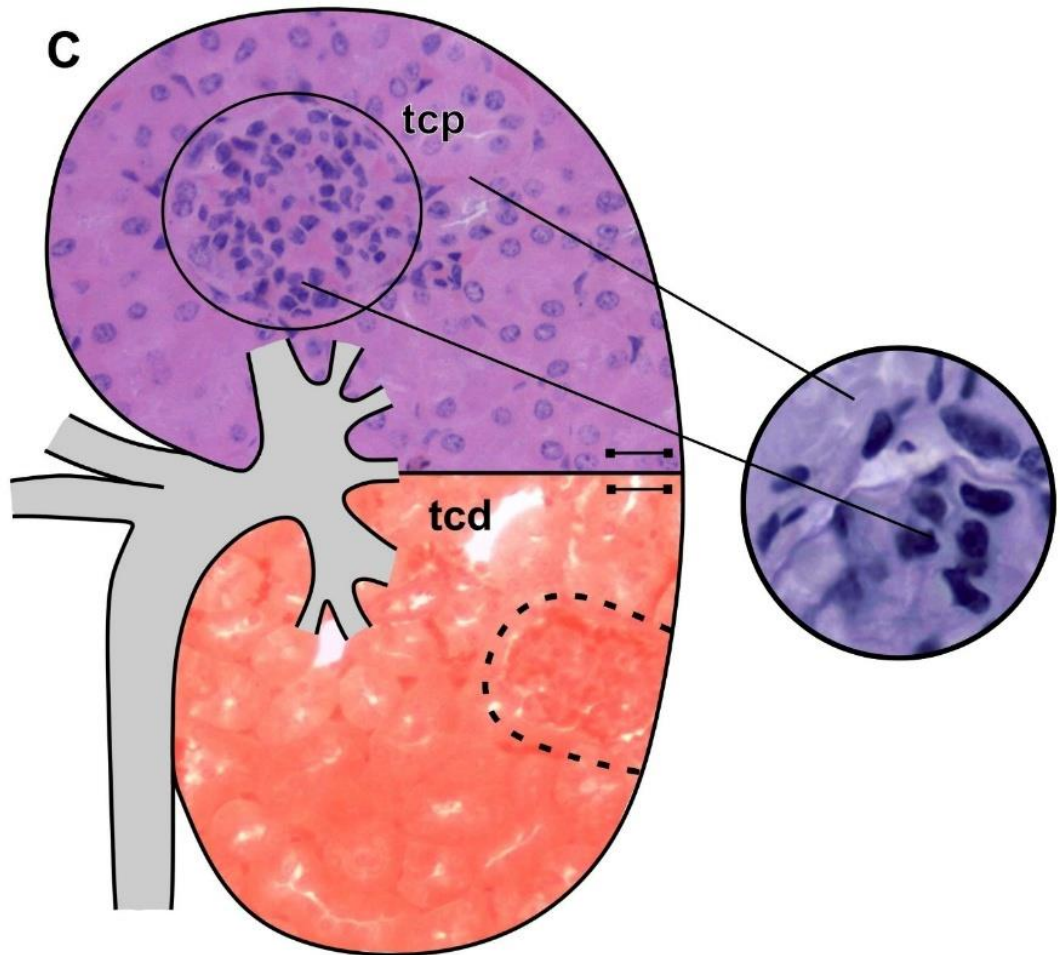
Figura 2: Secções histológicas da região cortical do rim de camundongos *Mus musculus* dos Grupos Controle CA e CE e Grupos Tratamento 1-3. **A** = Grupo Controle CA (água destilada). **B** = Grupo Controle CE (etanol 30%). **C** = Grupo Tratamento T1 (2,5 mg/mL do extrato de *C. sativa*). **D** = Grupo Tratamento T2 (10 mg/mL do extrato de *C. sativa*). **E** = Grupo Tratamento T3 (20 mg/mL do extrato de *C. sativa*). tc = túbulo contorcido; tep = túbulo contorcido proximal; tcd = túbulo contorcido distal; * = edema; tracejado = corpúsculo de Malpighi. Barras: (**A – E**): 50 µm.



