
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

Extrato da *Cannabis sativa*: ação na pele (cicatrizante das lesões resultantes das picadas do carrapato do cão) e no fígado (toxicidade) de coelhas hospedeiras a ele expostas

ODAIZA DA SILVA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

Extrato da *Cannabis sativa*: ação na pele (cicatrizante das lesões resultantes das picadas do carrapato do cão) e no fígado (toxicidade) de coelhas hospedeiras a ele expostas

ODAIZA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientadora: Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

S586e Silva, Odaiza da
Extrato da *Cannabis sativa* : ação na pele (cicatrizante das lesões resultantes das picadas do carrapato do cão) e no fígado (toxicidade) de coelhas hospedeiras a ele expostas / Odaiza da Silva. -- Rio Claro, 2024
112 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. Cannabis sativa. 2. cicatrização. 3. enzimas hepáticas. 4. hospedeiro. 5. Rhipicephalus linnaei. I. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Extrato da Cannabis sativa: ação na pele (cicatrizante das lesões resultantes das picadas do carrapato do cão) e no fígado (toxicidade) de coelhas hospedeiras a ele expostas

AUTORA: ODAIZA DA SILVA

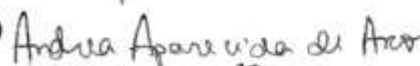
ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

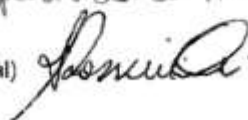
Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Profa. Dra. ANDREA APARECIDA DE ARO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Profa. Dra. SOLANGE APARECIDA ROSSINI DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Faculdades Integradas Einstein de Limeira



Rio Claro, 29 de novembro de 2024

Agradeço, a Deus, por guiar meus passos e me dar forças em cada etapa dessa jornada. Sem Ele, nada disso seria possível.

"O Senhor é meu pastor; nada me faltará."

(Salmos 23:1)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a uma garotinha sonhadora, que cresceu em uma cidadezinha no interior do Mato Grosso. Todos os dias, ao final da tarde, ela com sua irmã, juntas, imaginavam caminhos que o futuro poderia trazer, e entre esses sonhos estava o de se tornar cientista. Hoje, aqui estou eu, graduada em Biomedicina e concluindo uma pós-graduação, um mestrado. Obrigada, pequena eu, por não desistir, por acreditar em cada passo, por confiar que, no fim, tudo se ajusta. Você sempre teve a certeza de que, apesar dos desafios, valia a pena seguir em frente. A sua resiliência e gratidão por cada pequena conquista me trouxeram até aqui. Que a sua coragem de sonhar alto e de ver o mundo com olhos de esperança nunca se perca. Esse momento é tão seu quanto meu.

Agradeço à minha mãe, Doraci de Lourdes Silva, pelo apoio incondicional em cada passo da minha jornada, por acreditar em mim. A senhora sempre me ensinou que com amor, o respeito e a determinação, qualquer sonho pode ser alcançado, obrigada por ser meu porto seguro. À minha querida irmã, Jéssica Larissa da Silva, companheira desde a nossa infância. Obrigada por estar sempre ao meu lado, compartilhando risos e sonhos. Nossa cumplicidade me deu forças nos momentos mais difíceis.

Quero expressar gratidão ao meu noivo, Matheus Victor Maso Lacôrte e Silva. Obrigada pelo carinho, por cada palavra de incentivo e por acreditar em mim. Também agradeço aos meus queridos sogros, Victor Lacôrte e Marilene Maso, por todo o apoio que me deram ao longo dessa trajetória. O carinho e a acolhida de vocês fizeram toda a diferença, e sou muito grata por poder contar com o incentivo de vocês.

Quero dedicar um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Doutora Maria Izabel Souza Camargo. A senhora me acolheu em um momento delicado, após a pandemia. Mesmo diante de tantos desafios, me deu a oportunidade de trilhar esse caminho, e que hoje, graças ao seu apoio, sinto como a minha verdadeira vocação. Obrigada por me orientar com tanta paciência, sabedoria e por me corrigir quando necessário. A senhora fez toda a diferença na minha carreira, e por isso serei eternamente grata.

Ao meu primeiro aluno de Iniciação Científica, Davy Sapatini. Ser sua co-orientadora foi um dos maiores privilégios que já tive na minha jornada acadêmica. A

sua dedicação, inteligência e educação tornaram cada momento uma oportunidade de aprendizado e crescimento mútuo. Não apenas aprendi a te co-orientar, mas também passei a te admirar profundamente, tanto pelo excelente aluno que você é, quanto pela pessoa incrível. Obrigada por cada momento de risada e pelos cafés.

Quero agradecer também às minhas amigas de laboratório e da vida, Bruna Araújo, Milena Rodrigues e Marina Abreu. Agradeço pelos conselhos, risadas, cafés compartilhados e, acima de tudo, momentos de apoio e amizade. Também quero agradecer ao meu amigo Eduardo Libanio, por me aconselhar e estar sempre disposto a ajudar. Agradeço ainda a todos do laboratório, em especial ao Gerson, Eduarda Da Vinha, Tito Mina e Yousmel Gainza, agradeço por todo companheirismo e ajuda nesse projeto.

Quero agradecer de coração aos meus amigos da vida: Vitória Toppa, Helaine Silva, Ikaro Monteiro e Márcio Alexandre. Mesmo de longe, e apesar de não termos a mesma rotina, sempre senti o apoio e o carinho de vocês.

Agradeço também aos meus filhos de quatro patas, Luke, Léia, Chewie e Puppy, pela companhia incansável nas longas madrugadas de estudo, tornando cada momento mais leve e aconchegante.

Gostaria de agradecer à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, câmpus de Rio Claro, SP e aos professores da pós-graduação. Instituição em que tenho um imenso orgulho de fazer parte.

Agradeço pela bolsa de Iniciação Científica, cujo apoio financeiro foi indispensável para minha trajetória acadêmica. Processo nº 2022/03364-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A espécie de carrapato *Rhipicephalus linnaei*, conhecida popularmente como carrapato-vermelho-do-cão, está amplamente distribuída e causa grandes prejuízos devido à espoliação sanguínea, além de ser vetora de patógenos tanto para cães, seus hospedeiros preferenciais, quanto para humanos. O uso de carrapaticidas sintéticos para o controle vem sendo utilizado, porém embora eficazes os mesmos são tóxicos para os organismos não alvos. Assim, a busca por alternativas mais sustentáveis tem revelado que muitas plantas possuem bioativos importantes que auxiliam no combate desses ectoparasitas. Entre elas, a *Cannabis sativa* tem se destacado, visto seu potencial carrapaticida já ter sido comprovado em laboratório contra *R. linnaei*. No presente trabalho são apresentados resultados que demonstram como os bioativos presentes no extrato da inflorescência dessa planta, aplicado topicamente, atuou sobre a pele de coelhas pós infestadas, cujo desprendimento do hospedeiro deixou lesões importantes com características inflamatórias. Para tanto foram feitas exposições com as seguintes concentrações do extrato: 0,2; 0,4; e 0,8 mg/mL, e posteriormente procedeu-se a análise histológica. As coelhas foram divididas em grupos, e os resultados encontrados em cada um deles foram: grupo controle GNI (coelhas que não foram infestadas): a pele permaneceu íntegra; grupo GINT (infestadas e não expostas aos extratos): exibiu um processo inflamatório intenso com proliferação celular na epiderme e formação de edema na derme; grupo GPA (infestadas e expostas ao azeite): apresentou resultados semelhantes aos encontrados no GINT, ou seja, o azeite não diminuiu o processo inflamatório nem na epiderme nem na derme; grupo GT02 (infestadas e expostas a 0,2 mg/mL): a epiderme permaneceu desorganizada, com a presença de estruturas arredondadas e translúcidas (lipídeos) por entre os estratos e espessamento do estrato córneo. A derme manteve-se íntegra, houve redução da inflamação, mas sem cicatrização completa; grupo GT04 (infestadas e expostas a 0,4 mg/mL): a epiderme se recompôs e se espessou, houve aumento das estruturas arredondadas e translúcidas, principalmente nos estratos superficiais. A derme estava íntegra, apenas com pequenas áreas de edema. A inflamação foi reduzida; GT08 (infestadas e expostas a 0,8 mg/mL): houve aumento dos danos. A epiderme perdeu sua organização, ficou mais fina e a inflamação persistiu. Além da pele, também realizaram-se análises histológicas do fígado das coelhas expostas aos extratos: GT1- expostas a 0,2 mg/mL. Houve alteração hepática com vacuolização citoplasmática nos hepatócitos e núcleos irregulares, indício de morte celular. GT2- expostas a 0,4 mg/mL. Os cordões hepáticos se desorganizaram, e os hepatócitos sofreram hipertrofia. GT3- expostas a 0,8 mg/mL. Desorganização tecidual e vacuolização celular, porém em menor intensidade do que no GT2. Bioquimicamente verificou-se que apenas o GT2 teve aumento na enzima TGP. No fígado a concentração de 0,4 mg/mL foi a mais tóxica. Embora o extrato de inflorescência da *Cannabis sativa* mostrou-se eficiente nas concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL para reduzir a inflamação e promover a cicatrização da pele, a concentração de 0,8 mg/mL intensificou os danos morfológicos cutâneos. Em contrapartida, todas as concentrações testadas (0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL) causaram danos histopatológicos no fígado, sendo a concentração de 0,4 mg/mL a mais agressiva no mesmo. Ainda que o extrato contribua para a cicatrização das lesões cutâneas causadas por carrapatos, ele apresenta significativa toxicidade hepática no hospedeiro.

Palavras chaves: *Cannabis sativa*, cicatrização, enzimas hepáticas, hospedeiro, *Rhipicephalus linnaei*.

