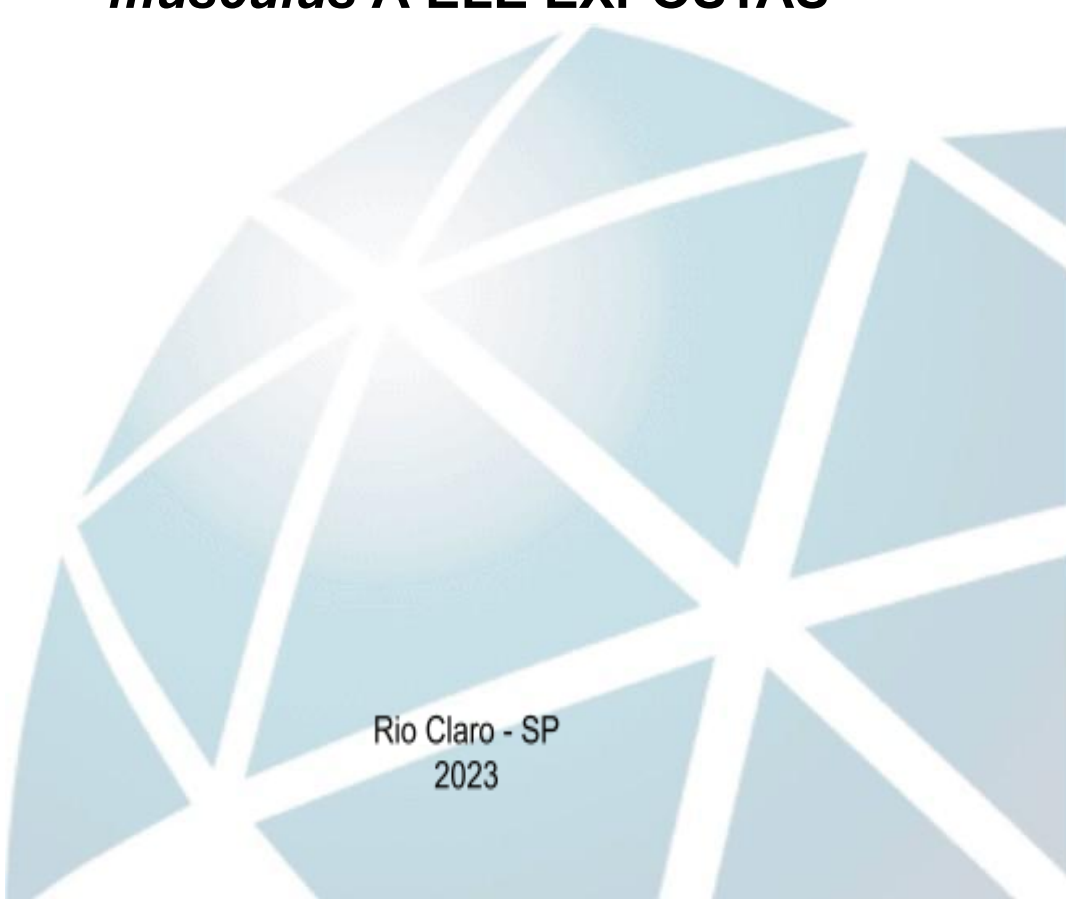

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FABIANA DE ABREU SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia schaueriana* MART.
(VERBENACEAE), POTENCIAL ACARICIDA:
ESTUDO MORFOHISTOLÓGICO DO RIM E DO
FÍGADO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGOS *Mus
musculus* A ELE EXPOSTAS**



Rio Claro - SP
2023

FABIANA DE ABREU SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia schaueriana* MART. (VERBENACEAE), POTENCIAL ACARICIDA: ESTUDO MORFOHISTOLÓGICO DO RIM E DO FÍGADO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* A ELE EXPOSTAS

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 em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Coorientadora: Profa. Dra. Marina Rodrigues de Abreu

Rio Claro - SP
2023

S586a Silva, Fabiana de Abreu
Avaliação da toxicidade do óleo essencial de *Lippia schaueriana* Mart.
(Verbenaceae), potencial acaricida: estudo morfohistológico do rim e do fígado
de fêmeas de camundongos *Mus musculus* a ele expostas / Fabiana de Abreu
Silva. -- Rio Claro, 2023
48 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo
Coorientadora: Marina Rodrigues de Abreu

1. Ciências biológicas. 2. Biologia celular. 3. Histologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio
Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

FABIANA DE ABREU SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia schaueriana* MART. (VERBENACEAE), POTENCIAL ACARICIDA: ESTUDO MORFOHISTOLÓGICO DO RIM E DO FÍGADO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* A ELE EXPOSTAS

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 em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

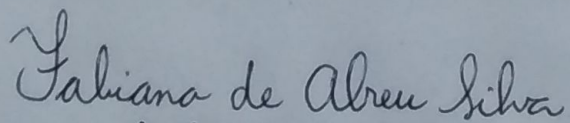
Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo (orientadora)

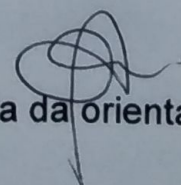
Profa. Dra. Marina Rodrigues de Abreu (coorientadora)

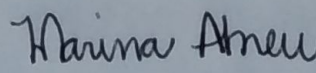
Me. Leticia Maria Graballos Ferraz Hebling

Profa. Dra. Priscila Cintra Socolowski

Aprovado em 08 de novembro de 2023


Assinatura da discente


Assinatura da orientadora


Assinatura da coorientadora

Dedico este trabalho aos meus pais, Nellis e Marcio

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Nellis e Marcio, pelo constante suporte durante toda a minha jornada acadêmica e pessoal, sobretudo pelo companheirismo, pelas risadas e pelos conselhos. Vocês são os meus maiores incentivadores, aqueles que me apoiaram nas minhas escolhas e que me ensinaram a persistir nos meus objetivos. À minha irmã Helô, que em sua inocência me fez levar a vida de modo mais leve, obrigada por tornar nossa família completa. À minha avó Cleusa, uma grande amiga, pelo exemplo de força e independência feminina, e pelas conversas hilárias. A meus animais de estimação por me fazerem valorizar as coisas simples da vida.

A meus amigos Jasper, Estelina, Rafael, Gabriel e Enzo, por dividirem comigo o amadurecimento durante todos esses anos. Ao meu eterno amigo Carlos, cuja curiosidade e olhar sensível para o mundo sempre me inspiraram. Ao meu amigo Guilherme, cuja paciência e sensatez foi essencial em meus momentos de dúvida, além de sempre me estimular a alcançar o melhor de mim e oferecer o melhor às pessoas. Às minhas amigas Nathalia e Larissa, por compartilharem o desejo e as dúvidas do ingresso na universidade. À Gabriele, cuja gentil ajuda foi muito importante.

Aos amigos de Rio Claro que tive a honra de dividir casa, os quais em um período de grande amadurecimento proporcionaram experiências divertidas, e compartilharam conversas necessárias que me ajudaram a enxergar o mundo por outras lentes. Aos meus colegas do BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology), que me acolheram e ajudaram em minha trajetória acadêmica. À minha orientadora Maria Izabel Camargo-Mathias pelo grande exemplo de pesquisadora, pela oportunidade, pelas dedicadas correções à minha escrita e por sempre exigir o melhor da equipe. A minha coorientadora Marina Rodrigues de Abreu, que pacientemente compartilhou todos os conhecimentos necessários para persistir neste projeto e adentrar no mundo da pesquisa, me apoiando em todas as etapas.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam desde a pré-escola até a universidade, muito obrigada por me mostrar a importância da Educação. Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Rio Claro, e à Moradia Estudantil da UNESP de Rio Claro. Sou grata também ao grupo HSPB, pela dedicação em todos os trabalhos que realizamos juntos e pelas conversas no período remoto. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente à minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo nº 2022/08856-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

O “carrapato do cão” (*Rhipicephalus linnaei*) tem grande relevância nacional e internacional pois é de ampla distribuição geográfica, além de ser vetor de uma diversidade de parasitas como vírus, bactérias e protozoários. Métodos convencionais de controle utilizam acaricidas sintéticos que geram resistência dos carrapatos e causam danos ao meio ambiente, como a contaminação do solo e dos cursos d’água, afetando consequentemente a fauna e a flora. Também tem sido documentado na literatura casos de danos a organismos não-alvos. Novas pesquisas exploram o uso de acaricidas naturais, produzidos a base de óleos essenciais extraídos de diversas plantas, como uma alternativa mais limpa e acessível, visando mitigar impactos ao meio ambiente, aos organismos não-alvos e evitar a resistência dos carrapatos ao acaricida. Este projeto avaliou o efeito causado pelo óleo essencial de *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae), aplicado via aspersão no corpo de camundongos *Mus musculus* na concentração de 50 mg/mL, cuja eficácia acaricida já havia sido comprovada em estudo anterior (Pereira *et al.*, 2023). Os métodos de análise morfohistológica e histoquímica do fígado e do rim dos camundongos incluíram a coloração do material pela hematoxilina e eosina aquosa (HE), pelo azul de bromofenol (AB), além da reação pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Os resultados mostraram que a exposição ao óleo essencial alterou a organização morfológica tecidual hepática, modificando a rota de circulação sanguínea em decorrência da: hipertrofia dos hepatócitos, presença de vacuolização no citoplasma dessas células (sinalizando o esforço celular em isolar os componentes tóxicos do óleo em vacúolos citoplasmáticos), além da presença de muitas das células hepáticas com núcleos picnóticos sinalizando início de morte celular. No rim ficou nítida a hipertrofia dos corpúsculos de Malpighi e das células dos túbulos contorcidos distais e proximais, que também apresentaram vacuolização citoplasmática, indicando intoxicação pelo óleo. Desta forma os dados aqui obtidos mostraram que um acaricida, mesmo tendo ele componentes moleculares naturais com potencial para controlar ectoparasitas, pode não ser seguro para o hospedeiro, aqui considerado organismo não-alvo.

Palavras-chave: morfohistologia; carrapato do cão; acaricida natural; lípia-da-serra.