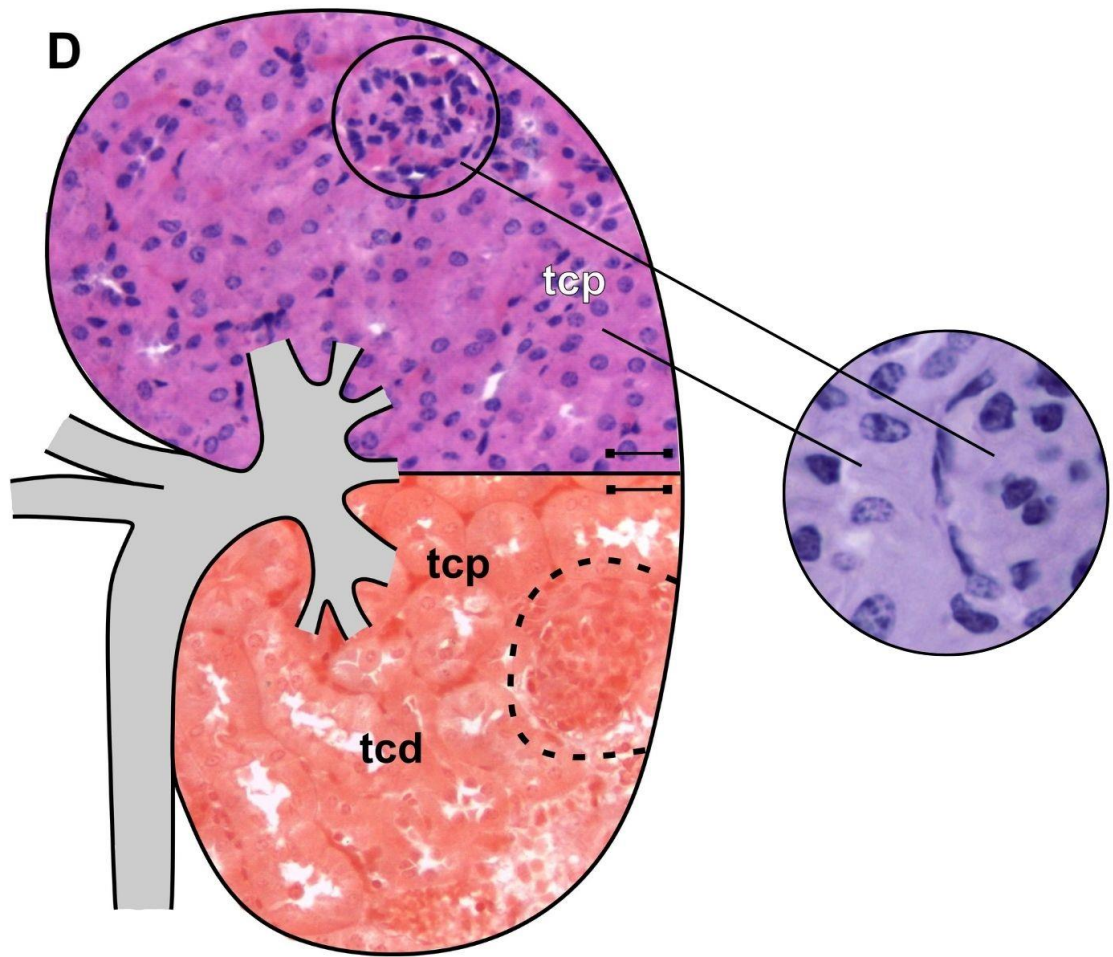
Fonte: Autor, 2025



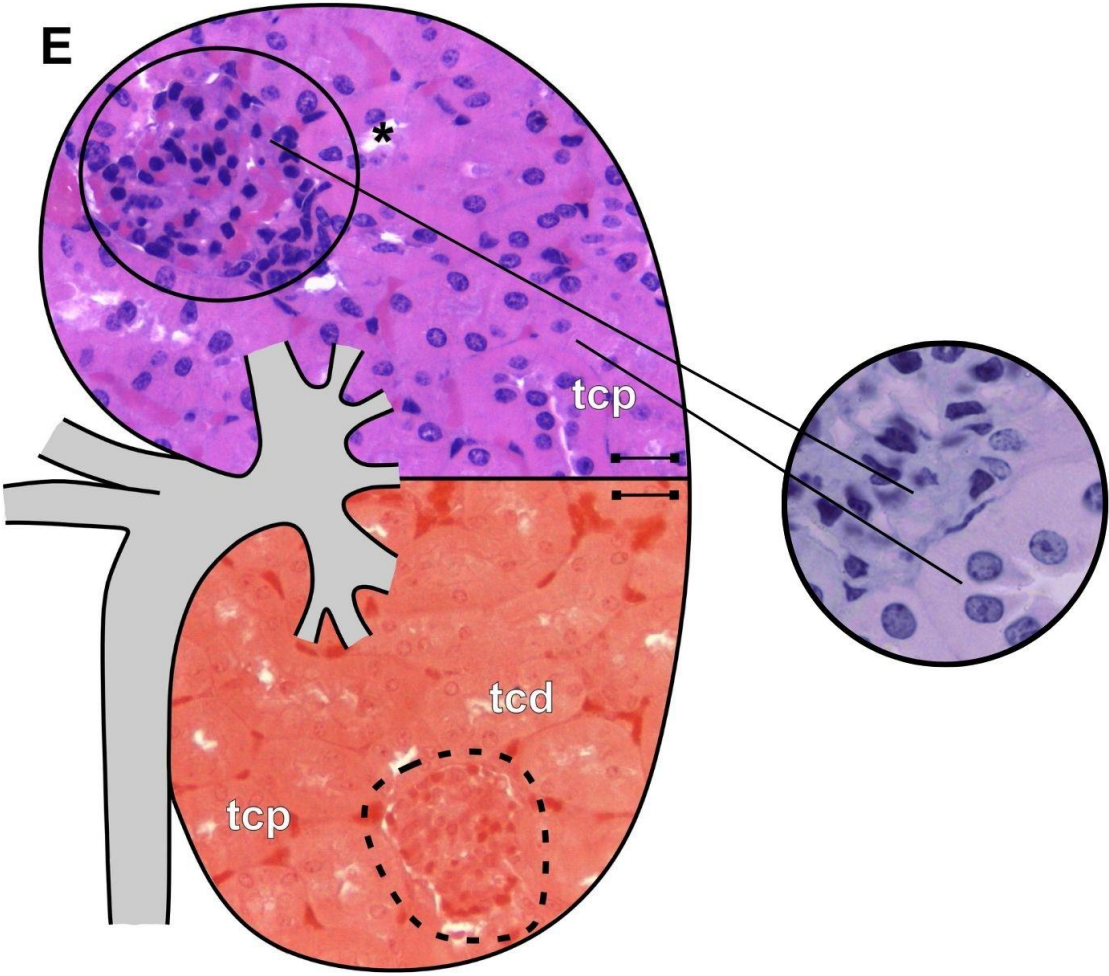
Fonte: Autor, 2025



Fonte: Autor, 2025



Fonte: Autor, 2025



Fonte: Autor, 2025

3.3. Morfologia do fígado

3.3.1. Grupos Controle

Os resultados obtidos das fêmeas de camundongos que foram expostas à água destilada e ao etanol 30% mostraram que não houve alterações no fígado, o que já era esperado e também corroborando os dados descritos por Junqueira & Carneiro (2023) para o órgão em estado morfofisiológico normal. É confirmada a preservação e a integridade do tecido hepático (**Figs. 3A-B e 4A-B**). A histologia mostrou que os hepatócitos se encontraram organizados em cordões celulares dispostos radialmente no interior do lóbulo hepático, partindo da periferia do órgão em direção à veia centrolobular, se interconectando de maneira complexa, formando uma estrutura labiríntica semelhante a uma esponja (**Figs. 3F-G**). Assim como descrito para o órgão em estado normal, os hepatócitos apresentaram-se mono ou binucleados (**Figs. 3A-B**)

Os resultados histológicos também permitiram observar as células de Kupffer, estas possuindo núcleos maiores e com morfologia alongada (**Figs. 3A-B, G e 4A-B**).