ABSTRACT

The tick species *Rhipicephalus linnaei*, commonly known as the red dog tick, is widely distributed and causes significant damage due to blood spoliation, in addition to being a vector of pathogens for both dogs, its preferred hosts, and humans. The use of synthetic tickicides for control has been implemented, but although effective, they are toxic to non-target organisms. Therefore, the search for more sustainable alternatives has revealed that many plants possess important bioactive compounds that help combat these ectoparasites. Among them, *Cannabis sativa* has stood out, as its tickicidal potential has already been proven in the laboratory against *R. linnaei*. This study presents results demonstrating how the bioactive compounds present in the extract of the inflorescence of this plant, applied topically, acted on the skin of post-infested rabbits, whose detachment from the host left significant lesions with inflammatory characteristics. To this end, exposures were made using the following extract concentrations: 0.2, 0.4, and 0.8 mg/mL, followed by histological analysis. The rabbits were divided into groups, and the results found in each of them were: control group GNI (non-infested rabbits): the skin remained intact; group GINT (infested and not exposed to the extracts): showed an intense inflammatory process with epidermal cell proliferation and dermal edema formation; group GPA (infested and exposed to olive oil): presented similar results to those found in GINT, meaning that olive oil did not reduce the inflammatory process in either the epidermis or dermis; group GT02 (infested and exposed to 0.2 mg/mL): the epidermis remained disorganized, with the presence of rounded and translucent structures (lipids) among the layers and thickening of the stratum corneum. The dermis remained intact, inflammation was reduced, but without complete healing; group GT04 (infested and exposed to 0.4 mg/mL): the epidermis reorganized and thickened, with an increase in rounded translucent structures, mainly in the superficial strata. The dermis was intact, with only small areas of edema. Inflammation was reduced; group GT08 (infested and exposed to 0.8 mg/mL): damage increased. The epidermis lost its organization, became thinner, and inflammation persisted. In addition to the skin, histological analyses of the liver of rabbits exposed to the extracts were also performed: GT1 - exposed to 0.2 mg/mL. There was hepatic alteration with cytoplasmic vacuolation in hepatocytes and irregular nuclei, indicating cell death. GT2 - exposed to 0.4 mg/mL. The hepatic cords disorganized, and the hepatocytes hypertrophied. GT3 - exposed to 0.8 mg/mL. Tissue disorganization and cellular vacuolation were observed, but less intense than in GT2. Biochemically, only GT2 showed an increase in the TGP enzyme. In the liver, the 0.4 mg/mL concentration was the most toxic. Although the *Cannabis sativa* inflorescence extract proved effective at concentrations of 0.2 and 0.4 mg/mL in reducing inflammation and promoting skin healing, the concentration of 0.8 mg/mL exacerbated cutaneous morphological damage. Conversely, all tested concentrations (0.2, 0.4, and 0.8 mg/mL) caused histopathological damage to the liver, with the 0.4 mg/mL concentration being the most aggressive. While the extract contributes to the healing of skin lesions caused by ticks, it exhibits significant hepatic toxicity in the host.

Keywords: *Cannabis sativa*, wound healing, liver enzymes, host, *Rhipicephalus linnaei*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Equipamentos e locais de realização do estudo	19
3.2. Obtenção do extrato da <i>Cannabis sativa</i>	19
3.3. Obtenção das coelhas hospedeiras	19
3.4. Carrapatos	19
3.5. Confeção da câmara alimentadora (Bechara et al., 1995)	20
3.6. Infestação das coelhas com carrapatos <i>R. linnaei</i>	21
3.7. Preparo das diluições do extrato de <i>C. sativa</i>	21
3.8. Aplicação tópica das concentrações do extrato da <i>C. sativa</i> nas lesões da pele das coelhas pós-infestadas por carrapatos <i>R. linnaei</i>	22
3.9. Exposição do fígado de coelhas infestadas pelo carrapato <i>R. linnaei</i> e expostas as concentrações extrato de <i>C. sativa</i>	22
3.10. Análise bioquímica	23
3.11. Análise estatística	24
3.12. Análises morfológicas	24
3.12.1. Processamento das amostras da pele e do fígado das coelhas	24
3.12.2. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983)	24
3.13. Histoquímica do fígado das coelhas hospedeiras	25
3.13.1. Técnica do azul de bromofenol (Pearse, 1985)	25
3.13.2. Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983)	26
3.14. Confeção dos esquemas	26
4. RESULTADOS	27
Capítulo 1	28
Capítulo 2	60
5. CONCLUSÃO GERAL	99
6. REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826), também conhecida como carrapato-vermelho-do-cão, é uma linhagem tropical de *R. sanguineus* s.l. (Šlapeta et al., 2022), que tem como seu hospedeiro preferencial os canídeos. Esse artrópode está amplamente distribuído e, além dos danos causados pela espoliação de sangue e dos tecidos do seu hospedeiro, eles ainda atuam como transmissores de patógenos como a *Babesia canis* (babesiose) e a *Ehrlichia canis* (erliquiose) em cães e, em humanos, a *Rickettsia conorii* e a *R. rickettsii* que levam ao desenvolvimento de importantes patologias como a febre maculosa (Abreu et al., 2019; Dantas-Torres, 2008; Fonsêca et al., 2022).

As infestações por carrapatos, com suas diversas preferências de hospedeiros, representam não apenas um problema para a saúde animal, mas também é uma questão sanitária, e assim o seu controle passa muitas vezes pela utilização de agentes químicos que podem ser de natureza sintética ou mesmo extraído de plantas (Tadee et al., 2024; Gonzaga et al., 2023). Nesse cenário, cabe enfatizar que o uso contínuo de compostos com bases químicas sintéticas, embora seja eficaz, tem gerado o desenvolvimento de resistência nos carrapatos, o que compromete sua eficácia ao longo do tempo (Camargo-Mathias et al., 2018; Picot et al., 2022; Sunkara et al., 2021).

Na busca por estratégias de controle desses ectoparasitas, que sejam mais sustentáveis e menos prejudiciais tanto aos organismos não-alvos quanto ao meio ambiente, plantas com propriedades carrapaticidas têm despertado o interesse de pesquisadores, que vêm explorando o potencial de seus bioativos principalmente por meio de extratos brutos extraídos de diversas partes da planta, ou de óleos essenciais, atividade que já vem sendo estudada em laboratório e tem trazido resultados bastante animadores (Pereira et al., 2023; Quadros et al., 2020; Mabasa et al., 2021, Camargo-Mathias et al., 2024). Entre os estudos que tem focado nessa temática estão aqueles que já analisaram os óleos extraídos do neem (*Azadirachta indica*) (Remedio et al., 2016) e do açaí (*Euterpe oleraceae*) (Marques et al., 2019) e, mais recentemente, a *C. sativa* teve comprovado seu potencial carrapaticida, no controle de *R. linnaei* (carrapato do cão), destacando-se como uma abordagem inédita no combate a esse ectoparasita (Camargo-Mathias et al., 2024).

A *C. sativa* é uma planta que apresenta uma rica fonte de bioativos potentes e com múltiplas ações terapêuticas. Pertencente à família *Cannabaceae*, não é nativa do Brasil, sendo popularmente conhecida como "maconha". Sua comercialização se expandiu em diversos países devido às suas diversas propriedades, tanto na medicina humana quanto na veterinária (Gewehr, 2021; Miranda-Cortés et al., 2023). Historicamente, a *Cannabis* ganhou notoriedade pelo uso de suas fibras de cânhamo na fabricação de redes e cordas, além dos óleos extraídos de suas sementes, o que a tornou popular mundialmente. Na Índia, é utilizada no alívio de dores, ansiedade, náuseas, além de melhorar o apetite e o sono, com efeitos relaxantes e euforizantes reconhecidos (Chicoine et al., 2020). No Brasil, os benefícios dos bioativos presentes na *C. sativa* começaram a ganhar destaque no século XIX, após estudos divulgados pela Faculdade de Medicina de Tours, na França. Contudo, seu uso continua sendo um tema polêmico devido às questões éticas e legais, que agora começam a ser reguladas por leis específicas (Neto; Pierre; Fernandes, 2023; Martins et al., 2022).



Figura 1 (A-F): Fotografias da evolução das inflorescências femininas da planta *Cannabis sativa* ao longo de três semanas, segundo Punja e Holmes (2020).

Nas plantas do gênero *Cannabis*, são encontrados mais de 100 compostos fitocanabinoides sendo os principais: sendo os mais conhecidos o canabidiol (CBD), ácido canabidiólico (CBDA), terpenos, flavonoides e o tetra-hidrocarbinol (THC), esse último conhecido devido aos seus efeitos psicotrópicos e farmacológicos. Outro composto é o canabidiol (CBD), não psicotrópico, reconhecido pelas suas

propriedades farmacológicas/terapêuticas, tendo sido recentemente retirado da lista de substâncias proibidas pela ANVISA (Miranda-Cortés et al., 2023; Elsohly et al., 2017). Já o ácido canabidiólico (CBDA) também não psicoativo, é encontrado em abundância na inflorescência de diversas espécies da *Cannabis*. Esse fitoterápico possui também ações antiemética e ansiolítica (Vieira; Marques; Sousa, 2020).

O crescente interesse no uso terapêutico dos bioativos da *Cannabis* tem atraído a atenção de pesquisadores em diversas áreas, (Martins et al., 2022; Chicoine et al., 2020), visto seus bioativos estarem sendo também utilizados em tratamentos no combate a inflamações, dores, bem como atuando como imunomoduladores, tanto em humanos quanto em animais (Schoeman; Beukes; Frost, 2020; Vieira; Marques; Sousa, 2020). Como consequência, muitos tutores de animais domésticos estão buscando tratamentos alternativos que incluam medicamentos que sejam formulados a base de bioativos da *Cannabis*, devido aos seus já comprovados benefícios terapêuticos.

Registros da literatura tem demonstrado que o sistema endocanabinoide (SEC) desempenha um papel fundamental na regulação de respostas inflamatórias e imunológicas e, em estudos recentes mostrou-se que os receptores endocanabinoide tipo 1 (CB1) e endocanabinoide tipo 2 (CB2) são amplamente expressos na pele, bem como em outros tecidos (Tambeli; Martins; Barbosa; Machado, 2023; Miranda-Cortés et al., 2023). A ativação do receptor CB1 tem sido associada à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias nos queratinócitos, o que contribui para a proteção da barreira cutânea. Já a ativação do receptor CB2 promove na pele efeitos anti-inflamatórios, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, compostos presentes na *C. sativa*, como o tetra-hidrocarbinol (THC) e o canabidiol (CBD), têm mostrado interagir com o SEC, potencializando os efeitos terapêuticos no tratamento de condições dermatológicas tais como, a dermatite atópica (Žugić et al., 2024). Essas informações enfatizam o potencial terapêutico dos canabinóides na modulação de respostas inflamatórias cutâneas e na preservação da integridade da pele, abrindo caminho para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras para tratar condições dermatológicas específicas (Carvalho et al., 2020).