ABSTRACT

The “brown dog tick” (*Rhipicephalus linnaei*) has great national and international relevance as it has a wide geographic distribution, in addition to being a vector for a diversity of parasites such as viruses, bacteria and protozoa. Conventional control methods use synthetic acaricides that generate resistance in ticks and cause damage to the environment, such as contamination of soil and water courses, consequently affecting fauna and flora. Cases of damage to non-target organisms have also been documented in the literature. New research explores the use of natural acaricides, produced from essential oils extracted from various plants, as a cleaner and more accessible alternative, aiming to mitigate impacts on the environment, non-target organisms and prevent tick resistance to the acaricide. This project evaluated the effect caused by the essential oil of *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae), applied via spraying on the body of *Mus musculus* mice at a concentration of 50 mg/mL, whose acaricidal efficacy had already been proven in a previous study (Pereira *et al.*, 2023). The methods of morpho histological and histochemical analysis of the mouse liver and kidney included staining the material with aqueous hematoxylin and eosin (HE), bromophenol blue (AB), in addition to the periodic acid-Schiff (PAS) reaction. The results showed that exposure to the essential oil altered the morphological organization of the liver tissue, modifying the blood circulation route as a result of: hepatocyte hypertrophy, presence of vacuolation in the cytoplasm of these cells (signaling the cellular effort to isolate the toxic components of the oil in cytoplasmic vacuoles), in addition to the presence of many hepatic cells with pyknotic nuclei signaling the beginning of cell death. In the kidney, hypertrophy of the Malpighian corpuscles and cells of the distal and proximal convoluted tubules was clear, which also showed cytoplasmic vacuolization, indicating oil intoxication. Thus, the data obtained here showed that an acaricide, even though it has natural molecular components with the potential to control ectoparasites, may not be safe for the host, here considered a non-target organism.

Keywords: morphohistology; brown dog tick; natural acaricide; lípia-da-serra.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema e secções histológicas do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos à água destilada.....	25
Figura 2 – Esquema e secções histológicas do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos ao Etanol 50%.....	26
Figura 3 – Esquema e secções histológicas do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos à <i>Lippia schaueriana</i> (50 mg/mL).....	27
Figura 4 – Esquema e secções histológicas do rim de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos à água destilada.....	28
Figura 5 – Esquema e secções histológicas do rim de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos ao Etanol 50%.....	29
Figura 6 – Esquema e secções histológicas do rim de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos à <i>Lippia schaueriana</i> (50 mg/mL).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detecção de proteínas totais (Azul de Bromofenol) do fígado de <i>Mus musculus</i>	31
Tabela 2 – Detecção de polissacarídeos neutros (PAS) do fígado de <i>Mus musculus</i>	32
Tabela 3 – Detecção de proteínas totais (Azul de Bromofenol) do rim de <i>Mus musculus</i>	33
Tabela 4 – Detecção de polissacarídeos neutros (PAS) do rim de <i>Mus musculus</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS

OE	Óleo Essencial
AB	Azul de Bromofenol (detecção de proteínas totais)
HE	Hematoxilina de Harris e Eosina Aquosa
PAS	Ácido Periódico de Schiff (detecção de polissacarídeos neutros)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1	Camundongos <i>Mus musculus</i>	16
2.2	Óleo essencial (OE) de <i>L. schaueriana</i> Mart.....	16
2.3	Exposição das fêmeas de camundongos <i>M. musculus</i> ao OE de <i>L. schaueriana</i> via aspersão.....	16
2.4	Análise morfohistológica do fígado e rim de <i>M. musculus</i>	17
2.5	Coloração pela Hematoxilina de Harris e Eosina Aquosa (HE).....	17
2.6	Coloração pelo Azul de Bromofenol (AB).....	17
2.7	Reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	18
2.8	Montagem das Lâminas e Fotodocumentação.....	18
3	RESULTADOS.....	19
3.1	Análise morfológica do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> (coloração por HE).....	19
3.1.1	Grupo Controle H_2O	19
3.1.2	Grupo Controle Etanol 50%.....	19
3.1.3	Grupo exposto à <i>L. schaueriana</i> (50 mg/mL).....	20
3.2	Análise histoquímica do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> (Detecção de proteínas totais e polissacarídeos neutros).....	20
3.2.1	Grupo Controle H_2O	20
3.2.2	Grupo Controle Etanol 50%.....	20
3.2.3	Grupo exposto à <i>L. schaueriana</i> (50 mg/mL).....	21
3.3	Análise morfológica do rim de camundongos <i>Mus musculus</i> (Coloração por HE).....	21
3.3.1	Grupo Controle H_2O	21
3.3.2	Grupo Controle Etanol 50%.....	22
3.3.3	Grupo exposto à <i>L. schaueriana</i> (50 mg/mL).....	22
3.4	Análise histoquímica do rim de camundongos <i>Mus musculus</i> exposto ao óleo de <i>Lippia schaueriana</i> (Detecção de proteínas totais e polissacarídeos neutros).....	23
3.4.1	Grupo Controle H_2O	23
3.4.2	Grupo Controle Etanol 50%.....	23
3.4.3	Grupo exposto à <i>L. schaueriana</i> (50 mg/mL).....	24
4	DISCUSSÃO.....	35
5	CONCLUSÕES.....	43
6	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes quelicerados pertencentes à Ordem Ixodida, atualmente com 956 espécies, incluídas em quatro famílias (Dantas-Torres *et al.*, 2019). Eles são ectoparasitas hematófagos obrigatórios, uma vez que se alimentam do sangue de uma variedade de animais hospedeiros incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Dantas-Torres *et al.*, 2019). Possuem ampla distribuição geográfica, sendo comuns em regiões tropicais e subtropicais, onde também atuam na transmissão de agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias, protozoários e nematóides, que provocam doenças e até a morte dos animais, bem como dos humanos (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres; Chomel; Otranto, 2012; Dantas-Torres *et al.*, 2019).

Os carrapatos geram grande impacto global não somente por serem vetores de doenças que atingem animais e humanos, mas também por serem responsáveis por grandes perdas econômicas na agropecuária, uma vez que podem ocasionar nos animais danos teciduais e anemia por perda de sangue, o que afeta a produção de leite e carne, e no caso do gado, pode deixá-lo vulnerável à infecção por diversos patógenos (Pereira *et al.*, 2023).

A linhagem tropical do “carrapato do cão” (*Rhipicephalus linnaei*) (Audouin, 1826) está associada não só ao cão doméstico, seu hospedeiro preferencial, mas a outros mamíferos, incluindo humanos (Zemtsova *et al.*, 2016), tendo relevância econômica, veterinária e de saúde pública (Nava *et al.*, 2018), por ser vetora de inúmeros patógenos como: bactérias do gênero *Anaplasma* causadora de doenças como a Anaplasmoze; *Borrelia* causadora da doença de Lyme ou Borreliose; *Ehrlichia spp* causadora da Eritríose canina; e as *Rickettsia* como a *R. conorii* causadora da “Mediterranean Spotted Fever” e a *R. rickettsii* causadora da “Rocky Mountain Spotted Fever”; além destas, alguns protozoários, como os do gênero *Babesia* causam a Babesiose; e aqueles do gênero *Hepatozoon* causam a Hepatozoonose canina (Dantas-Torres; Otranto, 2015; Houseman, 2013; Szabo; Pinter; Labruna, 2013; Lima-De-Souza *et al.*, 2022). Esses dados corroboram a importância em se buscar métodos de controle destes ectoparasitas.

A problemática envolvendo o controle de carrapatos também é notada no cenário mundial. Segundo Frederic Beugnet (2017), doenças transmitidas por vetores e que foram anteriormente associadas a ambientes tropicais têm sido

relatadas com frequência em regiões temperadas, onde observa-se o aumento de novas espécies de carrapatos e, conseqüentemente, a maior incidência das doenças por eles transmitidas, enfatizando-se também a ação dos fatores antrópicos, como o aumento de relações comerciais, viagens com animais de companhia, desenvolvimento de atividades ao ar livre e aumento de construções com jardins.

Nesse cenário da necessidade de se encontrar estratégias de controle de carrapatos, que sejam sobretudo eficientes, os métodos convencionais incluem a utilização de acaricidas sintéticos nos hospedeiros, os quais, porém, provocam impactos não somente aos organismos não-alvos, mas também ao meio ambiente, gerando a contaminação do solo, dos cursos d'água e, conseqüentemente, afetando a fauna e a flora, devido aos resíduos químicos, além de considerar-se ainda o potencial desses químicos de gerar resistência dos carrapatos aos seus princípios ativos (Lew-Tabor & Valle, 2016; Anholeto *et al.*, 2017; Dantas-Torres, 2008; Camilo *et al.*, 2017; Camargo-Mathias, 2018; Salman *et al.*, 2020; Lima-De-Souza *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, pesquisadores vêm desenvolvendo estudos com o objetivo de encontrar métodos de controle de carrapatos que sejam mais sustentáveis e econômicos (Rodriguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018), baseados em moléculas orgânicas (bioativos), estudos esses que vem trazendo à luz novos conhecimentos sobretudo quando trata-se de plantas nativas que já tenham identificado o seu potencial acaricida (Quadros *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais (OE) são compostos secundários derivados de plantas, constituídos por compostos voláteis, lipofílicos e odoríferos, e quimicamente descritos como terpenos e fenilpropanóides, compostos que auxiliam as plantas na interação com o meio ambiente, atraindo organismos polinizadores e protegendo-as contra eventuais predadores (Camilo *et al.*, 2017; Salman *et al.*, 2020). Na indústria farmacêutica esses compostos vêm sendo utilizados em razão da sua atividade biológica, a qual está relacionada a uma grande variedade de constituintes químicos, o que confere atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e acaricida (Camilo *et al.*, 2017).

O gênero *Lippia* é um dos principais da família Verbenaceae, abrangendo cerca de 200 espécies de plantas com porte de ervas, arbustos e árvores pequenas, cujos maiores centros de diversidade estão localizados no México e no Brasil (De Souza *et al.*, 2018; Osório *et al.*, 2021; Camilo *et al.*, 2022). As espécies

do gênero *Lippia* produzem óleos essenciais, os quais vêm tendo importância econômica e medicinal, à medida que os mesmos têm sido utilizados na medicina popular (Osório *et al.*, 2021).

Lippia schaueriana Mart. (Verbenaceae), é uma planta popularmente conhecida como lípia-da-serra, porém ainda é pouco estudada no meio científico, sendo endêmica da Caatinga (bioma brasileiro), apresentando distribuição restrita aos estados da Bahia e de Pernambuco, e sendo conhecidamente uma fonte de óleo essencial, o que é extraído de suas folhas e flores (De Souza *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2023). Esse óleo vem sendo amplamente utilizado na medicina popular da região no tratamento de gripes, resfriados e dores de cabeça (De Souza *et al.*, 2018).