3.3.2. Grupo Tratado 1 - (2,5 mg/mL do extrato de *C. sativa*)

A exposição dos camundongos à concentração de 2,5 mg/mL do extrato provocou alterações no tecido hepático que foram observadas sob a forma de vacuolização citoplasmática no hepatócito, bem como um acúmulo de lipídios no tecido em geral indicando aí uma possível ocorrência de esteatose hepática (**Fig. 4C**).

3.3.3. Grupo Tratado T2 - (10 mg/mL do extrato de *C. sativa*)

A exposição dos camundongos à concentração de 10 mg/mL do extrato de *C. sativa* resultou em alterações significantes no tecido hepático, ou seja, observou-se que muitos hepatócitos, apesar de terem mantido sua distribuição de forma radial característica, não puderam ter seus limites evidenciados (**Figs. 3D e 4D**). As células de Kupffer mantiveram seus formatos, tamanhos e proporção semelhantes ao observado nos Grupos Controle e no Grupo T1 (**Figs. 3-4**). Os núcleos dos hepatócitos, embora visíveis, exibiram picnose, ou seja, estavam com a cromatina condensada e consequentemente tiveram seus tamanhos diminuídos (**Fig. 3D**). Além disso, foram observados núcleos em processo de fragmentação (indícios de morte celular) e, outros ainda, com extensa marginalização da cromatina (**Figs. 3D e 4D**). Puderam também ser observados hepatócitos apresentando vacuolização citoplasmática (**Figs. 3D, I e 4D**).

3.3.4. Grupo Tratado T3 - (20 mg/mL do extrato de *C. sativa*)

Ao contrário do observado nos Grupos Controle e nos Tratados T1 e T2, a histologia no tecido hepático de camundongos expostos a concentração de 20mg/mL do extrato da *C. sativa*, revelou alterações importantes na morfologia do tecido, que mostrou clara desorganização de sua estrutura normal, onde os hepatócitos sofreram alterações na sua forma e no seu tamanho (**Figs. 3E e 4E**). Assim como observado no Grupo Tratado 2, os limites celulares dos hepatócitos ficaram pouco definidos (**Figs. 3E e 4E**) e ainda muitos deles com extensa presença de vacúolos, principalmente ao redor dos núcleos (**Fig. 3E**), além da presença de gotículas de lipídeo (sinalizando indícios de esteatose hepática) (**Figs. 3E e 4E**). Ressalte-se que a grande maioria dos núcleos estava com a cromatina totalmente marginalizada, ou condensada ou ainda em processo de fragmentação (**Figs. 3E e 3J**).

A aplicação da técnica histoquímica para detecção de proteínas marcou fortemente as áreas do citoplasma dos hepatócitos, ressaltando a intensa vacuolização (**Fig. 4E**). Além disso, alguns hepatócitos pareciam estar sofrendo fusão dos seus núcleos, quando os mesmos eram binucleados (**Fig. 4E**).

Para melhor compreensão dos resultados aqui obtidos, as alterações encontradas nos Grupos Tratados foram sumarizadas na **Quadro 2**.

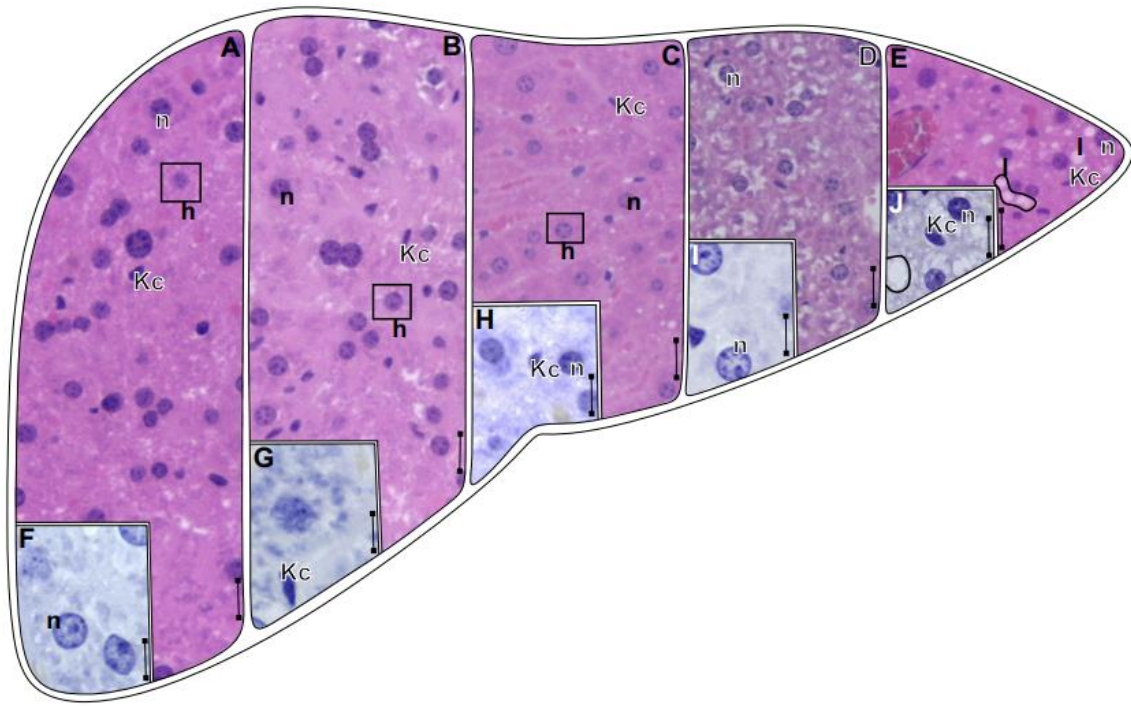
Quadro 2: Alterações morfológicas que foram observadas no tecido hepático de camundongos *Mus musculus* e que foram expostos ao extrato de *C. sativa* em diferentes concentrações.