A pele é o maior órgão do corpo e desempenha um papel essencial como primeira linha de defesa contra agentes externos, bem como preserva a integridade

do ambiente interno dos animais. Quando tratamos de controle de infestações por carrapatos, a pele torna-se então o principal alvo, pois é aí que os mesmos realizarão o seu repasto sanguíneo (Hebling et al., 2012).

Histologicamente a pele está composta por duas camadas principais: a epiderme (mais externa) e a derme (mais interna), sendo que a primeira ainda está subdividida em vários estratos, a saber: o germinativo, composto por um epitélio cúbico simples, cujas células, podem ser consideradas como células tronco, visto que as mesmas se diferenciarão para dar origem aos outros estratos da epiderme. Na sequência, tem-se o estrato espinhoso, caracterizado por células poligonais com prolongamentos que formam pontes intercelulares; o estrato granuloso, cujas células contêm grânulos de querato-hialina que desempenham um papel na queratinização; o estrato lúcido, que apresenta células achatadas e translúcidas, encontrado principalmente em regiões de pele espessa; e o mais superficial, o estrato córneo, composto por células mortas, anucleadas e repletas de queratina, que formam uma barreira protetora contra o ambiente externo, conforme descrito por Junqueira e Carneiro, (2023).

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, camada composta majoritariamente por tecido conjuntivo denso não modelado, com a presença de fibroblastos que secretam as fibras colágenas e elásticas, proporcionando firmeza e elasticidade à pele (Junqueira; Carneiro, 2023; Aarestrup, 2015).

Ainda quando tratamos de controle de carrapatos fazendo uso de produtos químicos (sintéticos ou naturais), a maioria dos trabalhos sempre foca no ectoparasita, e pouca informação fica disponibilizada de se e como esses produtos afetam os hospedeiros. Uma vez que no sistema do hospedeiro, o órgão responsável pela metabolização de compostos exógenos é o fígado, torna-se interessante e até mesmo necessário analisar se o mesmo sofre algum tipo de alteração em resposta a exposição a esses produtos. O fígado é uma glândula que está composta principalmente por hepatócitos, células responsáveis por desempenhar funções essenciais ao organismo como a síntese proteica, produção de bile, metabolismo de carboidratos e lipídios, e desintoxicação, essencial para a manutenção da homeostase corporal, o que o torna um excelente biomarcador para demonstrar os efeitos de substâncias exógenas nos organismos, compreendendo assim o segundo objetivo a ser atingido no presente trabalho.

Em razão do acima exposto, um dos objetivos do presente trabalho foi o de avaliar se os extratos da *C. sativa* diluídos em diversas concentrações, teria ação cicatrizante sobre as lesões deixadas pelos carrapatos na pele de coelhas hospedeiras, por meio da exposição tópica dessas diferentes concentrações e verificando, via a aplicação de técnica histológica se e como esse processo de cicatrização ocorreria.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo desse trabalho foi o de realizar um estudo morfohistológico (pele e fígado) e bioquímico (sangue) para demonstrar se e quais seriam os efeitos da exposição de coelhas (simulando modelos hospedeiros de carrapatos) infestadas pelo carrapato-do-cão *R. linnaei* ao extrato da inflorescência da planta *C.sativa*, já comprovado ter ação carrapaticida.

2.2. Específicos

1. Avaliar se haveria respostas na cicatrização da pele das coelhas infestadas por *R. linnaei* e expostas topicamente ao extrato nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL, por meio da aplicação de técnica histológica (HE).

2. Avaliar se a exposição tópica ao extrato da *C. sativa* (carrapaticida) no processo de cicatrização das picadas, traria algum dano morfohistológico no fígado das coelhas infestadas, o que sinalizaria um efeito tóxico, por meio da aplicação de técnicas: histológica (HE) e histoquímicas (azul de bromofenol para detecção de proteínas totais e PAS, para detecção de polissacarídeos neutros).

3. Avaliar se, em decorrência do uso tópico do extrato, haveria alteração nas taxas das enzimas hepáticas TGO (aspartato aminotransferase) e TGP (alanina aminotransferase), por meio da realização de ensaios bioquímicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e locais de realização do estudo

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP. Nesta instituição, está implantada a **Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM)**, onde vem sendo mantidas colônias de carrapatos, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

3.2. Obtenção do extrato da *Cannabis sativa*

O extrato utilizado para a realização deste trabalho foi cedido, pela Associação Canábica Maria Flor, localizada na cidade de Marília, São Paulo, e que tem como supervisora técnica a Dra. Caroline Marroni Cremonez.

3.3. Obtenção das coelhas hospedeiras

Foram utilizadas 18 coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu, com quatro meses de idade, pesando entre 2,5 a 3,0 Kg, e que não tiveram contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério Central da UNESP/Botucatu, (SP). Para realização dos bioensaios as mesmas foram divididas em seis grupos (3 coelhas/grupo).

Os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA do Instituto de Biociências, UNESP – câmpus de Rio Claro, SP), decisão n. 13/2023.

3.4. Carrapatos

Foram utilizados 15 casais de carrapatos *R. linnaei*, obtidos de colônias estabelecidas e mantidas em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP, e que permaneceram em jejum no interior de seringas plásticas que tiveram a abertura do êmbolo vedada com algodão levemente umedecido, até o momento da infestação nas coelhas.

3.5. Confeção da câmara alimentadora (Bechara et al., 1995)

A confecção das câmaras alimentadoras seguiu o protocolo de Bechara et al., (1995). Foi cortado um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro que posteriormente foi revestido com tecido de algodão. Em seguida, a face revestida foi aderida com cola atóxica à pele (tosada dorsalmente) da hospedeira. Após, colocou-se um tubo plástico (tipo coletor universal) com 2 cm de altura, com a parte inferior removida, que foi fixado no dorso da coelha e vedado interna e externamente com cola atóxica e esparadrapo. A tampa que posteriormente seria colocada no coletor foi perfurada para entrada de ar e consequente oxigenação dos carrapatos *R. linnaei* (Fig. 2).

As câmaras permaneceram destampadas pelo período de 24 horas para secagem da cola, para só então serem depositados os carrapatos.



Figura 2 (A-H): Fotografias mostrando os vários passos dos procedimentos realizados no dorso das coelhas hospedeiras durante a infestação por *R. linnaei*, segundo Hebling, (2011) e Bechara et al. (1995).

3.6. Infestação das coelhas com carrapatos *R. linnaei*

Os 15 casais de carrapatos *R. linnaei*/câmara de alimentação, ali permaneceram pelo período de 7 dias, tempo necessário para que ocorresse a fixação dos ectoparasitas para início da alimentação.

3.7. Preparo das diluições do extrato de *C. sativa*

O extrato bruto da inflorescência da *C. sativa* foi diluído em azeite de oliva (solvente) para obtenção de concentrações de THC que fossem inferiores a 0,2%. As diluições foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro (UNESP/Araraquara) segundo os procedimentos:

1. Foi diluído 0,2 mg/mL do extrato bruto da *C. sativa* em 100 mL de azeite, para obtenção da concentração final de 0,05% de THC.
2. Foi diluído 0,4 mg/mL do extrato bruto da *C. sativa* em 100 mL de azeite, para obtenção da concentração final de 0,1% de THC.
3. Foi diluído 0,8 mg/mL do extrato bruto da *C. sativa* em 100 mL de azeite, para obtenção da concentração final de 0,2% de THC.

Após a realização das diluições garantiu-se que o produto final estivesse em conformidade com as regulamentações exigidas pela ANVISA, que estabelece um limite máximo permitido de THC de 0,2%.

As diluições foram baseadas naquelas propostas por Sangiovanni et al., (2019), autores que testaram o potencial cicatrizante e anti-inflamatório da *C. sativa* em células em cultura.

Cabe enfatizar que no presente trabalho o objetivo não foi realizar um ensaio clínico, visto que este exigiria a aprovação de órgãos federais regulamentadores, mas sim testar as diluições propostas, em laboratório, para se confirmar a efetividade na cicatrização das lesões na pele das coelhas que simularam hospedeiros de carrapatos do cão, sem trazer às mesmas prejuízos hepáticos.

3.8. Aplicação tópica das concentrações do extrato da *C. sativa* nas lesões da pele das coelhas pós-infestadas por carrapatos *R. linnaei*

Após 7 dias, quando os carrapatos estavam completamente ingurgitados e se desprenderam do hospedeiro, observou-se no local da fixação (picada) uma lesão cutânea. Nesse local, aplicou-se topicamente 1 mL do azeite e das concentrações do extrato das inflorescências da *C. sativa* (nas diluições preparadas) diariamente, durante 7 dias consecutivos, nos seguintes grupos:

- **Não Infestadas (GNI);**
- **Infestadas e não expostas ao extrato *C. sativa* (GINT);**
- **Pós infestadas e expostas topicamente ao azeite (GPA);**
- **Pós infestadas e expostas topicamente à 0,2 mg/mL do extrato (GT02);**
- **Pós infestadas e expostas topicamente à 0,4 mg/mL do extrato (GT04);**
- **Pós infestadas e expostas topicamente à 0,8 mg/mL do extrato (GT08).**

3.9 Exposição do fígado de coelhas infestadas pelo carrapato *R. linnaei* e expostas às concentrações do extrato de *C. sativa*.

- **Controle (GC):** Foi aplicado apenas 1 mL do azeite (que serviu como solvente)
- **Tratado 1 (GT1):** Foi aplicado extrato diluído a 0,2 mg/mL.
- **Tratado 2 (GT2):** Extrato diluído a 0,4 mg/mL.
- **Tratado 3 (GT3):** Extrato diluído a 0,8 mg/mL.

O monitoramento dos animais expostos de todos os grupos deu-se diariamente, quando também foram realizados registros de imagens para acompanhamento da evolução do processo de cicatrização (Fig. 3).