A análise química do óleo essencial de *L. schaueriana* Mart. (Verbenaceae) mostrou a presença de 18 componentes, compreendendo mais de 98% dos constituintes da planta, sendo o óxido de piperitenona o mais abundante, seguido do limoneno, ambos com comprovada atividade inseticida (De Souza *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2023).

Estudos prévios desenvolvidos por Pereira *et al.* (2021, 2023) mostraram que o óleo essencial natural de *L. schaueriana* Mart. foi eficiente (em bioensaios laboratoriais), no controle de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. linnaei*, visto que a exposição destas ao bioativo nas concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL interferiu na oviposição e na viabilidade dos ovos.

No entanto, apesar de muitas informações já terem sido anteriormente obtidas, pouco ainda se sabe como esse óleo essencial age no organismo dos animais não-alvos (hospedeiros), informação essa que reflete na segurança do seu uso como acaricida natural. Dessa forma, a hipótese científica deste projeto de pesquisa é que o óleo essencial de *L. schaueriana* Mart. pode apresentar menores prejuízos ao metabolismo de animais não-alvos (hospedeiros) quando comparado àqueles obtidos pelo uso de acaricidas sintéticos.

Diante das informações anteriormente expostas, a presente proposta tem como objetivos estudar a ação do óleo essencial de *L. schaueriana* Mart. em organismos não-alvos (simulando hospedeiros) por meio da avaliação morfohistológica do fígado e do rim de um modelo experimental mamífero (*Mus musculus*), expostas a esse óleo, com vistas a gerar informações que possam sinalizar a possibilidade de sua aplicação como potencial acaricida natural.

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido com o objetivo de trazer informações que auxiliarão no controle de carrapatos de maneira mais sustentável, limpa e ainda eficiente, visto o carrapato *R. linnaei* ser frequentemente descrito na literatura como uma espécie de grande relevância na área econômica e da saúde pública (Nava *et al.*, 2018), por ser responsável não só pela infestação de animais de companhia, mas também pela transmissão a estes e aos humanos, de diversos agentes infecciosos (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres; Chomel; Otranto, 2012; Dantas-Torres *et al.*, 2019).

Dessa maneira, o estudo de bioativos com potencial acaricida, com ênfase àqueles extraídos de plantas nativas, tem estimulado os pesquisadores a obter informações para auxiliarem na busca de estratégias de controle de carrapatos em geral (Anholeto *et al.*, 2017). A grande expectativa reside na redução da toxicidade aos organismos não-alvos, além de, devido às suas propriedades biodegradáveis, terem menor impacto sobre o meio ambiente. Busca-se também obter informações que possam indicar se o uso desse potencial acaricida natural influenciaria no desenvolvimento de resistência dos carrapatos. Adenubi *et al.* (2016) mencionaram que mais de 200 espécies de plantas oriundas de diferentes países apresentaram propriedades acaricidas, a partir de estudos *in vitro*, corroborando a relevância do uso desses bioativos derivados de plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Camundongos *Mus musculus*

Foram utilizados 9 camundongos Swiss fêmeas, da espécie *Mus musculus*, saudáveis, “spf” (patógeno-free), com peso aproximado de 40g, e idade entre 8 e 10 semanas, adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) da UNESP de Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram alocados em sala de Biotério e mantidos em caixas retangulares de polipropileno (30x20x13cm) (5 animais/caixa) em condições normais de 22°C ± 2° C, 50% de umidade, ventilação apropriada, exaustor, fotoperíodo de 12 horas e alimentados com ração e água *ad libitum*.

2.2 Óleo essencial (OE) de *L. schaueriana* Mart.

O óleo essencial de *L. schaueriana* teve sua composição estabelecida por pesquisadora da EMBRAPA Meio-Norte, Parnaíba, PI, Brasil, e se encontra em posse da orientadora deste projeto.

2.3 Exposição das fêmeas de camundongos *M. musculus* ao OE de *L. schaueriana* via aspersão

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

Grupo Controle H₂O (C1): exposição das fêmeas à água destilada via aspersão no corpo.

Grupo Controle Etanol 50% (C2): exposição ao Etanol 50%, solvente do óleo testado.

Grupo Tratamento *Lippia schaueriana* (T1): fêmeas expostas à concentração de 50 mg/mL do óleo essencial de *L. schaueriana* diluídos em Etanol 50% (concentração cuja eficácia como acaricida foi comprovada em estudos prévios).

As exposições foram realizadas em 3 dias consecutivos, com intervalos de 24h entre elas, utilizando sprays esterilizados, seguindo protocolo já descrito na literatura pertinente, simulando a aplicação de acaricidas comerciais em animais

hospedeiros de carrapatos. Após a exposição, os animais foram observados por 14 dias consecutivos.

No 14º dia, todos os indivíduos foram eutanasiados, por meio de superdosagem de analgésicos com cloridrato de ketamina (80 mg/kg MC/IP) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg MC/IP) e tiveram o fígado e o rim coletados. Os procedimentos de remoção dos órgãos foram realizados pela veterinária responsável pelo Biotério, Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling (CRMV 5412), segundo metodologia aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal.

2.4 Análise morfohistológica do fígado e rim de *M. musculus*

A análise morfohistológica foi acompanhada pela veterinária Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling (CRMV 5412) que além de responsável pelo Biotério do IB, UNESP Rio Claro, também é participante do grupo de pesquisa BCSTM (onde realizou seu mestrado) e tem especialidade em Patologia Animal.

2.5 Coloração pela Hematoxilina de Harris e Eosina Aquosa (HE)

Para coloração pela HE as lâminas 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 foram secas em temperatura ambiente até o processo de montagem.

2.6 Coloração pelo Azul de Bromofenol (AB)

As lâminas com as secções foram coradas com Azul de Bromofenol durante 1 hora em temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e levadas para secagem em temperatura ambiente e posteriormente para montagem.

2.7 Reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Para realização da reação PAS as lâminas foram cobertas com Ácido Periódico 0,4% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas em água destilada e então submetidas ao reativo de Schiff por uma hora no escuro. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3 vezes em água sulfurosa em banhos de 1 minuto cada. Finalmente, foram lavadas em água corrente por 15 minutos e depois levadas para secagem em temperatura ambiente até o processo de montagem.

2.8 Montagem das Lâminas e Fotodocumentação

Após secagem, as lâminas foram rapidamente mergulhadas em xilol e montadas em Entellan® e lamínula de vidro previamente limpa. As lâminas permanentes foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA® DM750.

3 RESULTADOS

3.1 Análise morfológica do fígado de camundongos *Mus musculus* (coloração por HE)

3.1.1 Grupo Controle H₂O

Os resultados histológicos obtidos do fígado das fêmeas alocadas no Grupo Controle H₂O mostraram que o tecido hepático estava íntegro (como era de se esperar), com organização celular semelhante àquela descrita por Junqueira & Carneiro (2023), ou seja, os hepatócitos estavam dispostos em cordões bem delimitados, assim como os vasos sanguíneos, tanto os de menor quanto os de maior calibre (Fig. 1A). As células hepáticas mostraram morfologia cúbica e os limites celulares estavam bem definidos. O citoplasma apresentou alguns grânulos citoplasmáticos, o que caracterizou certa eosinofilia, grânulos esses provavelmente de glicogênio, o que também seria esperado para esse tecido (Fig. 1B). Os núcleos dos hepatócitos, com formato arredondado, em número de um ou dois, estavam quase sempre localizados centralmente na célula, com cromatina descondensada, mas com alguns nucléolos evidentes (Fig. 1A-B). Entre os cordões de hepatócitos foi possível observar-se os núcleos das células Kupffer, macrófagos específicos do fígado, os quais mostraram morfologia alongada e distinta daqueles dos hepatócitos (Fig. 1A-B).

3.1.2 Grupo Controle Etanol 50%

O fígado dos animais expostos apenas ao Etanol 50% apresentou histologia muito semelhante àquela observada no Grupo Controle H₂O, onde o tecido hepático apresentou-se organizado, com cordões de hepatócitos íntegros, assim como os vasos sanguíneos de todos os calibres (Fig. 2E). Os hepatócitos, células cúbicas, mostraram citoplasma mais homogêneo quando comparado ao grupo anterior (Fig. 2F), com núcleos fortemente corados pela hematoxilina, que mostraram cromatina dispersa e nucléolos evidentes (Fig. 2F). Foi possível observar ainda os núcleos alongados e fortemente corados das células de Kupffer, estas localizadas entre os cordões de hepatócitos, ficaram bem evidentes nas secções (Fig. 2E-F).

3.1.3 Grupo exposto à *L. schaueriana* (50 mg/mL)

Os animais expostos ao óleo essencial de *L. schaueriana* (50 mg/mL) apresentaram tecido hepático com alterações morfológicas quando comparados aos grupos controles. Apesar do tecido mostrar-se organizado em cordões de hepatócitos, verificou-se que essas células hepáticas tiveram sua morfologia mais irregular do que aquela encontrada nos grupos controles, com núcleos aparentemente hipertrofiados e bastante picnóticos (Fig. 3I), o que impediu que os nucléolos fossem visualizados com facilidade (Fig. 3I-J). Esses núcleos estavam imersos num citoplasma que apresentou vacuolização acentuada (Fig. 3J).

3.2 Análise histoquímica do fígado de camundongos *Mus musculus* (Detecção de proteínas totais e polissacarídeos neutros)

3.2.1 Grupo Controle H₂O

A análise histoquímica do tecido hepático dos animais alocados no Grupo Controle H₂O evidenciou a presença de hepatócitos com citoplasma bastante heterogêneo, e vacuolizado, o que provocou marcação mediana para os elementos proteicos. Os núcleos dos hepatócitos e as hemácias apresentaram marcação que variou de média a forte (Fig. 1C; Tabela 1).

A aplicação da técnica para detecção de polissacarídeos mostrou hepatócitos com citoplasma fracamente corado, exceto a granulação distribuída em toda extensão celular, o que provavelmente representa a presença de glicogênio, elemento típico desse órgão (Fig. 1D). A ausência de marcação dos núcleos tanto das células hepáticas quanto das de Kupffer deveu-se à pouca especificidade da técnica aos elementos presentes nessa organela (Fig. 1D; Tabela 2).