Parâmetros	Grupo T1 (2,5 mg/mL)	Grupo T2 (10 mg/mL)	Grupo T3 (20 mg/mL)
Presença de vacúolos/lipídio no citoplasma	Alta (++)	Moderada (+)	Muito Alta (+++)
Limites celulares	Preservados (-)	Comprometidos (++)	Muito Comprometidos (+++)
Picnose nos hepatócitos	Ausente (-)	Moderada (++)	Intensa (+++)
Fragmentação dos núcleos dos hepatócitos	Ausente (-)	Alguns indícios (+)	Presente (+++)
Desorganização tecidual	Ausente (-)	Ausente (-)	Extensa (+++)
Fusão Nuclear	Ausente (-)	Ausente (-)	Presente (++)

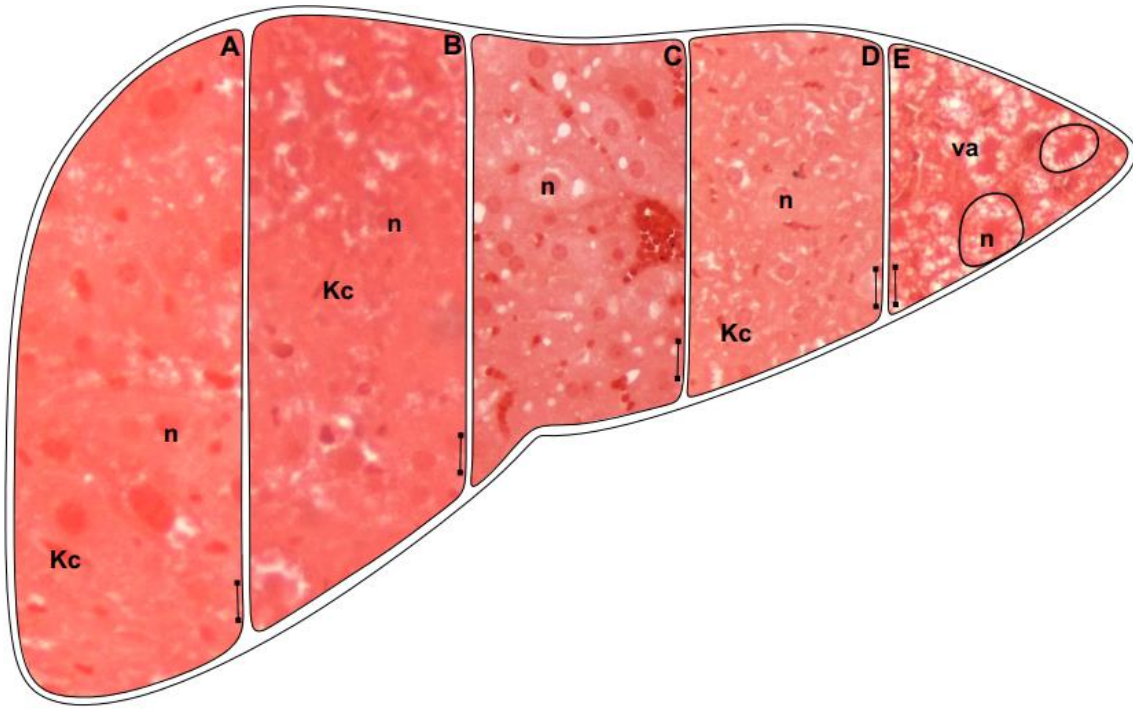
Legenda: (-) Negativo/Ausente; (+) Presente; (++) Pouco presente; (+++) Muito presente.
Fonte: Autor, 2025

Figuras 3 e 4: Secções histológicas do fígado de camundongos *Mus musculus* dos Grupos Controle CA (Água destilada) e CE (Etanol 30%) e dos Grupos Tratamento 1-3. **A/F** = Grupo Controle CA; **B/G** = Grupo Controle CE; **C/H** = Grupo Tratamento T1 (2,5 mg/mL do extrato de *C. sativa*); **D/I** = Grupo Tratamento T2 (10 mg/mL do extrato de *C. sativa*); **E/J** = Grupo Tratamento T3 (20 mg/mL do extrato de *C. sativa*).

Kc: célula de Kupffer; n: núcleo; h: hepatócito; va: vacuolização; I: esteatose (**A – E**): 50 µm.



Fonte: Autor, 2025



Fonte: Autor, 2025

4 DISCUSSÃO

A busca por alternativas de controle de carrapatos, tem sido atualmente o foco de muitas pesquisas, visto que os produtos que vêm sendo comercializados com esse propósito são na sua maioria formulados a partir de bases químicas sintéticas, o que traz aos organismos não alvos, bem como ao meio ambiente, problemas que muitas vezes tornam-se irreversíveis (Lima-de-Souza et al., 2023; Tian et al., 2023). Assim, tentando minimizar esse tipo de dano, estratégias de controle que sejam mais sustentáveis e menos agressivas, vêm sendo pesquisadas e, aqui cabe ressaltar que os bioativos encontrados em diversas plantas, já foram comprovadamente testados em laboratório e se mostraram excelentes carrapaticidas (Abreu, 2023; Gonçalves, Huerta & Freitag, 2016).

Nesse sentido o uso de extratos obtidos a partir de inflorescências da planta *Cannabis sativa* vem demonstrando resultados bastante animadores, o que levou ao desenvolvimento do trabalho em tela que teve como objetivo avaliar se a exposição a diferentes concentrações desse extrato provocaria alterações morfo-histológicas nos rins e no fígado de camundongos *Mus musculus* aqui utilizados como modelos hospedeiros de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (carrapato marrom do cão). Essa abordagem foi de extrema importância, visto que, muito se tem registrado sobre o que os químicos carrapaticidas causam nos carrapatos, mas pouco se sabe quais são seus efeitos nos hospedeiros. Ainda a escolha para análise dos rins e do fígado dos hospedeiros, foi importante, visto que estes órgãos desempenham papéis centrais na homeostase e no metabolismo de xenobióticos, os rins, por serem considerados como os principais órgãos do sistema urinário, sendo responsáveis por manter o equilíbrio hídrico e eletrolítico, além de funções endócrinas e de regulação de proteínas (Junqueira & Carneiro, 2023; Frazier *et al.*, 2012) e o fígado, por ser o principal sítio de biotransformação de compostos, incluindo os canabinoides, tornando-o um órgão altamente suscetível a ação de substâncias tóxicas (Junqueira & Carneiro, 2023).