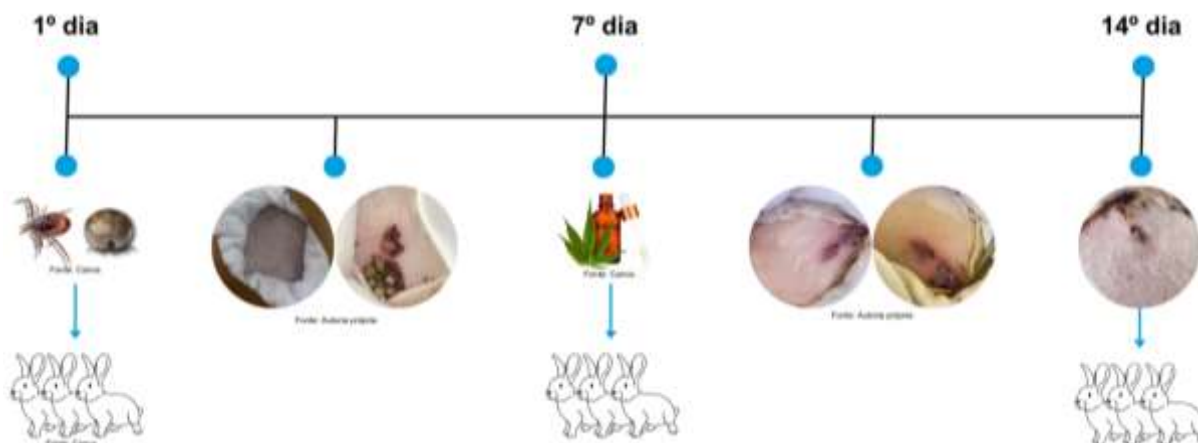


Figura 3: Delineamento experimental do bioensaio. Do 1º ao 7º dia, as coelhas foram infestadas por carrapatos *R. linnaei*. No 7º dia, após o desprendimento dos carrapatos, iniciou-se o tratamento tópico com azeite puro e com as diluições da *Cannabis sativa* diluída em azeite nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL, que foi mantido até o 14º dia.

3.10. Análise bioquímica

Foram realizados exames bioquímicos, para avaliação das enzimas hepáticas TGO (aspartato aminotransferase) e TGP (alanina aminotransferase) após a exposição às diferentes concentrações do extrato da inflorescência da *Cannabis*. Para tanto foi coletado sangue nos dias:

- **D0:** 1º dia antes da infestação das coelhas pelos carrapatos *R. linnaei*;
- **D1:** 7º dia após o desprendimento dos carrapatos e 1º dia da exposição das concentrações do extrato *C. sativa*;
- **D2:** 14º dia após desprendimento dos carrapatos e 7º dia após a exposição às concentrações do extrato de *C. sativa*.

A coleta foi realizada pela médica veterinária Brunna Fernanda Arraez Alves, CRMV nº 59838, via punção jugular, para extração de 2 mL de sangue/coelha, com auxílio de seringa de 3 mL e agulha 25x0,08mm (estéril) e acondicionamento em tubos secos da marca Vacuntainer® contendo gel separador.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório CEDIVET localizado na cidade de Rio Claro-SP, sob a responsabilidade das médicas veterinárias Tamara

Maria Franzin Julio, CRMV nº 20.137 e Tassiana Ferreira de Mello, CRMV nº 31.267, que fizeram uso do aparelho URIT 8031 (analisador automático bioquímico e turbidimétrico), com auxílio de reagentes da marca Bioclin® seguindo os protocolos do fabricante.

3.11. Análise estatística

Os dados das enzimas hepáticas foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e posteriormente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. Em seguida, estes dados foram analisados por meio do teste ANOVA/Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Estas análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0®.

3.12. Análises morfológicas

3.12.1. Processamento das amostras da pele e do fígado das coelhas

Após completados os bioensaios, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP, foi realizada a eutanásia das coelhas pela médica veterinária Brunna Fernanda Arraez Alves, CRMV nº 59838, fazendo uso da ketamina e xilazina, via intraperitoneal nas dosagens de 300 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, para coleta dos fragmentos da pele e do fígado.

3.12.2. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983).

Depois de coletados, os fragmentos da pele e do fígado foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4°C. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico a 70%-95% (banhos de 30 minutos cada), foi embebido em historesina Leica® por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo

historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após, os blocos foram seccionados (3 µm de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e coradas pela hematoxilina de Harris durante oito minutos. Depois de lavadas por três minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, foram mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro - SP.

3.13. Histoquímica do fígado das coelhas hospedeiras

3.13.1. Técnica do azul de bromofenol (Pearse, 1985)

Para detecção de proteínas totais, fragmentos do fígado das hospedeiras foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%-95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica® por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após esse processo, os blocos foram seccionados (3 µm de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas para posterior coloração pelo azul de bromofenol, por uma hora, à temperatura ambiente. Após serem passadas em ácido acético 0,5% por 5 minutos e lavadas em água corrente por 15 minutos, as mesmas passaram rapidamente pela solução de álcool butílico terciário. A seguir, as lâminas contendo as secções foram secas ao ar livre e foram mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.13.2. Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983).

Para a detecção de polissacarídeos neutros, fragmentos do fígado das hospedeiras foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4°C. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Depois foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%-95%) em banhos de 30 minutos cada. Na sequência, foram embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit). Após, os blocos foram seccionados (3 µm de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Após, foram lavadas em água destilada por 1 minuto e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Foram lavadas por 30 minutos em água corrente, secas à temperatura ambiente, mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.14. Confeção dos esquemas

Os esquemas apresentados no Capítulo 1 (Figuras 3C, F, I e Figuras 4C, F, I) e no Capítulo 2 (Figura 2) foram obtidos a partir de imagens histológicas e foram confeccionados utilizando os programas Graphics Suite 2023 e Canva Create 2023. A confecção foi realizada por Odaiza da Silva e com o auxílio do designer Dennis Anderson Kinote de Araújo.

4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo são apresentados em dois capítulos, cada um composto por artigos em elaboração para submissão em periódicos internacionais, especializados e reconhecidos na área de estudo.

Capítulo 1:

Silva, Odaiza da; Sapatini, Davy; Rodrigues, Milena de Lima; Santos, Eduardo Libanio Reis; Costa, Tito Mansilha da; Camargo-Mathias, Maria Izabel. **Uso do extrato da *Cannabis sativa* como cicatrizante de lesões mecânicas na pele de coelhas hospedeiras infestadas pelo carrapato do cão *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826): Análise histológica**

Situação: Em preparação.

Capítulo 2:

Silva, Odaiza da; Sapatini, Davy; Rodrigues, Milena de Lima; Evangelista, Bárbara Fernanda; Vicente, Brenda dos Santos; Marques, Adriana de Souza; Leitão, Maria Luiza de Jesus; Lancia, Beatriz Carvalho. **Extrato da planta *Cannabis sativa*: uso como cicatrizante de lesões mecânicas provocadas pela infestação do carrapato do cão *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826), análise bioquímica (sangue) e histopatológica (fígado) do potencial tóxico desse bioativo em coelhas hospedeiras.**

Situação: Submetido.

Capítulo 1

Uso do extrato da *Cannabis sativa* como cicatrizante de lesões mecânicas na pele de coelhas hospedeiras infestadas pelo carrapato do cão *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826): Análise histológica

Odaiza da Silva^a; Davy Sapatini^a; Milena de Lima Rodrigues^a; Eduardo Libanio Reis Santos^a; Tito Mansilha da Costa Mina; Livia Maria Almeida Barros da Silva^a; Maria Izabel Camargo-Mathias^{a*}.

^a Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.

RESUMO

O controle de carrapatos de forma sustentável, sem prejudicar o meio ambiente e os organismos não-alvos, é uma necessidade crescente, especialmente para o *Rhipicephalus linnaei* (carrapato do cão), que causa doenças em humanos e animais. Como alternativa surge o uso de bioativos de plantas com potencial carrapaticida, incluindo aqueles extraídos da *Cannabis sativa*. No presente trabalho o objetivo foi o de avaliar por meio de técnica histológica o potencial cicatrizador de várias concentrações (0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL) do extrato da inflorescência dessa planta, sobre as lesões mecânicas resultantes das picadas dessa espécie de carrapatos na pele de coelhas simulando hospedeiros. Para tanto as coelhas foram divididas em grupos, e os resultados encontrados em cada um deles foram: grupo controle GNI (coelhas que não foram infestadas), a pele permaneceu íntegra; grupo GINT (infestadas e não expostas aos extratos) exibiu um processo inflamatório intenso com proliferação celular na epiderme e formação de edema na derme; grupo GPA (infestado e exposto ao azeite), apresentou resultados semelhantes aos encontrados no GINT, ou seja, o azeite não diminuiu o processo inflamatório nem na epiderme nem na derme; grupo GT02 (infestado e exposto a 0,2 mg/mL), a epiderme permaneceu desorganizada, com a presença de estruturas translúcidas (lipídeos) por entre os estratos e espessamento do estrato córneo. A derme manteve-se íntegra, houve redução da inflamação, mas sem cicatrização completa; grupo GT04 (infestado e exposto a 0,4 mg/mL), a epiderme se recompôs e se espessou, houve aumento de estruturas arredondadas e translúcidas, principalmente nos estratos superficiais. A derme estava íntegra, apenas com pequenas áreas de edema e a inflamação foi reduzida; GT08 (infestado e exposto a 0,8 mg/mL), essa concentração aumentou os danos das lesões, a epiderme perdeu sua estrutura organizada, sofreu em afinamento e a inflamação persistiu. Portanto, as concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL de *C. sativa* tiveram ação anti-inflamatória e cicatrizante. A concentração de 0,8 mg/mL, além de não reduzir, potencializou os danos cutâneos.

Palavras-chaves: *Rhipicephalus linnaei*, extrato, *Cannabis sativa*, epiderme, cicatrização.