3.2.2 Grupo Controle Etanol 50%

A análise histoquímica do fígado dos indivíduos alocados no Grupo Controle Etanol 50% demonstrou que o tecido hepático apresentou células com forte marcação positiva no citoplasma dos hepatócitos, além de regiões que não foram marcadas, muito provavelmente devido à presença de vacúolos de natureza não proteica (provavelmente gotículas de lipídio). Também os núcleos tanto dos

hepatócitos quanto das células de Kupffer apresentaram marcação mediana (Fig. 2G; Tabela 1).

A detecção de polissacarídeos no tecido hepático mostrou hepatócitos com citoplasma heterogêneo devido à presença de granulação grosseira e fortemente marcada pela técnica, muito embora o citoplasma de forma geral tenha sido fracamente marcado (Fig. 2H; Tabela 2).

3.2.3 Grupo exposto à *L. schaueriana* (50 mg/mL)

A detecção de proteínas no tecido hepático do grupo exposto ao óleo essencial de *L. schaueriana* (50 mg/mL) mostrou a presença de hepatócitos com citoplasma fortemente marcado pelo corante, mostrando a presença de elementos proteicos. Além disso, a forte marcação do citoplasma dificultou a observação dos núcleos tanto das células hepáticas quanto das células de Kupffer (Fig. 3K; Tabela 1).

A aplicação da técnica do PAS permitiu a observação de hepatócitos com citoplasma completamente homogêneo e mediantemente marcado pela técnica, enfatizando-se aqui que nestes indivíduos expostos a *L. schaueriana* a forte granulação observada nos grupos controle não estiveram aqui presentes (Fig. 3L; Tabela 2).

3.3 Análise morfológica do rim de camundongos *Mus musculus* (Coloração pela HE)

3.3.1 Grupo Controle H₂O

As análises histológicas da região cortical do rim dos animais alocados no grupo controle, ou seja, aqueles que foram expostos apenas à água, evidenciaram a presença de um tecido íntegro e com organização celular preservada, o que já era esperado, e corroborando os dados descritos por Junqueira & Carneiro (2023). Os corpúsculos de Malpighi apresentaram a cápsula de Bowman formada por um epitélio simples pavimentoso, com células e núcleos achatados e, estes últimos ainda fortemente corados pela hematoxilina; especificamente o glomérulo renal, que segundo Ross & Pawlina (2008), é composto por um tufo de capilares sanguíneos,

além de outras células, também apresentou-se preservado. Ainda na região cortical do rim, pôde-se observar os túbulos contorcidos tanto proximais (com diâmetro do lúmen menor) quanto os distais (com lúmen mais dilatado), constituídos por epitélio simples cúbico, com células eosinofílicas mononucleadas e com cromatina dispersa (Fig. 4 A-B).

3.3.2 Grupo Controle Etanol 50%

Nos animais alocados no Grupo Controle Etanol 50%, os resultados obtidos foram muito semelhantes àqueles dos animais alocados no grupo controle H₂O, isto é, os tecidos e as estruturas mantiveram-se preservados e organizados, mostrando que a utilização do referido solvente não provocou alteração no órgão (Fig. 5 E-F).

3.3.3 Grupo exposto à *L. schaueriana* (50 mg/mL)

Os animais expostos ao óleo essencial de *L. schaueriana* (50 mg/mL) apresentaram alterações na morfologia dos componentes da região cortical do rim quando comparados aos grupos controles anteriormente descritos (Fig. 6 I-J). Os resultados sugeriram uma hipertrofia dos corpúsculos renais, além de uma certa vacuolização no interior do glomérulo, ou mesmo entre as alças formadas pelos capilares sanguíneos dessa estrutura (Fig. 6 I-J).

Também ao contrário do que foi observado nos grupos controles, notou-se que as células dos túbulos contorcidos tanto distais quanto proximais apresentaram extensa vacuolização distribuída por toda a célula (Fig. 6 I-J). Provavelmente esses túbulos também sofreram algum tipo de hipertrofia, visto que o lúmen dos mesmos praticamente não foi observado, e quando foram apresentados lúmen bem reduzido (Fig. I-J). Ainda nas células dos túbulos contorcidos, ficou claro que os núcleos celulares passaram a apresentar cromatina marginalizada, na grande maioria delas, muito embora o nucléolo ainda pudesse ser evidenciado (Fig. 6 I-J).

3.4 Análise histoquímica do rim de camundongos *Mus musculus* exposto ao óleo de *Lippia schaueriana* (Detecção de proteínas totais e polissacarídeos neutros)

3.4.1 Grupo Controle H₂O

Realizou-se a detecção de proteínas nas estruturas da região cortical do rim dos camundongos do Grupo Controle H₂O que mostrou que houve uma reação mediantemente positiva detectada pela presença do Azul de Bromofenol nos corpúsculos de Malpighi, e fortemente positiva nos túbulos contorcidos distais e proximais, exceto no lúmen daqueles distais que não reagiram ao corante (Fig. 4 C; Tabela 3).

Para detecção dos polissacarídeos no tecido da região cortical do rim, foi aplicado o teste do PAS que revelou reação fortemente positiva para a cápsula de Bowman e fracamente positiva para os glomérulos e para os túbulos contorcidos de forma geral. O lúmen dos túbulos apresentou-se negativo (Fig. 4 D; Tabela 4).

3.4.2 Grupo Controle Etanol 50%

Aqui, ao contrário do Grupo Controle H₂O, o teste para detecção de proteínas mostrou os corpúsculos de Malpighi com reação fortemente positiva, bem como as células dos túbulos contorcidos distais e proximais (Fig. 5 G; Tabela 3).

No caso do teste do PAS para detecção de polissacarídeos observou-se que assim como no Grupo Controle H₂O, a cápsula de Bowman foi fortemente positiva, e o corpúsculo de Malpighi foi fracamente positivo, dado esse também observado para os túbulos contorcidos distais e proximais, com a diferença que no Grupo Controle H₂O o lúmen dos mesmos apresentou-se negativo para o teste e no Grupo Controle Etanol os mesmos apresentaram forte positividade para o teste, indicando aí a presença de polissacarídeos (Fig. 5 H; Tabela 4).

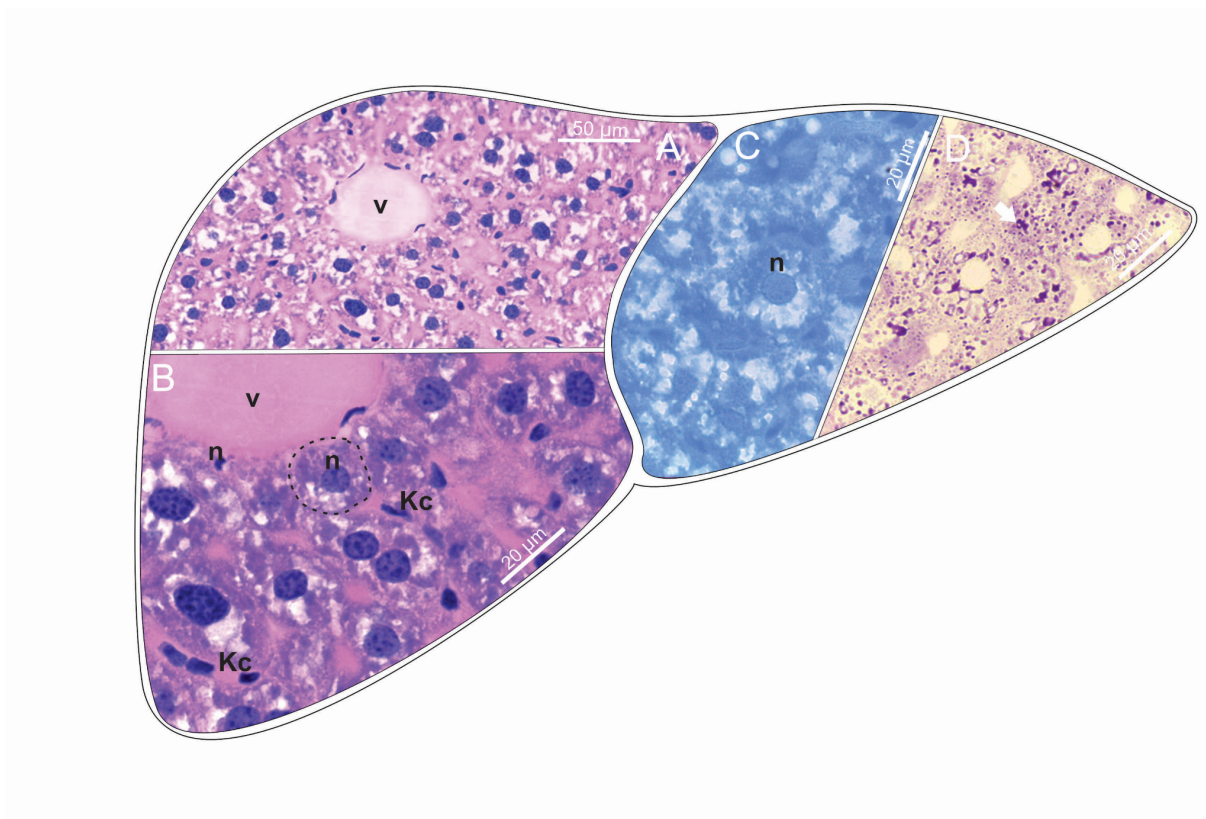
3.4.3 Grupo exposto à *L. schaueriana* (50 mg/mL)

A análise de detecção de proteínas na região cortical do rim dos animais do grupo exposto ao óleo essencial de *L. schaueriana* (50mg/mL) revelou algumas células glomerulares fortemente marcadas pelo Azul de Bromofenol.

Os túbulos contorcidos distais e proximais apresentaram marcação medianamente positiva nas suas células, deixando bem evidentes os vacúolos que não reagiram ao corante aplicado (Fig. 6 K; Tabela 3). Notou-se também que no lúmen dos mesmos não houve reação ao teste (Fig. 6 K; Tabela 3).

A detecção de polissacarídeos pelo PAS, ao contrário do que foi observado nos outros grupos, mostrou forte positividade nos corpúsculos de Malpighi, nos túbulos contorcidos distais e proximais, assim como nos seus respectivos lúmens (Fig. 6 L; Tabela 4).