Os resultados morfológicos dos rins e do fígado, bem como do comportamento da creatinina presente na urina, e que foram obtidos nos bioensaios com os grupos controle, já eram esperados, uma vez que nesse grupo a exposição foi à água destilada e ao etanol 30% o que não trouxe alterações aos órgãos, dados esses que corroboraram aqueles de Porwal, Khan, Maheshwari (2017), que avaliaram o efeito tóxico provocado pela exposição de ratos ao extrato de folhas de *Marsdenia tenacissima*, planta popularmente conhecida como “Rajmahal hemp” (cânhamo de Rajmahal) em inglês e “Marua bel” em hindi. Com relação a creatinina nesses

grupos, os valores se mantiveram em níveis normais (abaixo do valor de referência para a espécie) reforçando a ausência de comprometimento da taxa de filtração glomerular (TFG), um preditor crucial da função renal (Thrall *et al.*, 2022; Alvarez-Argote *et al.*, 2022). Conforme as diretrizes estabelecidas pela National Kidney Foundation, a creatinina sérica (e, por extensão, a urinária, que reflete sua depuração) é um biomarcador fundamental na estimativa da TFG, sendo que níveis dentro da faixa de normalidade são indicativos de função renal preservada (Jones & Lim, 2003).

Quando realizou-se a exposição dos animais aos extratos da *C. sativa*, observou-se que sim, o extrato alterou a morfologia dos rins e do fígado e ainda mais, observou-se uma relação de dose-dependência, visto que muito embora o fígado tenha sido mais sensível à exposição às menores concentrações do extrato (2,5 mg/mL) do que os rins, as concentrações mais altas (10 mg/mL e 20 mg/mL) afetaram mais intensamente ambos os órgãos. Segundo outros trabalhos disponíveis na literatura (Yousef *et al.*, 2010), a toxicidade diferencial entre órgãos e a dependência da dose da substância tóxica, são fenômenos amplamente reconhecidos em estudos com xenobióticos. Nesses estudos, o fígado, devido ao seu papel central no metabolismo dessas substâncias, frequentemente demonstra maior vulnerabilidade à sua ação, ou ainda é o primeiro órgão a ser por elas afetado. Como exemplo, pode-se citar os estudos que avaliaram a toxicidade em ratos, após exposição ao paracetamol, cujos resultados mostraram a ocorrência de alterações histológicas tanto no nível hepático quanto no renal, sendo no hepático consideradas pelos autores como as mais agressivas e que causaram mais lesões (Yousef *et al.*, 2010).

Quando foram obtidos os resultados da creatinina, bem como da histopatologia renal, quando da exposição à concentração mais baixa (2,5 mg/mL) do extrato da *C. sativa*, observou-se que os rins não sofreram alterações estruturais significantes, uma vez que os valores de creatinina mantiveram-se idênticos aos dos grupos controle, o que sugeriu que a TFG (taxa de filtração glomerular) não foi comprometida (Alvarez-Argote *et al.*, 2022). Esses dados também corroboraram aqueles encontrados na literatura em trabalho desenvolvido por Bookout *et al.* (2024) que expôs cães da raça Beagle ao óleo de canabidiol de amplo espectro, com ácido canabidiólico a 5 mg de canabinoides totais/kg de peso corporal/dia, verificando que doses mais baixas de canabinoides seriam bem toleradas pelos cães e não provocariam efeitos adversos nesses animais. De forma similar, a ausência de danos morfo-histológicos renais na exposição às baixas concentrações do extrato também foi observada em estudos com exposição à outras plantas, como na avaliação de toxicidade aguda e subaguda de extrato folhas de pinhão-mansão

(*Jatropha curcas* L.) em camundongos, onde doses subletais de 200 mg/Kg não provocaram lesões histopatológicas no tecido renal (Sawadogo *et al.*, 2018).

Em claro contraste aos efeitos ocorridos no rim, a exposição a essa concentração de 2,5 mg/mL do extrato da *C. sativa*, os resultados obtidos para a histologia do fígado mostraram que esse foi o órgão que sofreu as maiores alterações, visto que os hepatócitos apresentaram vacuolização citoplasmática, bem como presença no tecido de gotículas de lipídios, caracterizando a instalação de um quadro de esteatose hepática, patologia que acarreta no fígado acúmulo anormal de lipídios, principalmente triglicerídeos no citoplasma das células, sendo assim considerado o estágio inicial da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) (Tamaki, Ajmera & Loomba, 2022). Sua importância clínica residiria no potencial de progressão para esteato-hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, destacando-a como precursora das doenças hepáticas graves. Nesse trabalho aqui desenvolvido, os resultados foram semelhantes àqueles encontrados por outros autores que desenvolveram outros estudos e puderam demonstrar que mesmo que a exposição de uma substância tóxica seja em baixa concentração, existe a possibilidade da ocorrência de distúrbios no metabolismo lipídico hepático, resultando na esteatose, assim como é verificado ocorrer em modelos de doença hepática induzida por dieta e por agentes diabetogênicos (Dwivedi & Jena, 2020). No nosso estudo inferiu-se que a esteatose possa ter sido um sinal de estresse metabólico hepático resultante da exposição ao extrato, sem, no entanto, exceto no surgimento de vacuolização citoplasmática, ter levado a danos celulares/teciduais mais extensos.

A avaliação renal depois que realizou-se a exposição dos camundongos ao extrato da *C. sativa* na concentração de 10 mg/mL, mostrou que histologicamente houve um aumento no diâmetro do lúmen dos túbulos contorcidos, bem como hiperplasia das suas células epiteliais, alterações morfológicas estas que provavelmente resultaram, na compressão dos corpúsculos de Malpighi, culminando na redução do espaço que é normalmente encontrado entre a cápsula de Bowman e o próprio glomérulo. Tais achados foram indicativos de uma resposta renal adversa à essa concentração do extrato, corroborando dados semelhantes encontrados por outros autores, que descreveram a ocorrência de alterações renais quando realizaram a exposição de camundongos a agentes sabidamente nefrotóxicos como no caso do fungicida tirame (Paiva *et al.*, 2013). Apesar desses resultados histológicos, a análise dos níveis de creatinina urinária foram pouco variados quando se comparou àqueles obtidos dos grupos controle, para a TFG nos rins, sugerindo que não houve disfunção glomerular grave, ou até caso tenha havido, essa foi mais leve (Alvarez-Argote *et al.*, 2022).