ABSTRACT

The sustainable control of ticks, without harming the environment and non-target organisms, is a growing need, especially for *Rhipicephalus linnaei* (the dog tick), which causes diseases in humans and animals. An alternative for this is the use of plant-derived bioactives with acaricidal potential, including those extracted from *Cannabis sativa*. The aim of this study was to evaluate, through histological techniques, the healing potential of various concentrations (0.2, 0.4, and 0.8 mg/mL) of the inflorescence extract of this plant on mechanical lesions caused by tick bites of this species on the skin of rabbits, simulating hosts. The rabbits were divided into groups, and the results found in each were: control group GNI (rabbits not infested), the skin remained intact; group GINT (infested and not exposed to the extracts) exhibited an intense inflammatory process with cellular proliferation in the epidermis and edema formation in the dermis; group GPA (infested and exposed to olive oil) showed similar results to GINT, meaning the olive oil did not reduce the inflammatory process in either the epidermis or dermis; group GT02 (infested and exposed to 0.2 mg/mL) showed a disorganized epidermis, with the presence of translucent structures (lipids) between the layers and thickening of the stratum corneum. The dermis remained intact, inflammation was reduced, but healing was not complete; group GT04 (infested and exposed to 0.4 mg/mL) showed epidermal reconstruction and thickening, with an increase in rounded and translucent structures, mainly in the superficial layers. The dermis was intact, with only small areas of edema and reduced inflammation; GT08 (infested and exposed to 0.8 mg/mL) showed increased lesion damage, with a loss of organized epidermal structure, thinning, and persistent inflammation. Therefore, concentrations of 0.2 and 0.4 mg/mL of *C. sativa* had anti-inflammatory and healing effects. The 0.8 mg/mL concentration, in addition to not reducing, exacerbated skin damage.

Keywords: *Rhipicephalus linnaei*, extract, *Cannabis sativa*, epidermis, healing.

1. INTRODUÇÃO

Infestações por carrapatos em animais vertebrados, das mais variadas espécies, visto as mesmas terem preferência por diversos hospedeiros, tem sido consideradas um problema de saúde animal, bem como sanitário, visto que esses ectoparasitas, além da espoliação dos hospedeiros preferenciais, ainda transmitem aos animais e ao homem diversos agentes infecciosos (Šlapeta; Chandra; Halliday, 2021), o que leva à busca por estratégias de controle que garantam aos animais uma melhor qualidade de vida e, aos organismos não alvos uma menor exposição e consequente menores efeitos colaterais causados pelos químicos, normalmente de origem sintética. Embora esses compostos sintéticos sejam eficazes no controle dos ectoparasitas, eles, via seu uso contínuo e muitas vezes de forma inadequada, levam ao desenvolvimento de resistência nos carrapatos, resultando em diminuição da sua eficácia ao longo do tempo (Camargo-Mathias et al., 2018; Picot et al., 2022).

Os carrapatos para poderem realizar o seu repasto sanguíneo precisam se fixar à pele dos hospedeiros (onde ali permanecem por cerca de 7 dias, Hebling et al., 2012), o que provoca lesões mecânicas acompanhadas de inflamações cutâneas, também causando um desconforto para os animais. Essas lesões podem ser bem observadas quando se trata dos cães hospedeiros, parasitados pelo *Rhipicephalus linnaei*, animais “pets” hoje considerados membros das famílias e que preocupam muito os seus tutores, quando a infestação se dá em nível significativo.

Estudiosos do assunto têm buscado insistentemente alternativas para o controle dos ectoparasitas, sendo que uma delas está baseada no uso de carrapaticidas formulados a partir de bases naturais e frequentemente derivados de plantas (extratos, óleos essenciais) (Pereira et al., 2023; Silva et al., 2023; Camargo-Mathias et al., 2018). Das plantas ricas em compostos bioativos com ação carrapaticida, muitas delas já são tradicionalmente usadas informalmente pelas populações locais, e com as finalidades mais diversas, incluindo no combate à doenças (Quadros et al., 2020; Nwanade et al., 2020).

Sob essa perspectiva plantas da espécie *Cannabis sativa*, tem sido alvos de estudos devido às mesmas serem uma rica fonte de bioativos com potencial carrapaticida (Camargo-Mathias et al., 2024). São plantas herbáceas encontradas

em regiões temperadas e tropicais ao redor do mundo (Malabadi et al., 2023), pertencentes à família *Cannabaceae* e popularmente conhecidas como 'maconha'. Trabalhos que fizeram uso dos bioativos delas extraídos já comprovaram sua potencialidade o que levou a aprovação de sua comercialização devido as suas muitas propriedades terapêuticas (anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras) (Kumar et al., 2021; Tambeli; Martins; Barbosa; Machado, 2023; Odieka et al., 2022), tanto na medicina humana quanto na veterinária (Peixoto et al., 2020; Miranda-Cortés et al., 2023), em vários países do mundo.

A pele dos animais hospedeiros, que é o órgão-alvo dos ectoparasitas para a realização de seu repasto sanguíneo, é o maior órgão do corpo e desempenha papel fundamental como a primeira linha de defesa contra agentes externos. Esse órgão está composto por duas camadas principais: a epiderme e a derme, sendo a epiderme a mais externa, composta por células tronco (estrato germinativo) que à medida que vão se diferenciando se organizam em um epitélio estratificado que protege o corpo da ação de fatores externos, devido a sua alta queratinização, o que previne a desidratação e protege contra o atrito. Nesse epitélio, além do estrato germinativo podem ser distinguidos: o espinhoso, o granuloso, o lúcido e o córneo, este último formado por células mortas e queratinizadas. Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, camada composta basicamente por fibras colágenas e elásticas que conferem firmeza e elasticidade à pele (Junqueira; Carneiro, 2023; Aarestrup, 2015).

A pele contém todos os componentes do Sistema Endocanabinoide (ECS), responsável pela regulação do sistema nervoso central e do sistema imunológico. Além disso, também abriga receptores específicos e enzimas que são responsáveis pela produção e degradação das moléculas endocanabinoides (Osafo; Yeboah; Antwi, 2021).

Como mencionado anteriormente, as lesões mecânicas provocadas pelas picadas dos carrapatos deixam na pele dos hospedeiros feridas que tem no seu entorno severas inflamações e cujo processo de cicatrização torna-se essencial para a recuperação e manutenção da integridade cutânea (Styrczewska et al., 2015). Cabe ressaltar que processos de cicatrização de feridas são caracterizados por três fases principais: a inflamação, a proliferação e a remodelação tecidual e, receptores

canabinóides CB1 e CB2 estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas por meio da ativação de vias receptoras específicas e da regulação de fatores anti-inflamatórios. Esses receptores, apesar das recentes descobertas, ainda não foram clinicamente estabelecidos como eficientes no tratamento de lesões, área essa que ainda exibe lacunas de informação que precisam ser preenchidas por resultados de estudos que abordem essa temática (Styrczewska et al., 2015; Zheng et al., 2022; Shao, Stewart e Grant-Kels, 2021; Ferreira et al., 2023).

Produtos à base de CBD já foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Contudo, a maioria dos estudos clínicos e dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado, demonstram os efeitos do CBD e de outros canabinóides quando administrados por ingestão, inalação ou injeção, havendo ainda poucos estudos direcionados às informações resultantes de estudos que fizeram aplicações tópicas. De acordo com a literatura disponível, o uso tópico de canabinóides traz benefícios relevantes tanto no tratamento de doenças dermatológicas quanto na melhoria da saúde cutânea (Baswan et al., 2020; Casiraghi et al., 2020; Lu e Mackie, 2021; Shao, Stewart e Grant-Kels, 2021). Essas formulações para aplicação tópica oferecem vantagens, como a baixa toxicidade com consequente menor efeito colateral. Elas podem ser administradas em doses reduzidas e com intervalos mais longos, além de possibilitarem, sem grandes complicações a interrupção imediata do tratamento, quando necessário. A via tópica também é mais confortável e menos invasiva, o que pode aumentar a adesão ao tratamento e melhorar sua eficácia terapêutica (Mahmoudinoodezh et al., 2022; Ferreira et al., 2023; Junaid et al., 2022).

Embora o uso tópico dos canabinóides traga benefícios, as informações sobre sua absorção transcutânea ainda são escassas. Devido à natureza altamente hidrofóbica desses compostos, a penetração dos mesmos na epiderme fica restrita devido a diversos fatores, o que promove a difusão de forma mais lenta. Além disso, o CBD, devido a sua alta lipofilicidade favorece a formação de depósitos de lipídeos no estrato córneo da pele, o que dificulta a penetração nas camadas mais profundas, problema esse que ainda exige a busca de estratégias de permeação

que otimizem a eficácia do CBD em formulações tópicas (Chayasirisobhon, 2021; Torabi; Madsen; Skov, 2024).

O presente trabalho teve como objetivos trazer à luz informações sobre o uso tópico desse extrato da *C. sativa*, quando aplicado na pele de coelhas (simulando os animais hospedeiros) infestadas por carrapatos da espécie *R. linnaei* (carrapato do cão), cuja fixação dos ectoparasitas deixa na pele lesões mecânicas decorrentes das picadas e que sempre são acompanhadas de muita inflamação no tecido cutâneo adjacente, o que traz desconforto para os hospedeiros. Os resultados dessa avaliação serão obtidos e demonstrados por meio da aplicação de técnicas histopatológicas que indicarão se e como o uso tópico desse extrato, diluído nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL atuará sobre o processo de cicatrização da pele, informações que poderão auxiliar na diminuição dos danos dermatológicos nos animais hospedeiros, conferindo-lhes uma melhor qualidade de vida, com a vantagem ainda de serem de administração menos invasiva do que aqueles medicamentos que são injetáveis ou mesmo administrados via oral.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo histológico da pele de coelhas infestadas pelo carrapato do cão *R. linnaei*, (simulando modelos hospedeiros de carrapatos), expostas às concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL do extrato da inflorescência de *C. sativa*, para avaliar se os mesmos seriam potencialmente efetivos no processo de cicatrização das lesões mecânicas deixadas pelas picadas, durante o processo de repasto sanguíneo do ectoparasita.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e locais de realização do estudo

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP. Nesta instituição, está implantada a **Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM)**, onde vem sendo mantidas colônias de carrapatos, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

3.2. Obtenção do extrato da *Cannabis sativa*

O extrato bruto da inflorescência da *C. sativa* foi cedido, pela Associação Canábica Maria Flor, localizada na cidade de Marília, São Paulo, que tem como supervisora técnica a Dra. Caroline Marroni Cremonez.

3.3. Obtenção das coelhas hospedeiras

Foram utilizadas 18 coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu, com quatro meses de idade, pesando entre 2,5 a 3,0 Kg, e que não tiveram contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério Central da UNESP/Botucatu, (SP).

Para realização dos bioensaios as coelhas foram divididas em seis grupos (3 coelhas/grupo), a saber:

- Não Infestadas (GNI);
- Infestadas e não expostas ao extrato da *C. sativa* (GINT);
- Pós infestadas e expostas topicamente ao azeite (GPA);
- Pós infestadas e expostas topicamente à 0,2 mg/mL do extrato (GT02);
- Pós infestadas e expostas topicamente à 0,4 mg/mL do extrato (GT04);
- Pós infestadas e expostas topicamente à 0,8 mg/mL do extrato (GT08).