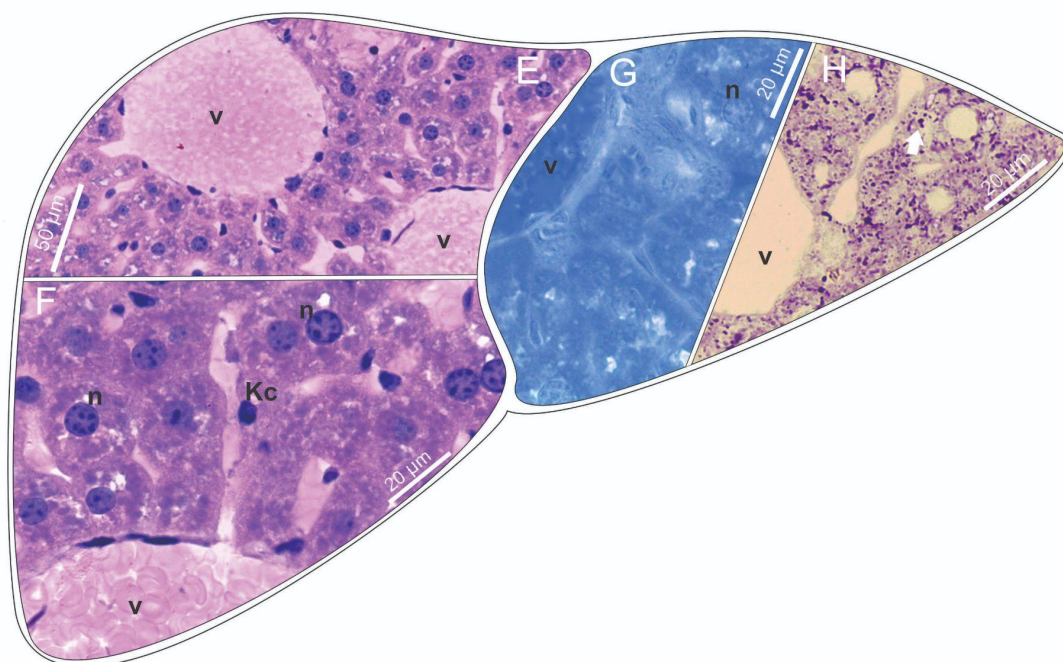
Figura 1 - Esquema e secções histológicas do fígado de camundongos *Mus musculus* expostos à água destilada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Notar a presença da veia centrolobular (v), dos núcleos dos hepatócitos (n) e das células de Kupffer (Kc) dos mesmos em secções nos vários sentidos. A-B= HE; C= AB; D= PAS.

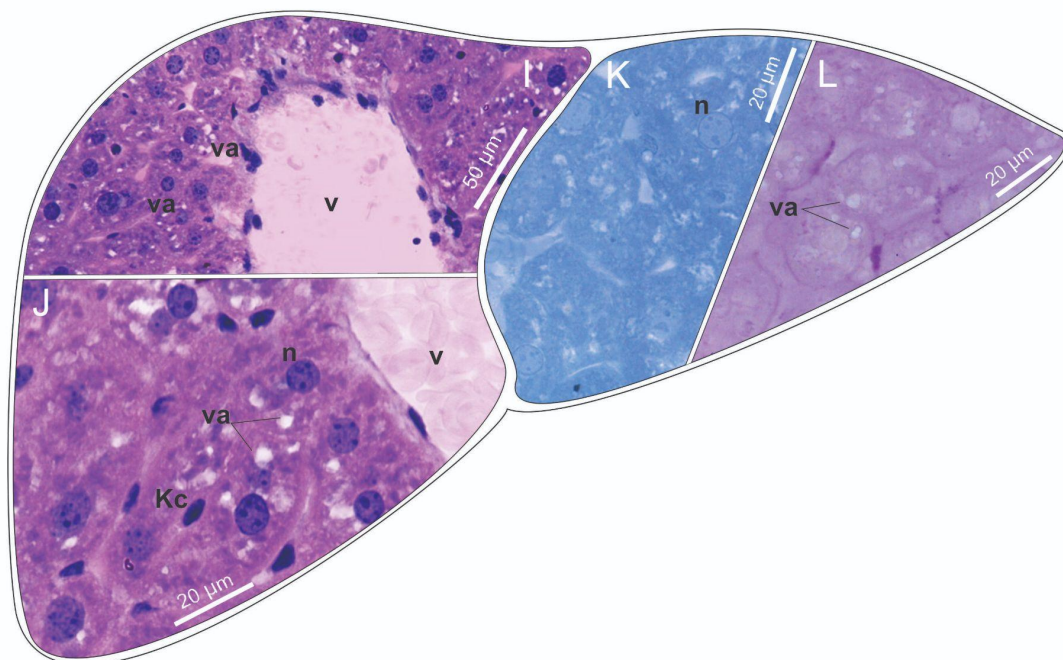
Figura 2 - Esquema e secções histológicas do fígado de camundongos *Mus musculus* expostos ao Etanol 50%.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Notar a presença da veia centrolobular (v), dos núcleos dos hepatócitos (n) e das células de Kupffer (Kc) dos mesmos em secções nos vários sentidos. E-F= HE; G= AB; H= PAS.

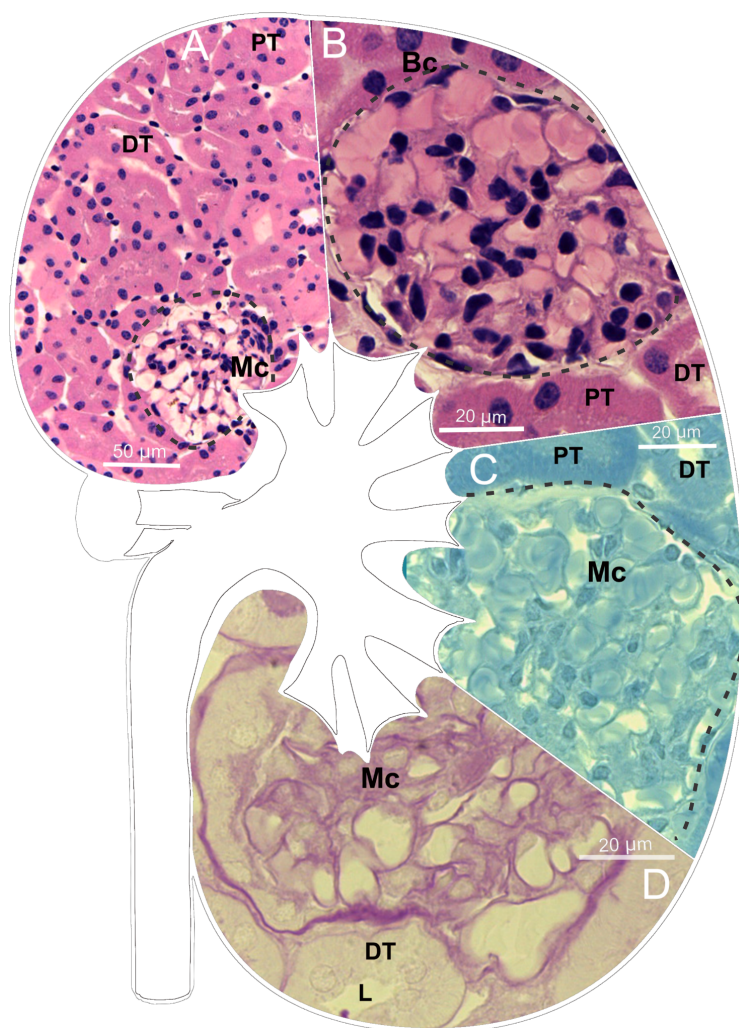
Figura 3 - Esquema e secções histológicas do fígado de camundongos *Mus musculus* expostos à *Lippia schaueriana* (50 mg/mL).



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Notar a presença da veia centrolobular (v), dos núcleos dos hepatócitos (n) e das células de Kupffer (Kc) e dos vacúolos citoplasmáticos (va) dos mesmos em secções nos vários sentidos. I-J= HE; K= AB; L= PAS.

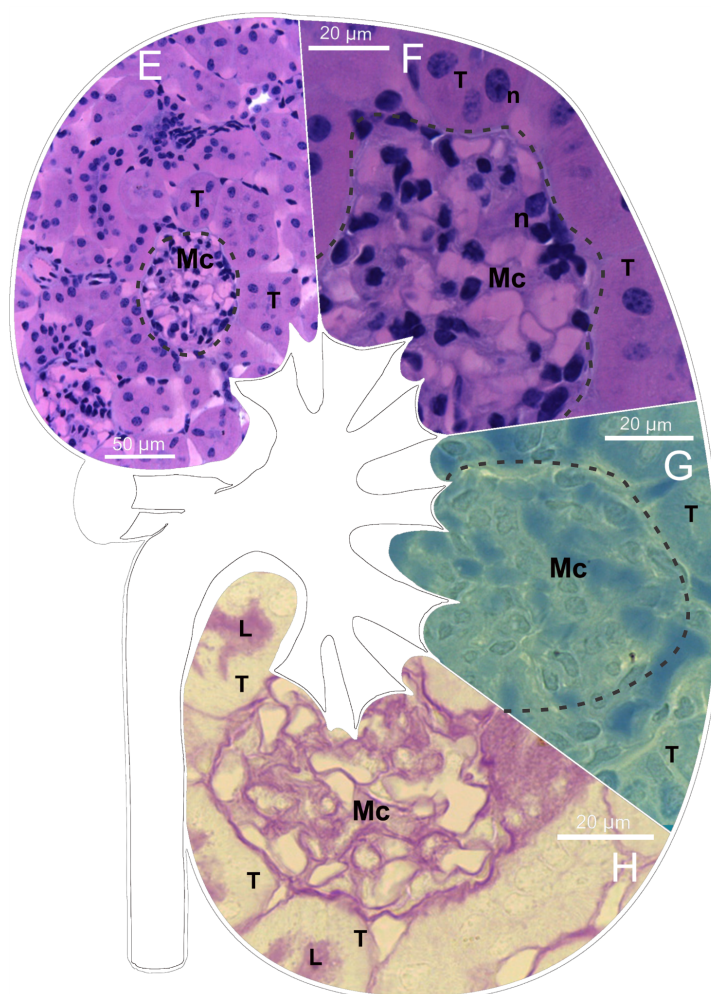
Figura 4 - Esquema e secções histológicas do rim de camundongos *Mus musculus* expostos à água destilada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Notar a presença dos corpúsculos de Malpighi (Mp), da cápsula de Bowman (Bc), dos túbulos contorcidos distais (DT), dos túbulos contorcidos proximais (PT) e do lúmen (L) dos mesmos em secções nos vários sentidos. A-B= HE; C= AB; D= PAS.