Os resultados revelados quando realizou-se a exposição na concentração de 10 mg/mL, mostraram que no tecido hepático houve uma progressão das alterações, o que permitiu inferir que houve lesão hepática. Notou-se a perda dos limites celulares dos hepatócitos, bem como picnose na maioria dos núcleos, e ainda alguns deles já com indícios de fragmentação, alterações essas que seriam fortes indicativos da ocorrência de dano tecidual e celular irreversíveis (Elmore, 2007). Nesse quadro de lesão hepática severa, como aqui observado, a morte de hepatócitos poderia desencadear complexos mecanismos de resposta no tecido remanescente, incluindo alterações na ploidia celular. Outros trabalhos como aquele desenvolvido por Matsumoto (2022) destacaram que a poliploidia, bem como outras alterações de ploidia em hepatócitos seriam frequentemente observadas em fígados lesionados ou em processos de carcinogênese. Embora a picnose e a fragmentação nuclear sinalizem a eliminação de células danificadas, a resposta do fígado a essa perda celular pode envolver a proliferação de hepatócitos com diferentes níveis de ploidia como parte da regeneração ou de uma adaptação patológica ao estresse crônico que o órgão esteja sofrendo. Esse resultado contrastaria marcadamente com aqueles obtidos para o grupo de exposição à 2,5 mg/mL, onde as alterações mais severas foram aquelas relacionadas à esteatose, sem sinais indicativos de morte celular como picnose ou fragmentação nuclear.

A maior concentração do extrato da *Cannabis* que foi aqui testada, ou seja, a de 20 mg/mL provocou severos danos morfológicos tanto nos rins quanto no fígado dos camundongos expostos, sendo, no entanto, esse último o órgão que exibiu uma desorganização estrutural mais acentuada.

Para a histopatologia renal, os dados da exposição dos camundongos à concentração de 20 mg/mL revelaram a ocorrência de necrose e de alterações consideráveis nas células dos túbulos contorcidos, o que refletiu no lúmen dos mesmos que passaram a exibir diâmetro reduzido. Dados semelhantes foram também obtidos no estudo conduzido por Randjelovic *et al.* (2012), que registraram que houve alterações renais quando da exposição de ratos às concentrações mais altas de gentamicina (antibiótico que inibe a produção de proteínas em bactérias) e ao ácido salicílico (utilizado no alívio de dores e de condições inflamatórias), compostos que servem de modelo de nefrotoxicidade. Outra alteração observada nessa exposição foi encontrada nas células epiteliais dos glomérulos, que embora estruturalmente íntegras, exibiram hipertrofia, uma alteração morfológica que provavelmente contribuiu para a redução do espaço entre a cápsula de Bowman e o glomérulo (espaço de Bowman), pressionando este último contra a cápsula. Esse resultado poderia ser um indicativo da

ocorrência de nefrotoxicidade, o que foi também observado nos rins de camundongos que foram expostos à gentamicina pelos pesquisadores Mahmoud & Farag (2017), os quais registraram que essa substância induziria a ocorrência de alterações histológicas significantes nos glomérulos, bem como nos túbulos renais, alterações essas que incluiriam atrofia glomerular e degeneração tubular, evidenciando assim o efeito tóxico do fármaco sobre a morfologia renal. Por fim, a presença de edema no interstício entre os túbulos contorcidos aqui observada, inferiu a ocorrência de inflamação aguda e lesão tubular renal, achado frequente em nefropatias tóxicas (Frazier *et al.*, 2012).

Clinicamente, a análise de creatinina urinária para os rins dos animais expostos à essa concentração, mostrou a manutenção dos valores que também foram encontrados nos grupos controle. Cabe ressaltar, no entanto, que segundo Alvarez-Argote *et al.*, (2022), esse parâmetro de nível de creatinina sérica poderia ser considerado em camundongos como um marcador ineficaz, o que poderia não refletir completamente a ocorrência ou não de dano tecidual

A desorganização estrutural observada no fígado em função da exposição à concentração mais alta do extrato aqui testada, foi acompanhada de extensa morte de hepatócitos. Dentre os danos observados está aquele referente à disposição dos cordões hepáticos, a qual foi severamente comprometida. Além dessa, os hepatócitos sofreram alterações na sua forma e tamanho, bem como a maioria deles perdeu seus limites e apresentaram vacuolização citoplasmática marcante, também acompanhada da presença de gotículas lipídicas, intensificando os indícios de esteatose hepática severa. Outra importante alteração que foi observada foi com relação a fusão de núcleos observada em alguns hepatócitos binucleados, sugerindo uma resposta patológica severa ou tentativa de reparo de falha segundo Kim *et al.*, (2022). Esse dado obtido corroborou outros encontrados na literatura pertinente que exploraram a poliploidia dos hepatócitos em doenças hepáticas. Conforme destacado por Kim *et al.*, (2022) em sua revisão sobre a poliploidização (processo que pode envolver a fusão nuclear de células binucleadas) de hepatócitos e suas implicações na patogênese de doenças hepáticas, a poliploidização seria uma resposta do fígado à injúria a que o órgão estaria sendo exposto. Embora considerado um mecanismo compensatório para ainda manter a função do órgão em face dos danos, a presença de hepatócitos poliploides ou com fusão nuclear em um cenário de lesão severa, também estaria indicando uma tentativa de reparo, ou uma predisposição a uma sequência de processos patológicos mais graves, incluindo a fibrose e a carcinogênese.

De forma geral, as alterações hepáticas, encontradas na exposição ao extrato da *C. sativa* nessa concentração, sugeriram que o órgão perdeu a capacidade de desintoxicação, permitindo inferir que em altas concentrações, o mesmo, embora ser ainda um eficiente carrapaticida, provoca danos de caráter hepatotóxico. Ogar *et al.*, (2023) realizando estudos que expuseram ratos *Wistar* a altas concentrações de extrato de chá verde, ou popularmente conhecido como chá-da-Índia (*Camellia sinensis*), verificaram que, além da instalação de esteatose no órgão, com gotículas lipídicas distribuídas por todo o tecido hepático, detectou-se também a presença de inflamação leve, patologias que associadas certamente acarretaram na disfunção hepática e no comprometimento do metabolismo do animal exposto.