Os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA do Instituto de Biociências, UNESP – câmpus de Rio Claro, SP), decisão n. 13/2023.

3.4. Carrapatos

Foram utilizados 15 casais de carrapatos *R. linnaei*/câmara de alimentação, obtidos de colônias estabelecidas e mantidas em estufa BOD em condições

controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP, e que permaneceram em jejum no interior de seringas plásticas com a abertura do êmbolo vedada com algodão levemente umedecido, até o momento da infestação nas coelhas. Os carrapatos permaneceram pelo período de 7 dias nas câmaras, tempo necessário para que ocorresse a fixação dos mesmos e início da alimentação.

3.5. Confecção da câmara alimentadora (Bechara et al., 1995)

Para tanto foi seguido o protocolo descrito por Bechara et al., (1995), cortando-se um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro que foi revestido com tecido de algodão. A face revestida foi aderida com cola atóxica à pele (tosada dorsalmente) da coelha. Após, colocou-se um tubo plástico (tipo coletor universal) com 2 cm de altura, com a parte inferior removida, que foi fixado no dorso e vedado interna e externamente com cola atóxica e esparadrapo. A tampa foi perfurada para entrada de ar e consequente oxigenação dos carrapatos *R. linnaei* (**Fig. 1**).

Antes do início dos bioensaios as câmaras permaneceram destampadas pelo período de 24 horas para secagem da cola.



Figura 1 (A-H): Fotografias mostrando o procedimento de infestação por *R. linnaei* em coelhas (Hebling, 2011; Bechara et al., 1995).

3.6. Preparo das diluições do extrato de *C. sativa*

O extrato bruto da inflorescência da *C. sativa* foi diluído (baseado em estudo prévio realizado por Sangiovanni et al., 2019), em azeite para obtenção de concentrações de THC que fossem inferiores a 0,2% (exigência da ANVISA). As diluições foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro (UNESP/Araraquara). Desta forma foram obtidas as seguintes concentrações de THC: 0,05%; 0,1% e 0,2% (**Fig. 2**).

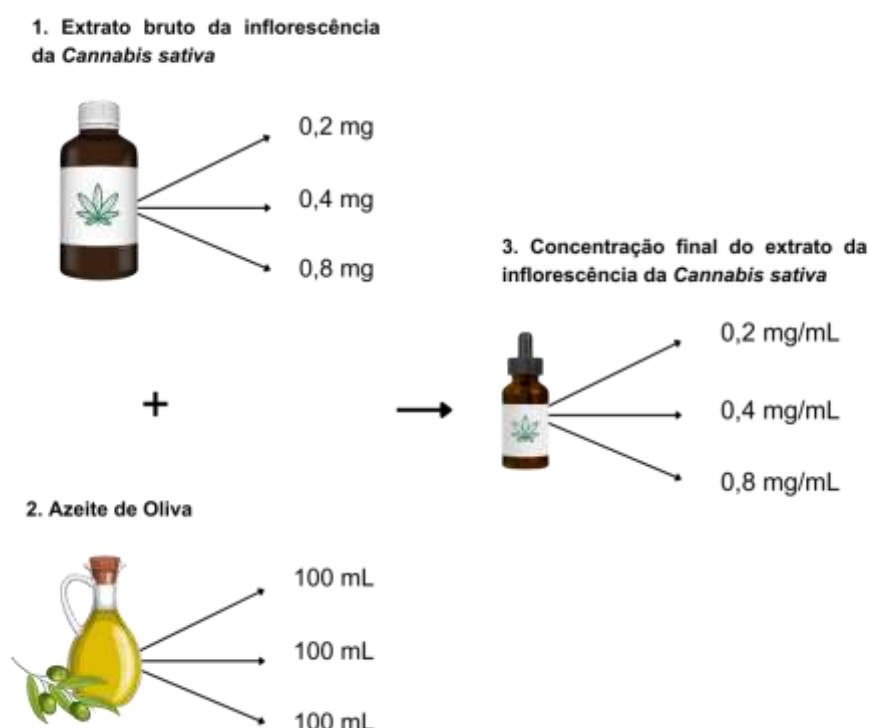


Figura 2: Esquema mostrando como as diluições do extrato foram preparadas para a obtenção das concentrações de 0,2 (0,05% THC); 0,4 (0,1% THC) e 0,8 (0,2% THC) mg/mL (Autoria própria).

3.7. Aplicação tópica das diferentes concentrações do extrato da inflorescência da *C. sativa* nas lesões de pele das coelhas pós-infestadas por carrapatos *R. linnaei*

Após 7 dias, quando os carrapatos estavam completamente ingurgitados e se desprenderam do hospedeiro, no local da pele onde estavam fixados (picada) ficou uma lesão sobre a qual aplicou-se topicamente 1 mL do azeite e das diluições do extrato da inflorescência da *C. sativa*, ao longo de 7 dias, segundo os grupos descritos no item **3.3**.

O monitoramento dos animais expostos em todos os grupos deu-se diariamente, quando também foram realizados registros de imagens para acompanhamento da evolução do processo de cicatrização.

3.8. Análises morfológicas

3.8.1. Obtenção das amostras da pele das coelhas

Após o término dos bioensaios, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP, foi realizada a eutanásia das coelhas pela médica veterinária Brunna Fernanda Arraez Alves, CRMV nº 59838, fazendo uso da ketamina e xilazina, via intraperitoneal nas dosagens de 300 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, para coleta de fragmentos da pele.

3.8.2. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983).

Depois de coletados, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4°C. Em seguida, foram transferidos para tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico a 70%-95% (banhos de 30 minutos cada), foi embebido em historesina Leica® por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após, os blocos foram seccionados (3 µm de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas que foram posteriormente reidratadas por 1 minuto em água destilada e coradas pela hematoxilina de Harris durante oito minutos. Depois de lavadas por três minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, foram mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro - SP.

3.9. Confeção dos esquemas

Os esquemas apresentados no Capítulo 1 (Figuras 3C, F, I e Figuras 4C, F, I) foram obtidos a partir de imagens histológicas e foram confeccionados utilizando os programas Graphics Suite 2023 e Canva Create 2023. A confecção foi realizada por Odaiza da Silva e com o auxílio do designer Dennis Anderson Kinote de Araújo.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia e Histologia da Pele

No presente estudo, foram obtidos resultados que mostraram as alterações que ocorrem na morfohistologia da pele de coelhas, utilizadas como modelos hospedeiros de *R. linnaei*, quando infestadas por essa espécie de carrapatos, em diferentes situações (bioensaios) e consequentemente, em diferentes grupos. Assim sendo, foram realizadas análises que mostraram como fica a organização das camadas epidérmica e dérmica da pele, de acordo com os vários estágios da infestação, bem como a ação da aplicação tópica de diversas concentrações (0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL diluídas em azeite) do extrato das inflorescências da *C. sativa* sobre as picadas.

Todas as coelhas dos grupos experimentais que foram infestadas pelos carrapatos *R. linnaei*, tiveram os ectoparasitas fixados na sua pele pelo período de 7 dias. Após, procedeu-se a aplicação tópica das diferentes concentrações do extrato, também por um período de 7 dias consecutivos.

4.1.1. Coelhas não infestadas (GNI)

No grupo GNI, as coelhas não foram infestadas por carrapatos e consequentemente não tiveram sua pele lesionada (Fig. 3A). Sendo assim o tegumento permaneceu com características de integridade (Figs. 3B-C), ou seja, o estrato germinativo apresentou células dispostas num epitélio simples e com morfologia semelhante àquela descrita na literatura. Na ausência de lesões no epitélio, todos os outros estratos também se mantiveram íntegros (Fig. 3 B).

Assim como a epiderme a derme também não apresentou alterações, estando constituída por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e fibroblastos, estes sendo evidenciados pelos seus núcleos (Fig. 3B).

4.1.2. Coelhas infestadas e não expostas (GINT)

No grupo GINT, pode-se observar macroscopicamente que a pele ao redor da fixação dos ectoparasitas apresentou vermelhidão, característica de intensa inflamação provocada pelas lesões das picadas (Fig. 3D). A histologia mostrou que uma intensa desorganização do estrato germinativo no local das picadas, o qual deixou de ser um epitélio simples e passou a ser um epitélio estratificado nessas regiões. Observou-se também que as células epiteliais pareceram sofrer uma hipertrofia, com aumento inclusive de seus núcleos (Figs. 3E-F).

Na derme, foi observada uma proliferação considerável de vasos sanguíneos (Fig. 3E), bem como a formação de edema subepidérmico, onde por entre as fibras colágenas pode-se observar a formação de espaços que certamente foram ocupados por fluído do edema, caracterizando aí um extenso processo inflamatório (Fig. 3E).

4.1.3. Coelhas pós infestação e expostas topicamente por azeite (GPA)

No grupo GPA, as coelhas depois da retirada dos carrapatos, foram expostas topicamente apenas ao azeite (Fig. 3G) que aqui foi utilizado como solvente. A epiderme no local das picadas apresentou modificações que culminaram na desorganização do estrato germinativo, bem como daqueles subsequentes (Figs. 3H-I).

Na derme dessas coelhas foram observadas alterações como a própria persistência do edema, assim como no grupo anterior, o que provavelmente provocou a persistência do processo inflamatório. Como já era de se esperar, a aplicação tópica do azeite sobre as lesões das picadas não trouxe benefícios para o processo de cicatrização das mesmas (Fig. 3I).

4.1.4. Coelhas pós infestação e expostas topicamente por 0,2 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT02)

No grupo GT02 (Fig. 4A) as coelhas pós infestadas pelo *R. linnaei*, foram topicamente expostas com 0,2 mg/mL da *Cannabis*, para se observar o processo de

cicatrização das lesões. Os resultados mostraram que o processo inflamatório na pele diminuiu sensivelmente (Figs. 4B-C), muito embora a histologia tenha confirmado que o dano causado pela picada na epiderme persistiu, ou seja, o epitélio nesse local ficou desorganizado (Fig. 4B), bem como nele notou-se o surgimento de pequenas estruturas translúcidas e arredondadas que provavelmente sejam de natureza lipídica, distribuídas aleatoriamente pela epiderme. O estrato córneo foi também significativamente aumentado em espessura (Fig. 4B) indicando uma modificação na taxa de renovação celular e na descamação das células (Fig. 4B).