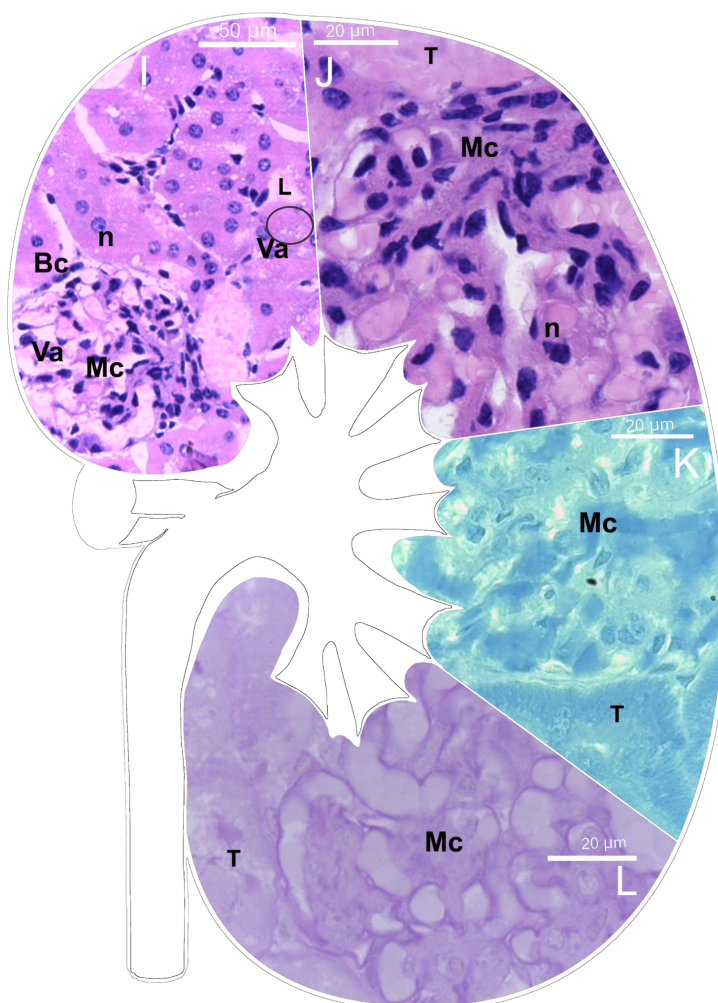
Figura 5 - Esquema e secções histológicas do rim de camundongos *Mus musculus* expostos ao Etanol 50%



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Notar a presença dos corpúsculos de Malpighi (Mp) e seus núcleos (n), da cápsula de Bowman (Bc), dos túbulos contorcidos distais (DT), dos túbulos contorcidos proximais (PT) e do lúmen (L) dos mesmos em secções nos vários sentidos. E-F= HE; G= AB; H= PAS.

Figura 6 - Esquema e secções histológicas do rim de camundongos *Mus musculus* expostos à *Lippia schaueriana* (50 mg/mL).



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Notar a presença dos corpúsculos de Malpighi (Mp) e seus núcleos (n), da cápsula de Bowman (Bc), dos túbulos contorcidos distais (DT), dos túbulos contorcidos proximais (PT) e do lúmen (L) dos mesmos em secções nos vários sentidos. Observe a vacuolização citoplasmática (Va) nos túbulos contorcidos e no corpúsculo de Malpighi. I-J= HE; K= AB; L= PAS.

Tabela 1 – Detecção de proteínas totais (Azul de Bromofenol) do fígado de *Mus musculus*

	Grupo Controle H₂O	Grupo Controle Etanol 50%	Grupo exposto à <i>L.schaueriana</i>
Citoplasma	++	+++	+++
Núcleo	+++	++	+
Hemácias	+++	++	+

*(-) negativo/ausente; (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Tabela 2 – Detecção de polissacarídeos neutros (PAS) do fígado de *Mus musculus*

	Grupo Controle H₂O	Grupo Controle Etanol 50%	Grupo exposto à <i>L.schaueriana</i>
Citoplasma	+	+	++
Granulações citoplasmáticas	++	+++	-
Núcleo	-	-	-

*(-) negativo/ausente; (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Tabela 3 – Detecção de proteínas totais (Azul de Bromofenol) do rim de *Mus musculus*

	Grupo Controle H₂O	Grupo Controle Etanol 50%	Grupo exposto à <i>L.schaueriana</i>
Corpúsculos de Malpighi	++	+++	+++ (algumas células)
Túbulos Contorcidos Distais	+++	+++	++
Túbulos Contorcidos Proximais	+++	+++	++
Lúmen	-	-	-

*(-) negativa/ausente; (+) fracamente positiva; (++) mediamente positiva; (+++) fortemente positiva.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Tabela 4 – Detecção de polissacarídeos neutros (PAS) do rim de *Mus musculus*

	Grupo Controle H₂O	Grupo Controle Etanol 50%	Grupo exposto à <i>L.schaueriana</i>
Corpúsculos de Malpighi	+	+	+++
Cápsula de Bowman	+++	+++	+++
Túbulos Contorcidos Distais	+	+	+++
Túbulos Contorcidos Proximais	+	+	+++
Lúmen	-	+++	+++

*(-) negativa/ausente; (+) fracamente positiva; (++) mediamente positiva; (+++) fortemente positiva.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

4 DISCUSSÃO

Atualmente o controle de carrapatos vem sendo realizado principalmente fazendo-se uso de acaricidas químicos sintéticos, disponíveis no mercado e que têm demonstrado, segundo a literatura especializada, sinais de danos ao meio ambiente, resistência das populações de carrapatos aos compostos químicos utilizados e danos aos organismos não-alvo (Labarthe *et al*, 1994; Dantas-Torres, 2008; Lew-Tabor & Valle, 2016; Anholeto *et al.*, 2017; Camilo *et al.*, 2017; Camargo-Mathias, 2018; Becker *et al*, 2019; Salman *et al.*, 2020; Daniele *et al*, 2021; Lima-De-Souza *et al.*, 2022). O uso de bioativos, com destaque para os óleos essenciais (OE), compostos secundários extraídos de plantas ou de animais, especialmente de plantas nativas do território brasileiro, têm recebido destaque já que representam uma alternativa sustentável e econômica para o combate desses ectoparasitas (Abbas *et al*, 2014; Camilo *et al.*, 2017; Rodriguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018; Quadros *et al.*, 2020; Oliveira, *et al* 2021; Pereira, *et al.*, 2023).

O óleo essencial de *L. schaueriana* (planta nativa do nordeste brasileiro) foi recentemente confirmado em laboratório como acaricida natural contra o carrapato do cão (*R. linnaei*) por Pereira *et al.* (2023) e os autores encontraram resultados promissores sobre sua eficácia no controle desses ectoparasitas, visto ter o mesmo propriedades para alterar os parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas, causando redução da oviposição e da viabilidade dos ovos dessa espécie de carrapatos quando expostos principalmente às concentrações de 25mg/mL e 50mg/mL (Pereira *et al.*, 2023).

Apesar desse OE ter sido considerado potencial acaricida natural para controle de carrapatos do cão (*R. linnaei*), não se tem muitas informações até o momento da ação do mesmo nos animais hospedeiros, tornando-se fundamental a avaliação de sua toxicidade nesses animais não-alvos o que garantirá o uso seguro desses compostos, uma vez que mesmo se tratando de produtos naturais extraídos de plantas, é necessário o estabelecimento de dosagens seguras.

Animais parasitados por essa espécie de carrapato são na grande maioria mamíferos (principalmente cães), cujo fígado atua como órgão detoxificador, com funções de processamento e armazenamento de nutrientes absorvidos pelo intestino, bem como pela captação, transformação e acúmulo de metabólitos e a neutralização de substâncias tóxicas potencialmente nocivas (Junqueira & Carneiro,

2023), tornando-se assim um órgão modelo para o estudo de toxicidade. Além do fígado, o estudo dos rins quando expostos a substâncias tóxicas também pode ser um indicador de alterações que causarão prejuízos ao organismo.

Nesse contexto, o presente estudo propôs analisar os efeitos do OE de *L. schaueriana* sobre o fígado e o rim de camundongos *Mus musculus* expostos à maior concentração proposta no estudo de Pereira *et al.* (2023), a saber, a de 50mg/mL, que segundo os autores foi a que demonstrou ser mais eficaz em comprometer o sucesso reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei*. Para tanto, os camundongos foram alocados em dois grupos controles: Grupo Controle H₂O e Grupo Controle Etanol 50% (solvente utilizado nos óleos essenciais) e num grupo tratamento, exposto à *L. schaueriana* (50mg/mL). A avaliação da toxicidade foi realizada utilizando-se técnicas histológicas e histoquímicas sob microscopia de luz.

Os resultados obtidos da análise do fígado mostraram que tanto no Grupo Controle H₂O quanto no Controle Etanol 50% o tecido hepático esteve preservado e com as características semelhantes às aquelas descritas na literatura por Junqueira & Carneiro (2023), ou seja, com hepatócitos íntegros e cúbicos numa organização paralela em cordões, com limites celulares bem evidentes, citoplasma homogêneo e núcleos arredondados (um ou dois), abrigando nucléolos bem visíveis, conjunto esse de aspectos morfológicos que garantiram que o uso do Etanol 50% como solvente dos óleos essenciais, não provocou alterações na morfologia do fígado de *M. musculus* a ele expostos. Por outro lado, contrariamente a esses achados verificou-se que no fígado dos animais do Grupo Tratamento, expostos ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL), ficou clara a presença de alterações morfológicas quando comparou-se com os dados dos grupos controles.

As alterações morfológicas encontradas em resposta à exposição ao OE incluíram a vacuolização citoplasmática dos hepatócitos, o que poderia estar sinalizando que a própria célula estaria se protegendo por meio de mecanismos e estratégias que isolassem moléculas dos compostos potencialmente tóxicos acomodando-as em vacúolos que posteriormente seriam digeridos, ou mesmo organelas e pequenas porções citoplasmáticas que já estivessem sofrido danos pela presença da substância tóxica. Essa estratégia celular de formação de vacúolos autofágicos, preservaria as partes ainda viáveis de células enquanto que aquelas já danificadas e acondicionadas nos vacúolos, seriam digeridas e descartadas ou ainda, num mecanismo de “*turnover*” celular, o que tivesse ainda condição de ser

reaproveitado assim o seria. Esses resultados corroboraram aqueles obtidos por Cunha *et al.* (2017), que ao analisarem o potencial de toxicidade do acaricida sintético fipronil e do acaricida natural timol sobre a morfohistologia do fígado de camundongos *M. musculus*, concluíram que ambos os compostos seriam tóxicos para o sistema hepático dos animais. Ainda com relação à vacuolização citoplasmática em resposta à exposição a substâncias tóxicas, Marques *et al.* (2019), que analisaram a toxicidade do óleo da fruta *Euterpe oleraceae* em camundongos *M. musculus*, concluíram que o composto agiu de forma hepatotóxica.