No **Quadro 3** foram resumidas todas as alterações morfo-histológicas que foram encontradas nos rins e no fígado, durante a execução dos bioensaios que fizeram a exposição de camundongos *Mus musculus* à diferentes concentrações do extrato da *Cannabis sativa*.

Quadro 3: Alterações morfológicas que foram observadas no fígado e nos rins de camundongos *Mus musculus* que foram expostos à água, ao etanol 30% e ao extrato de *C. sativa* (carrapaticida) em diferentes concentrações.

Parâmetro / Órgão / Grupo	Controle (Água / Etanol 30%)	T1 (2,5 mg/mL)	T2 (10 mg/mL)	T3 (20 mg/mL)
FÍGADO				
Integridade Geral	Preservada (-)	Preservada (-)	Desorganizada (++)	Extensamente Desorganizada (+++)
Vacuolização Citoplasmática/ Esteatose	Ausente (-)	Alta (++) / Sugestiva de Esteatose	Moderada (++)	Intensa (+++) / Esteatose Severa
Limites Celulares	Visíveis (-)	Visíveis (-)	Pouco visíveis (++)	Não observados (+++)
Picnose no Hepatócito	Ausente (-)	Ausente (-)	Moderada (++)	Intensa (+++)

Fragmentação Nuclear	Ausente (-)	Ausente (-)	Indícios (+)	Presente (++)
Fusão Nuclear	Ausente (-)	Ausente (-)	Ausente (-)	Presente (++)
RINS				
Integridade Geral	Preservada (-)	Preservada (-)	Comprometida (++)	Severamente Comprometida (+++)
Diâmetro do Lúmen Tubular (Distal e Proximal)	Normal (-)	Normal (-)	Aumentado (++)	Reduzido (+++) / Necrose
Hipertrofia das Células Epiteliais Tubulares	Ausente (-)	Ausente (-)	Presente (++)	Muito Presente (+++)
Comprometimento Corpúsculos de Malpighi/Espaço de Bowman	Ausente (-)	Ausente (-)	Provável Compressão/ Redução Espaço (++)	Compressão/ Redução Espaço (+++)
Edema Intersticial	Ausente (-)	Ausente (-)	Ausente (-)	Presente (+)
Necrose Tecidual Renal	Ausente (-)	Ausente (-)	Ausente (-)	Presente (+)
Comparativo Geral (Órgão mais afetado na exposição a cada uma das doses)	Ambos íntegros	Fígado sofreu maiores alterações do que os rins	Fígado e rins sofreram alterações	Fígado sofreu maiores alterações (desorganização e morte celular maciça) do que os rins (necrose, edema)

Legenda de Intensidade: (-) Negativo/Ausente; (+) Pouco presente; (++) Presente; (+++) Muito presente. Fonte: Autor, 2025

5 CONCLUSÃO

Desta maneira, os dados encontrados no presente estudo, que avaliou o potencial do extrato de *Cannabis sativa* nas concentrações de 2.5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL, por meio da análise morfo-histológica dos rins e do fígado de camundongos *Mus musculus* e análise clínica da urina, demonstraram que:

1. A concentração mais baixa do extrato (2,5 mg/mL) foi melhor tolerada nos rins do que no fígado, não causando nos primeiros danos morfo-histológicos;
2. Nos rins, a concentração de 10 mg/mL do extrato de *C. sativa* induziu surgimento de alterações morfológicas;
3. Na concentração de 10 mg/mL, o extrato de *C. sativa* alterou a morfo-histologia do fígado, e provocou morte de hepatócitos;
4. A exposição à concentração de 20 mg/mL provocou os danos morfo-histológicos mais severos em ambos os órgãos; nos rins, incluindo morte celular, e no fígado, extensa esteatose e morte celular generalizada;
5. As concentrações de 10 mg/mL e 20 mg/mL do extrato foram as mais agressivas para os tecidos renal e hepático;
6. O tecido hepático foi mais sensível à exposição ao extrato de *Cannabis sativa* do que o tecido renal;
7. A creatinina urinária não sofreu alterações nos seus níveis em nenhum dos bioensaios aqui realizados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Marina Rodrigues 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. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia) – IBRC, São Paulo, **Universidade Estadual Paulista (Unesp)**. 2023.
- ABREU, Marina Rodrigues de et al. Immunomodulatory and morphophysiological effects of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, v. 207, p. 36-45, jan. 2019.
- ALVAREZ-ARGOTE, Juliana; DLUGI, Theresa A; SUNDARARAJAN, Teresa; et al. Pathophysiological characterization of the Townes mouse model for sickle cell disease. **Translational research**, v. 254, p. 77–91, 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Resolução RE nº 3.893, de 24 de novembro de 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-novo-produto-de-cannabis-a-ser-fabricado-no-brasil#:~:text=A%20Ag%C3%A2ncia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia,a%20ser%20fabricado%20no%20Brasil>.
- BONINI, Sara Anna et al. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of ethnopharmacology**, v. 227, p. 300-315, 2018.
- BOOKOUT, William et al. Safety study of cannabidiol products in healthy dogs. **Frontiers in veterinary science**, v. 11, p. 1349590, 2024.
- Brasil. Portaria n. 88, de novembro de 2015. Projeto de Instrução Normativa que aprova o Regulamento Técnico Sobre Produtos Antiparasitários de Uso Veterinário, com os critérios e os procedimentos para o registro para efeito de licenciamento para comercialização no País. Órgão Emissor: MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2015-2017/consulta-publica-portaria-sda-no-88-2015-e-projeto-de-instrucao-normativa-aprovando-regulamento-tecnico-dos-produtos-antiparasitarios-de-uso-veterinario>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 156, de 5 de maio de 2017**. Dispõe sobre a lista completa de Denominações Comuns Brasileiras (DCB). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 5 maio 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0156_05_05_2017.pdf
- CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel et al. *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 332, p. 110314, 2024.
- COTES-PERDOMO, Andrea P. et al. Phylogenetic relationships of the *Amblyomma cajennense* complex (Acari: Ixodidae) at mitogenomic resolution. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 3, p. 102125, 2023.
- DWIVEDI, Durgesh Kumar; JENA, G. B. NLRP3 inhibitor glibenclamide attenuates high-fat diet and streptozotocin-induced non-alcoholic fatty liver disease in rat: studies on oxidative

stress, inflammation, DNA damage and insulin signalling pathway. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 393, n. 4, p. 705-716, 2020.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FOLLADOR, Nayla Nathyene; MIKETEN, Paulo Daniel; KUCHLA, Maria Eduarda. USO DE *Cannabis sativa* NO TRATAMENTO DA DOR CRÔNICA, UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Anais do Salão de Iniciação Científica Tecnológica ISSN-2358-8446**, 2022.