A derme apresentou-se dentro dos padrões normais, sugerindo que o extrato aplicado topicamente possa ter atuado sobre o processo inflamatório, diminuindo sua intensidade (Fig. 4B).

4.1.5. Coelhas pós infestação e expostas topicamente por 0,4 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT04)

No grupo GT04, as coelhas foram expostas topicamente pelo extrato da *Cannabis* na concentração de 0,4 mg/mL e apresentaram macroscopicamente uma sensível cicatrização e total desaparecimento do processo inflamatório (vermelhidão) nesses locais (Fig. 4D). A histologia mostrou que o epitélio se recompôs, de maneira geral, muito embora tenha sofrido um leve espessamento (Figs. 4E-F). O estrato germinativo apresentou células tronco distribuídas num epitélio simples, como é o esperado e descrito na literatura (Fig. 4E). Também na epiderme, como observado (em menor intensidade) no grupo anterior, aqui houve um aumento significativo das estruturas translúcidas e arredondadas, provavelmente de natureza lipídica, também dispostas aleatoriamente por entre as células dos estratos epidérmicos, preferencialmente por entre os estratos mais superficiais (Figs. 4B e 4E). O estrato córneo, também sofreu um espessamento, esperado dentro do processo de cicatrização (Fig. 4E).

A derme de forma geral mostrou-se recomposta, com apenas pequenas regiões com restos de edema e do processo inflamatório (Fig. 4E).

4.1.6. Coelhas pós infestação e expostas topicamente por 0,8 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT08)

No grupo GT08 as coelhas foram expostas topicamente ao extrato da *Cannabis* na concentração de 0,8 mg/mL (Fig. 4G). Os resultados mostraram que já nas imagens macroscópicas essa concentração foi a menos eficaz na redução da inflamação resultante das picadas dos carrapatos. Histologicamente observou-se que a epiderme desses animais foi completamente desorganizada, diminuindo inclusive sua espessura (Figs. 4H-I). As imagens mostraram que o estrato germinativo, pode às vezes ainda ser observado, porém, os outros estratos desapareceram (Fig. 4H). Houve um espessamento do estrato córneo, principalmente na região da picada, o que não foi observado no resto da pele (Fig. 4H). Nesse grupo não foram mais observadas na epiderme a presença das estruturas lipídicas (Fig. 4H) ao contrário do que ocorreu nos grupos anteriores.

A derme das coelhas desse grupo apresentou-se com edema além da presença de vários vasos sanguíneos (Fig. 4H).

Figura 3: Secções histológicas (**B, E, H**) e esquemas (**C, F, I**) da pele de coelhas não infestadas (**A**), infestadas pelo carrapato *R. linnaei* (**D-G**) e expostas ao azeite de oliva (**G**).

A- Foto da região dorsal, tosada, das coelhas não infestadas pelos carrapatos (GNI);

B- Secção histológica mostrando detalhes da epiderme e da derme das coelhas não infestadas (GNI);

C- Esquema realizado a partir de secção histológica, mostrando a organização da epiderme e da derme nas coelhas não infestadas (GNI);

D- Foto da região dorsal das coelhas infestadas pelos carrapatos *R. linnaei* sem exposição nem ao óleo e nem ao extrato (GINT).

E- Secção histológica mostrando detalhes da epiderme e da derme nas coelhas que foram apenas infestadas (GINT);

F- Esquema realizado a partir de secção histológica, mostrando a organização da epiderme e da derme das coelhas apenas infestadas (GINT);

G- Foto da região dorsal da pele das coelhas pós infestadas e expostas topicamente ao azeite (GPA).

H- Secção histológica mostrando detalhes da epiderme e da derme da pele das coelhas pós infestadas e expostas topicamente ao azeite (GPA);

I- Esquema realizado a partir de secção histológica, mostrando a organização da epiderme e da derme das coelhas pós infestadas e expostas topicamente ao azeite (GPA).

n = núcleo; **e** = epitélio; **d** = derme; **sc** = estrato córneo; **gs** = estrato germinativo.

Barra de escala= 100 µm.

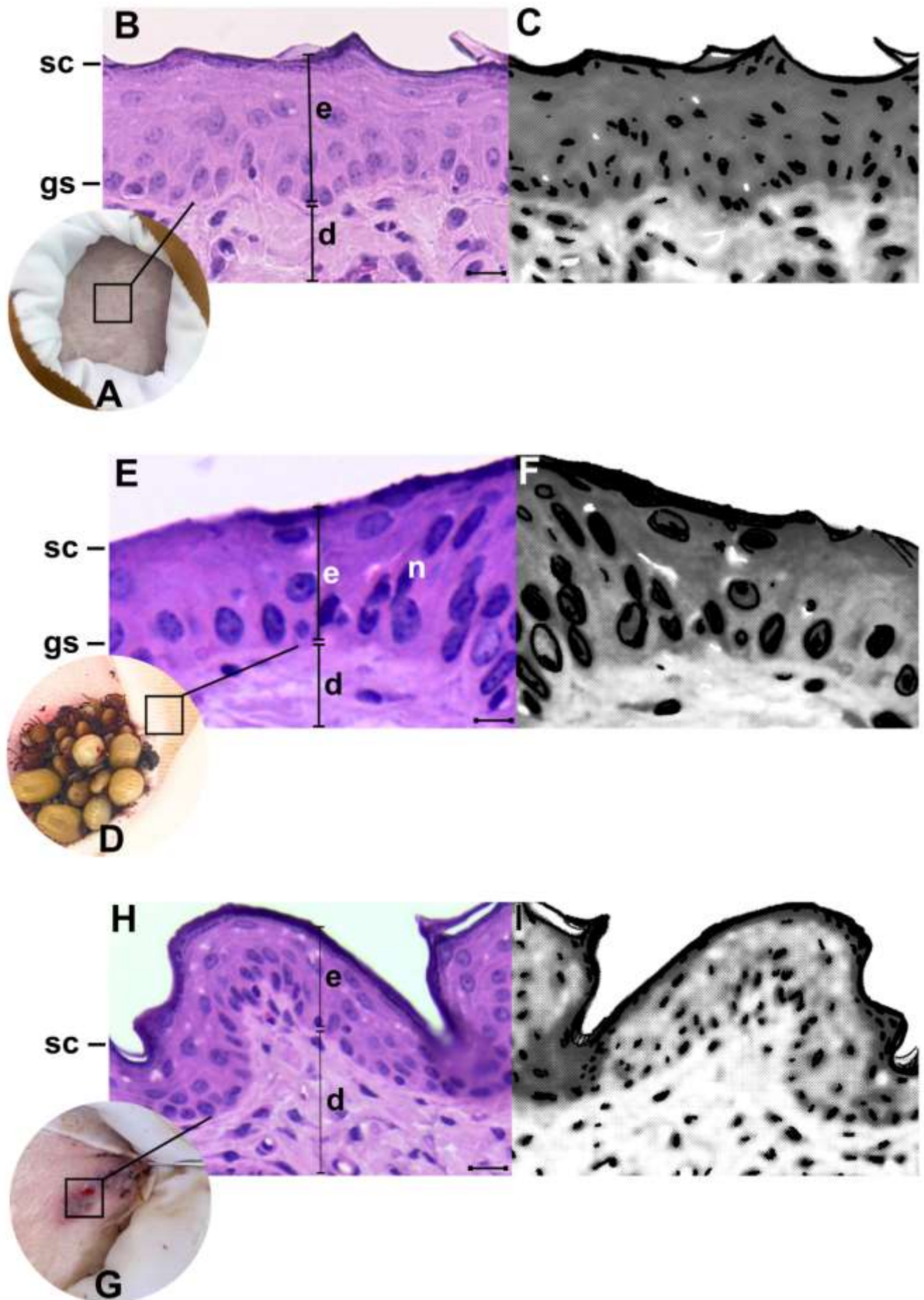


Figura 4: Secções histológicas (**B, E, H**) e esquemas (**C, F, I**) da pele de coelhas pós infestadas pelo carrapato *R. linnaei* e expostas topicamente as diferentes diluições do extrato da inflorescência da *C. sativa*, nas concentrações de 0,2 mg/mL (**A**); 0,4 mg/mL (**D**) e 0,8 mg/mL (**G**) para demonstrar a ação no processo de cicatrização.

A- Foto da região dorsal, das coelhas expostas à 0,2 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT02)

B- Secção histológica da epiderme e da derme das coelhas expostas à 0,2 mg/mL do extrato (GT02);

C- Esquema realizado a partir de secção histológica, mostrando a organização da epiderme e da derme das coelhas pós infestadas e expostas à 0,2 mg/mL do extrato (GT02);

D- Foto da região dorsal das coelhas pós infestadas expostas à 0,4 mg/mL do extrato (GT04).