Além de alterações citoplasmáticas, foram observadas nos animais do grupo exposto à *L. schaueriana* (50mg/mL) alterações nucleares, que incluíram hipertrofia e picnose, ambas podendo ser entendidas como sinalizadoras de processos de morte celular, conforme descrito por Arking (2019), o que representaria a instalação de danos irreversíveis para os hepatócitos. Sabe-se que alterações nucleares em resposta à exposição a bioativos/acaricidas sintéticos já foram registradas nos trabalhos de Ferreira *et al* (2012), que analisaram o efeito citotóxico do acaricida sintético fipronil sobre o fígado de camundongos *M. musculus*, resultados obtidos por meio de análises sob microscopia eletrônica, e que levaram os autores a concluir que esse composto seria potencialmente tóxico para o fígado desses animais não-alvos. Outro estudo que foi aqui corroborado foi o de Malini *et al.* (2015), que analisaram a histologia do fígado de *M. musculus* expostos ao extrato de folhas de *Clerodendron serrantum* (L.) e obtiveram resultados que mostraram a presença de danos na organização dos cordões de hepatócitos, assim como nos núcleos destas células, os quais apresentaram picnose e sinalizaram assim a ocorrência de necrose hepatocelular, reforçando a teoria de que embora os bioativos sejam extraídos de plantas consideradas medicinais, caso da *C. serrantum* (L.), quando em concentrações inadequadas poderiam manifestar nos animais não-alvos, efeitos hepatotóxicos. A presença de núcleos picnóticos nos hepatócitos também foi observada por Marques *et al.* (2019) em estudo que expôs camundongos ao óleo de *Euterpe oleraceae*.

Corroborando os resultados obtidos por meio das análises histológicas, aqueles da avaliação histoquímica também confirmaram a ocorrência de alterações na síntese e secreção de proteínas e de polissacarídeos naqueles animais que foram aqui expostos ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL). Nos controles houve marcação que variou de média a fortemente positiva ao Azul de Bromofenol,

sugerindo a síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleares, participantes do metabolismo celular das células hepáticas, tais como a albumina e a protrombina (Junqueira & Carneiro, 2023). Ao contrário desses achados, observou-se fraca positividade nos núcleos dos hepatócitos dos animais do grupo exposto a *L. schaueriana* (50 mg/mL) sugerindo uma inibição da presença de proteínas nucleares, provavelmente relacionada aos mecanismos de morte celular, uma vez que durante esse processo há a ação de nucleases, enzimas que atuam na degradação de proteínas nucleares (Alberts *et al.* 2017). Em estudo realizado por Roma *et al.* (2012) foi também detectada fraca positividade nos núcleos dos hepatócitos em decorrência da inibição da síntese proteica nas células de camundongos expostos a permetrina (sintético). Ainda segundo esses autores, a substância tóxica estaria interferindo na síntese de proteínas estruturais a serem exportadas das células hepáticas, e acarretaria prejuízos não só ao fígado, mas também à homeostase geral do organismo.

Histoquimicamente os polissacarídeos presentes nos hepatócitos dos animais alocados nos Grupo Controle H₂O e Grupo Controle Etanol 50% mostraram fraca positividade citoplasmática, porém com granulação polissacarídica fortemente marcada pelo PAS, resultado já esperado uma vez que os hepatócitos seriam as células responsáveis por armazenar as reservas de carboidrato em seu citoplasma (Junqueira & Carneiro, 2023), principalmente o glicogênio, polissacarídeo complexo presente nos mamíferos, elemento essencial da via metabólica para produção de glicose e conseqüentemente da reserva energética para o metabolismo celular desses animais (Alberts *et al.*, 2017).

Ao contrário do que foi observado nos grupos controles, naqueles expostos à *L. schaueriana* (50mg/mL), a granulação citoplasmática não foi evidenciada pelo PAS, sinalizando a redução da atividade celular na síntese e liberação dos polissacarídeos (Junqueira & Carneiro, 2023). Em estudo desenvolvido por Kose *et al.* (2012), que avaliou o efeito hepatotóxico em camundongos dos medicamentos Metotrexato® e Montelukaste®, utilizados no tratamento do câncer e da asma, ficou demonstrada a baixa taxa de glicogênio nos hepatócitos, o que segundo os autores estaria indicando presença de dano celular em resposta à exposição, corroborando Yousof *et al.* (2022), que avaliaram o impacto de nanopartículas de prata no fígado de ratos a elas expostos e mostraram que houve fraca reação ao PAS nos grupos experimentais, quando comparou-se ao grupo controle. Nesse estudo, os danos

hepáticos nos camundongos foram induzidos por meio de injeções de tetracloreto de carbono, o que também resultou em decréscimo dos níveis de glicogênio hepático, e que foi associado à diminuição da capacidade de regeneração e reparação do fígado.

Além da análise morfohistológica e histoquímica do fígado, o presente estudo também avaliou os efeitos do OE de *L. schaueriana* (50mg/mL) nos rins de camundongos *M. musculus* a ele expostos, uma vez terem esses órgãos complexa organização histológica e variada composição celular, além de sua função de eliminar as excretas produzidas pelo organismo, o que os tornam órgãos-modelo para estudos de toxicidade (Ross & Pawlina, 2021; Junqueira & Carneiro, 2023).

Nos bioensaios aqui desenvolvidos foram obtidos resultados que mostraram que nos animais dos grupos controles, ou seja, aqueles expostos apenas à água destilada e ao Etanol 50%, este último tendo sido utilizado como solvente dos extratos da planta, indicaram que o tecido renal apresentou-se preservado, o que de certa forma já era esperado e cujos dados corroboraram aqueles disponíveis na literatura e que foram anteriormente descritos por Junqueira & Carneiro (2023), ou seja, foi observado um tecido onde os corpúsculos de Malpighi (glomérulos e cápsulas de Bowman) mantiveram-se preservados, e cujas células conservaram sua integridade. Além dessas estruturas também foram observados os túbulos contorcidos tanto distais quanto proximais que, assim como os corpúsculos de Malpighi, também foram preservados. Dado importante que aqui também foi obtido com a exposição ao Etanol 50% foi a não ocorrência de alterações morfológicas ou desorganização tecidual na região cortical dos rins.

Diferentemente da informação anterior, quando realizou-se a exposição dos animais ao OE da planta *L. schaueriana* (50 mg/mL) observou-se a ocorrência de alterações na morfologia do tecido renal da região cortical, alterações essas que incluíram a hipertrofia do corpúsculo de Malpighi. Segundo dados da literatura, processos de hipertrofia, ou seja, de aumento do tamanho das estruturas e das próprias células, em se tratando do rim e segundo Khan, Hard & Alden (2013), seriam um indicativo da instalação de um processo inflamatório no glomérulo, denominado de glomerulonefrite, caracterizado pela proliferação das células mesangiais, ou mesmo das células mesangiais e das células epiteliais da cápsula de Bowman, com papéis, respectivamente, na contração dos capilares glomerulares e

na filtração do sangue com consequente formação e deslocamento do filtrado glomerular para os túbulos renais. Outra hipótese seria a da proliferação de neutrófilos dentro do próprio glomérulo, visto terem essas células relevante importância no processo inflamatório. Estudos desenvolvidos anteriormente por Makiyah *et al.* (2021) também obtiveram resultados que mostraram que a exposição por via oral em camundongos *M. musculus* a diferentes concentrações de *Piper nigrum* (pimenta-preta), provocaria efeitos diversos no tecido renal, informações essas que por consequência ainda levaram esses autores a concluir que na exposição às maiores concentrações de uma substância tóxica haveria um aumento do diâmetro do corpúsculo renal quando comparado aqueles dos animais do grupo controle, provavelmente devido à entrada do bioativo circulante no interior do órgão provocando neste a instalação de um quadro inflamatório, resposta esperada do organismo às lesões.

Além das alterações encontradas nos corpúsculos de Malpighi dos animais expostos ao OE de *L. schaueriana* na concentração de 50 mg/mL, foi aqui também observada uma extensa vacuolização no citoplasma das células presentes no glomérulo, bem como por entre as alças de seus capilares. Resultados de trabalhos que foram desenvolvidos por Greaves (2012), indicaram que a vacuolização glomerular seria uma alteração frequente nos rins de animais que fossem expostos a substâncias tóxicas, no caso em questão à exposição de camundongos à *L. schaueriana*. Além dos autores anteriormente citados, Zidan (2015) também trabalhou com essa temática analisando histológica e fisiologicamente os rins de *Rattus norvegicus var. albus* expostos a diferentes concentrações do pesticida Spinosad (Tracer®), metabólito derivado do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*, o qual provocou expressiva hipertrofia e vacuolização nos glomérulos renais, e que segundo interpretação do autor seria um indicativo de toxicidade no órgão. Assim como o resultado obtido do estudo histológico do fígado de camundongos *Mus musculus* expostos ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL), nos rins essa intensa vacuolização poderia estar ocorrendo na tentativa das células de isolar um composto potencialmente danoso, nesse caso, o OE, em vacúolos que posteriormente seriam digeridos pelas próprias células.

A observação dos túbulos contorcidos distais e proximais também revelou que as células que os compõem, no caso dos animais que foram expostos ao OE,

mostraram vacuolização citoplasmática, além da hipertrofia das mesmas, o que em muitos dos casos provocou uma diminuição do diâmetro do lúmen. Estudos desenvolvidos por Saoudi *et al.* (2017), expondo ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) a deltametrina, obtiveram resultados semelhantes, ou seja, a presença de vacúolos citoplasmáticos, indicando alteração histopatológica e consequentemente fisiológica. Sobolev, Korf & Goncharov (2019) estabeleceram um protocolo de envenenamento de *Rattus norvegicus* a organofosforados muito utilizados como inseticidas e conhecidos como altamente tóxicos, concluindo que houve inicialmente um aumento no diâmetro do lúmen dos túbulos renais, e posterior diminuição desse diâmetro, em relação aos controles.