FRAZIER, Kendall S.; SEELY, John Curtis; HARD, Gordon C.; et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 4 suppl, p. 14S86S, 2012. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623312438736?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acesso em: 10 jul. 2025.

GAMBLE, Lauri-Jo et al. Pharmacokinetics, safety, and clinical efficacy of cannabidiol treatment in osteoarthritic dogs. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 165, 2018.

GONÇALVES, Victoria de Moraes; HUERTA, Marina; FREITAG, Rogerio Antonio. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 14-22, 2016.

GUERRA, Maria Elane de Carvalho; MEDEIROS FILHO, Sebastião; GALLÃO, Maria Izabel. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorfii* Desf. (*Leguminosae-Caesalpinioideae*). **Cerne**, v. 12, n. 4, p. 322-328, 2006.

JONES, Graham RD; LIM, Ee-Mun. The National Kidney Foundation guideline on estimation of the glomerular filtration rate. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 3, p. 95, 2003.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. Grupo GEN, 2023. E-book. ISBN 9788527739283.

JUSTO, Bárbara Cavalcanti; OLIVEIRA, Thiago Rorato. **A importância e aplicabilidade dos bioativos da *Cannabis sativa* na medicina**. 2022.

KIM, Ju-Yeon et al. Polyploidization of hepatocytes: insights into the pathogenesis of liver diseases. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 391, 2022.

KWAK, Mackenzie L.; NG, Abigail; NAKAO, Ryo. Nation-wide surveillance of ticks (Acari: Ixodidae) on dogs and cats in Singapore. **Acta Tropica**, p. 107536, 2025.

LIMA, Amanda Alves de; ALEXANDRE, Ueslane Coelho; SANTOS, Jânio Sousa. O uso da maconha (*Cannabis sativa* L.) na indústria farmacêutica: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e46101219829-e46101219829, 2021.

LIMA, Tácio de Mendonça et al. Use of cannabis in the treatment of animals: a systematic review of randomized clinical trials. **Animal Health Research Reviews**, v. 23, n. 1, p. 25-38, 2022.

LIMA-DE-SOUZA, José Ribamar et al. The bioactive compound carvacrol as a potential acaricide: An assessment of its effects on the integument of female *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 85, n. 5, p. 1784-1790, 2023.

MAHMOUD, Y.; FARAG, S. Kiwifruit ameliorates gentamicin-induced histological and histochemical alterations in the kidney of albino mice. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 92, n. 5, p. 357-362, 4 jul. 2017.

MAIA, Victorino. **Técnica histológica**. Atheneu, São Paulo, Brasil, 1979.

MATSUMOTO, Tomonori. Implications of polyploidy and ploidy alterations in hepatocytes in liver injuries and cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9409, 2022.

MCGRATH, Stephanie et al. Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 254, n. 11, p. 1301-1308, 2019.

NASREEN, Nasreen et al. The potential of *Allium sativum* and *Cannabis sativa* extracts for anti-tick activities against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 82, p. 281-294, 2020.

OGAR, Faith Onyedikachi et al. Evaluation of the effects of green tea (*Camellia sinensis*) on markers of liver function and liver histology in wistar rats. **Journal of Complementary and Alternative Medical Research**, v. 24, p. 23-34, 2023.

OLIVEIRA, Vitoria Janunzzi de. **Bioquímica sanguínea de cães: creatinina e ureia como biomarcadores da função renal**. 2019.

PAIVA, F. et al. Alterações histológicas dos rins e expressão das metalotioneínas e das proteínas de choque térmico em ratos Wistar após exposição ao fungicida tirame. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 95-102, 2013.

PORWAL, Mayur; KHAN, Najam Ali; MAHESHWARI, Kamal Kishore. Evaluation of acute and subacute oral toxicity induced by ethanolic extract of *Marsdenia tenacissima* leaves in experimental rats. **Scientia Pharmaceutica**, v. 85, n. 3, p. 29, 2017.

RANDJELOVIC, Pavle et al. Salicylic Acid Attenuates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. 1, p. 390613, 2012.

REIS, Luciano Wagner Dórea et al. Utilização da *Cannabis sativa* para tratamento de dor crônica em cães. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 26, n. 1cont, p. 45-58, 2023.

REN, Meng et al. The origins of cannabis smoking: Chemical residue evidence from the first millennium BCE in the Pamirs. **Science advances**, v. 5, n. 6, p. eaaw1391, 2019.

SAWADOGO, S. et al. In vivo evaluation of *Jatropha curcas* L (euphorbiaceae) leaves acute and subacute toxicity in mice. **Journal of Scientific Research**, v. 10, n. 2, p. 187-193, 2018.

ŠLAPETA, Jan et al. *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.

SODELLI, Luís Fernando et al. Fígado e baço de hospedeiros de *Rhipicephalus linnaei* expostos aos acaricidas sintético (afoxolaner) e natural (ésteres do óleo de mamona). Estudo clínico-morfológico comparativo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, p. e004023, 2023.

TAMAKI, Nobuharu; AJMERA, Veeral; LOOMBA, Rohit. Non-invasive methods for imaging hepatic steatosis and their clinical importance in NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 55-66, 2022.

THRALL, Mary Anna et al. **Hematologia e citologia veterinária**. Wiley-Blackwell, 2022. 1056 p.

TIAN, Yuexun et al. Using environmental factors to predict *Rhipicephalus sanguineus* sl (Acari: Ixodidae) mortality. **Pest Management Science**, 2023.

TORRES, Sabrina et al. Propriedades terapêuticas dos compostos fitoquímicos da espécie *Cannabis sativa* L.: Uma revisão de literatura. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 12, n. 2, p. 19-28, 2023.

YOUSEF, Mokhtar I. et al. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3246-3261, 2010.