Além das alterações citoplasmáticas, os rins dos animais expostos ao OE também sofreram alterações nucleares, visto que nas células dos túbulos contorcidos a cromatina encontrou-se marginalizada, indicando segundo Arking (2019), o início de processos de morte celular, mais especificamente de necrose, que ocorreria quando o tecido fosse exposto a compostos tóxicos. Marginalização da cromatina também foi um resultado ultraestrutural observado por Rana *et al.* (2018), por ocasião da exposição de ratos a nanopartículas de cádmio.

No presente trabalho foram também realizados testes histoquímicos para detectar a presença de proteínas totais (Azul de Bromofenol), bem como de polissacarídeos neutros no tecido da região cortical dos rins dos animais alocados nos grupos controles e expostos ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL). Os resultados obtidos mostraram marcação mediana para as proteínas nos túbulos distais e proximais, corroborando dados de Ebaid *et al.* (2007) quando expuseram camundongos (*M. musculus*) ao Piroxicam®, medicamento anti-inflamatório não-esteróide, e que mostrou menor intensidade da marcação de proteínas no tecido renal (em relação aos controles) a qual seria provavelmente atribuída à ruptura das membranas lisossomais pela presença no sistema de substâncias lesivas, resultando na liberação das enzimas hidrolíticas no citoplasma e causando um desequilíbrio no metabolismo das proteínas.

A histoquímica dos polissacarídeos (Ácido Periódico de Schiff), mostrou que a região cortical dos rins dos animais expostos ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL), a saber, corpúsculos de Malpighi e túbulos contorcidos distais e proximais, mostrou

forte marcação em relação aos controles. Sener *et al.* (2021) estabeleceram um protocolo de toxicidade renal induzida por formaldeído, para investigar a ação protetora da curcumina, concluindo que nos ratos expostos a 10 mg/kg de formaldeído, em relação ao controle (soro fisiológico) haveria maior positividade ao PAS, o que poderia estar indicando certa perda da função do tecido, devido a um possível quadro de stress oxidativo, a saber, um desequilíbrio entre os compostos celulares oxidantes e antioxidantes, trazendo às células e aos tecidos danos significativos.

5 CONCLUSÕES

- A exposição dos camundongos *M. musculus* ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL) provocou alterações nos hepatócitos que incluíram: vacuolização citoplasmática e presença de núcleos picnóticos e hipertrofiados;
- No fígado dos animais expostos ao OE de *L. schaueriana* houve inibição da secreção e da liberação das proteínas citoplasmáticas;
- Ficou evidenciada a ausência de marcação da granulação citoplasmática pelo PAS, indicando redução da presença de polissacarídeos;
- Nos rins, a exposição de camundongos *M. musculus* ao OE de *L. schaueriana* (50 mg/mL) hipertrofiou os corpúsculos de Malpighi e os túbulos contorcidos distais e proximais;
- Nas células dos túbulos contorcidos e dos corpúsculos de Malpighi houve extensa vacuolização citoplasmática provocada pela exposição ao OE de *L. schaueriana*;
- Os rins dos camundongos expostos ao OE de *L. schaueriana* apresentaram menor intensidade de marcação ao Azul de Bromofenol, indicando um desequilíbrio no metabolismo de proteínas;
- O aumento da intensidade da marcação ao PAS nos túbulos renais e corpúsculos de Malpighi indicou que houve perda da função do tecido.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, R., *et al.* Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v.203, p.6-20, 2014.
- ADENUBI, O. T. *et al.* Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 178-193, 2016.
- ABDEL-KADER, M. G. *et al.* Chemical composition and protective effect of *Juniperus sabina* L. essential oil against CCl₄ induced hepatotoxicity. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v.27, p.945-951, 2019.
- AGIUS, L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. **Molecular aspects of medicine**, v. 46, p. 34-45, 2015.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.
- ANHOLETO, L. A. *et al.* Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and tick borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 65-72, 2017.
- ARKING, R. **Biology of longevity and aging: pathways and prospects**. Oxford University Press, USA, 2019.
- BEUGNET, F. *Rhipicephalus sanguineus* ticks: a new vector from the continent to the UK?. **The Veterinary Record**, v. 180, n. 5, p. 117, 2017.
- BECKER, S., *et al.* Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.10, p.1046-1050, 2019.
- CHARGUI, I. *et al.* Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): a molecular assessment. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 25, n. 6, p. 672-683, 2012.
- CAMILO, C. J. *et al.* Acaricidal activity of essential oils: a review. **Trends in Phytochemical Research**, v. 1, n. 4, p. 183-198, 2017.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 2018.
- DA CUNHA, E. L. R. *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. 9, 2017.
- DANIELE, M. R., *et al.* Current status of resistance to ivermectin in *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* infesting dogs in three provinces in Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.26., 2021.

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, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. **International Journal for Parasitology: parasites and wildlife**, v. 4, n. 3, p. 452-461, 2015.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 9-13, 2015.

DE SOUZA, A. V. V. *et al.* Chemical composition of essential oil of leaves from *Lippia schaueriana* Mart. collected in the Caatinga area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 2018.

EBAID, H. *et al.* Piroxicam-induced hepatic and renal histopathological changes in mice. **Libyan Journal of Medicine**, v. 2, n. 2, p. 82-89, 2007.

FERREIRA, M. *et al.* Action of the chemical agent fipronil (active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: An ultrastructural analysis. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 2, p. 197-205, 2012.

GREAVES, P. Urinary Tract. In: GREAVES, P. **Histopathology of Preclinical Toxicity Studies**. Academic Press, 2012, p. 537-614.

HOUSEMAN, R. M. **Guide to ticks and tick-borne diseases**. 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia Celular e Molecular**. 3rd ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

KOSE, E. *et al.* Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study. **The scientific world journal**, v. 2012, 2012.

KHAN, K. N. M.; HARD, G.C.; ALDEN, C. L. Kidney. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. Academic Press, 2013, p. 1667-1773.

LABARTHE, N. V. Biological Control of Tick Populations: Review and Reflections. **Cadernos de Saúde Pública**: Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.47-52, mar. 1994.

LEW-TABOR, A. E.; VALLE, M. R. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 573-585, 2016.

LIMA-DE-SOUZA, J. R. *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, 2022.

LIU, Q. *et al.* Glycogen accumulation and phase separation drives liver tumor initiation. *Cell*, v. 184, n. 22, p. 5559-5576, 2021.

MALINI, D. M., *et al.* Histological Structure of Mice (*Mus Musculus* L.) Liver after Administration of Ethanol Extract and Spinasterol from Senggugu (*Clerodendron Serratum* L) Leaves. **Proceeding of 5th International Seminar on New Paradigm and Innovation on Natural Sciences and Its Application**. p.55-58, 2015.

MARQUES, E. S. *et al.* Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* fruit oil (açaí) in rat liver and thyroid tissues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 54-61, 2019.

MATOS, R. S. *et al.* Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 2, p. 314-320, 2019.

MAKIYAH, S. N. N. *et al.* Subchronic toxicity of piperine in piper nigrum on the histology of the kidney, liver, and lungs of mice (*Mus musculus* L.). **Bali Medical Journal**, v. 10, n. 3, p. 1161-1167, 2021.

NAVA, S. *et al.* *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573-1585, 2018.

OLIVEIRA, P. R., *et al.* Exposure of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) to hexane extract of *Acmella oleracea* (Jambu): semi-engorged and engorged ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.12, n.4, p.1-12, 2021.

ONAOLAPO, A. Y., ONAOLAPO, O. J. *Ocimum Gratissimum* Linn Causes Dose Dependent Hepatotoxicity in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v.5, n.1, p.17-25, 2012.

OSÓRIO, T. *et al.* O potencial fitoterápico de espécies do gênero *Lippia* L. e *Aloysia* sp.: uma revisão. **Revista Eletrônica Científica Da UERGS**, v. 7, n. 1, p. 19-29, 2021.

PAI, R. K., *et al.* Clinicopathologic features of late-onset veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome after high dose intravenous busulfan and hematopoietic cell transplant. **Leukemia & Lymphoma**, v.53, n.8, p.1552-1557, 2012.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. 4 Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1985.

PEREIRA, M. C, *et al.* Efficacy of essential oils of *Egletes viscosa* and *Lippia schaueriana* on the reproductive biology of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* engorged females. **Experimental Parasitology**, v.244, n.108423, 2023.

QUADROS, D. G. *et al.* Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: pragmatism or utopia? **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 2020.

ROMA, G. C.; DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cytotoxic Effects of Permethrin on Mouse Liver and Spleen Cells. **Microscopy Research and Technique**, n. 75, p. 229-238, 2012.

RANA, Kavita *et al.* Renal toxicity of nanoparticles of cadmium sulphide in rat. **Chemosphere**, v. 193, p. 142-150, 2018.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology research**, v. 117, n. 1, p. 3-29, 2018.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Ross Histologia texto e atlas: correlações com biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2021.

SZABÓ, M. P. J; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 27, 2013.

SAOUDI, Mongi *et al.* Deltamethrin induced oxidative stress in kidney and brain of rats: Protective effect of *Artemisia campestris* essential oil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 955-963, 2017.

SOBOLEV, V. E.; KORF, E. A.; GONCHAROV, N. V. The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 5. morphofunctional alterations in kidneys. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 55, n. 4, p. 302-312, 2019.

SALMAN, M. *et al.* Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109178, 2020.

SENER, U. *et al.* Protective Effects of Curcumin Against Formaldehyde-induced Renal Toxicity in Rats. **West Indian Medical Journal**, v. 69, n. 5, 2021.

TOMAR, M.; KUMAR, A.; KATARIA, S. K. Evaluation of Acute toxicity of Lambda Cyhalothrin in *Mus musculus* L. **Indian journal of experimental biology**, v. 53, p. 551-555, 2015.

WANG, P., *et al.* Subchronic toxicity of low dose propoxur, permethrin and their combination on the redox status of rat liver. **Chemico-Biological Interactions**, n. 272, p. 21-27, 2017.

YOUSOF, S. M. *et al.* Subacute toxic effects of silver nanoparticles oral administration and withdrawal on the structure and function of adult Albino Rats' hepatic tissue. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 5, p. 3890-3898, 2022.

ZIDAN, N. E. H. A. Hepato-and nephrotoxicity in male albino rats exposed to malathion and spinosad in stored wheat grains. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, n. 2, p. 133-148, 2015.

ZEMTSOVA, G. E. *et al.* Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and its relationships with climatic factors. **Experimental and Applied Acarology**, v. 69, n. 2, p. 191- 203, 2016.