E- Secção histológica mostrando detalhes da epiderme e da derme das coelhas pós infestadas e expostas à 0,4 mg/mL do extrato (GT04);

F- Esquema mostrando a organização da epiderme e da derme das coelhas pós infestação e expostas topicamente por 0,4 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT04);

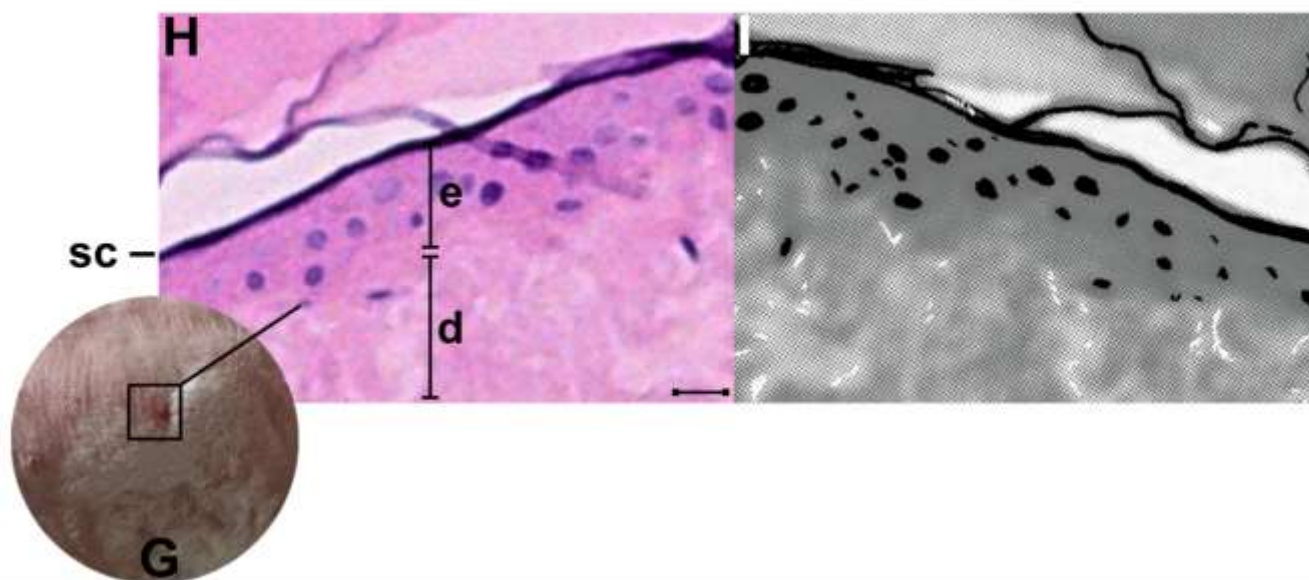
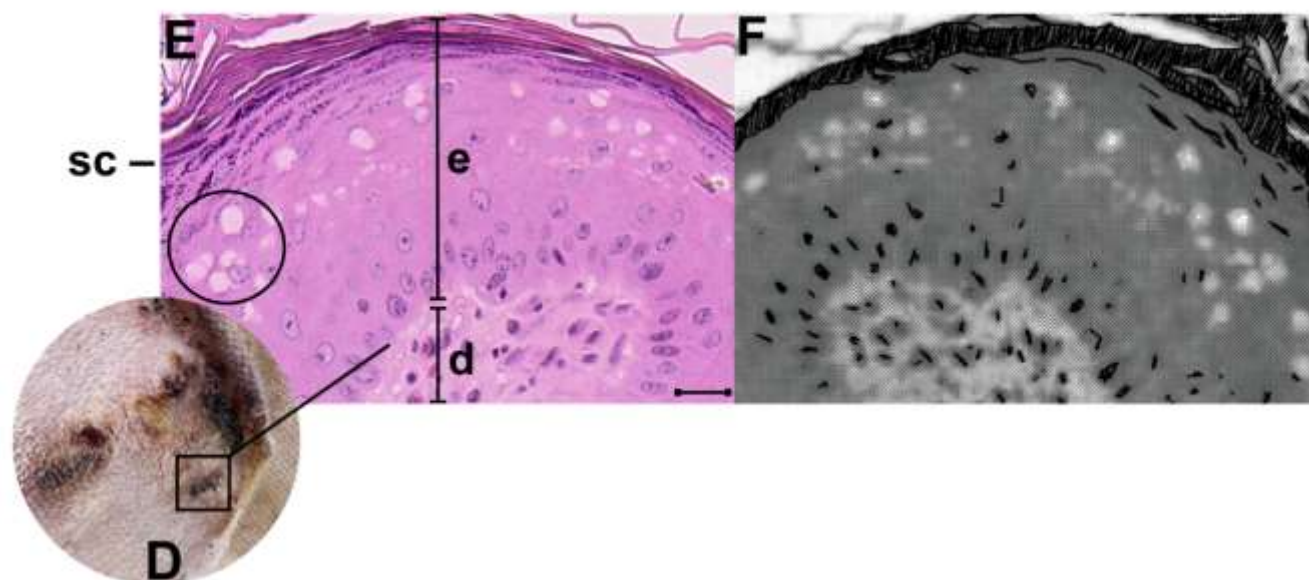
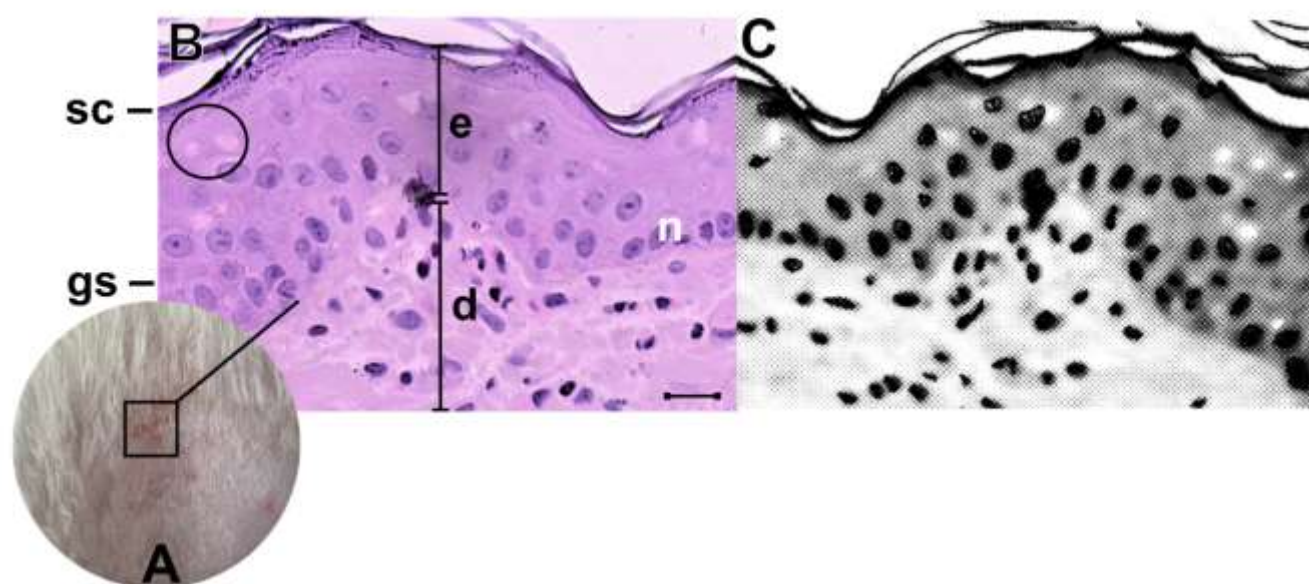
G- Foto da região dorsal das coelhas pós infestação e expostas topicamente por 0,8 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT08);

H- Secção histológica mostrando detalhes da epiderme e da derme das coelhas pós infestação e expostas topicamente por 0,8 mg/mL do extrato da *C. sativa* (GT08);

I- Esquema mostrando a organização da epiderme e da derme das coelhas pós infestadas expostas à 0,8 mg/mL do extrato (GT08).

círculo = estrutura lipídica; **n** = núcleo; **e** = epitélio; **d** = derme; **sc** = estrato córneo; **gs** = estrato germinativo.

Barra de escala: 100 µm.



5. DISCUSSÃO

A pele dos hospedeiros de carrapatos, alvo dos mesmos para conseguirem se alimentar, é o maior órgão do corpo e atua como a primeira linha de defesa contra ameaças externas (Junqueira; Carneiro, 2023). As feridas causadas pelas suas picadas provocam inflamações severas, evidenciando a necessidade de terapias que auxiliem na recuperação da pele lesada, principalmente fazendo uso de formulações/estratégias que sejam de fácil aplicação e menos invasivas para o animal.

Dessa forma, no presente estudo, realizou-se a avaliação histopatológica da pele de coelhas que foram expostas às diferentes concentrações do extrato de *C. sativa*, com o objetivo de cicatrizar as lesões das picadas. Os resultados mostraram, como já era esperado, que nas coelhas não infestadas (GNI - grupo que foi utilizado como controle) a pele encontrou-se íntegra, sem alterações na organização tecidual ou na morfologia das suas células, bem como teve seus estratos preservados.

No grupo GINT (apenas infestado com carrapatos), pode-se observar na pele dessas coelhas um extenso processo inflamatório (vermelhidão) ao redor das lesões deixadas pelas picadas. Segundo Boppana et al. (2005), que investigou a infiltração celular em lesões cutâneas e linfonodos drenantes de ovelhas infestadas por carrapatos adultos *Hyalomma anatolicum*, após 8 dias de alimentação, houve o estabelecimento de um processo inflamatório com infiltração celular no epitélio, resposta do hospedeiro à introdução da saliva no tecido cutâneo. Esse processo seria também resultado da ação imunomoduladora dos componentes da saliva dos carrapatos, os quais degradariam a matriz extracelular e comprometeriam as defesas do hospedeiro (Chávez et al., 2021; Wang et al., 2019; Furquim et al., 2008). Além desse processo inflamatório, a análise histológica da epiderme mostrou aumento do número de células epiteliais e do tamanho dos núcleos das mesmas, indicando que houve proliferação celular típica de tecidos que estão sob estresse e tentando reparar áreas afetadas (Chávez et al., 2021; Camargo-Mathias et al., 2023; Franzin et al., 2017). Além da epiderme, nesse grupo também a derme foi afetada, visto ter se observado a formação de edema. Estudos desenvolvidos por Boppana et al. (2005) e Hebling et al., (2012) em camundongos e em coelhos, ambos infestados por *R. sanguineus* apresentaram aumento de células inflamatórias na derme, quando

comparou-se com animais não infestados, o que levou os pesquisadores a concluir que a injeção da saliva do carrapato do cão na pele do hospedeiro induziu ao aumento de células inflamatórias no local da lesão.

No grupo GPA (infestado e exposto ao azeite), foram observadas as mesmas alterações do grupo GINT (infestado somente com carrapatos), quando observou-se uma desorganização do estrato germinativo e hipertrofia celular, comprovando que o uso do azeite de oliva não alterou, como também era esperado, o processo de cicatrização e de inflamação na pele. De acordo com estudos de Poljšak et al. (2019), o uso de manteigas e óleos vegetais quando usados isoladamente e de forma tópica na cicatrização de feridas cutâneas (o azeite de oliva tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias devido à presença de compostos fenólicos), não é suficiente para reduzir um processo inflamatório (Donato-Trancoso; Atella; Romana-Souza, 2022; Lin; Zhong; Santiago, 2017; Danby et al. 2013).

No grupo GT02 (infestadas e expostas à 0,2 mg/mL do extrato), embora tenha havido uma desorganização do epitélio cuticular no local das picadas, o processo inflamatório sofreu uma redução quando comparou-se aos dados obtidos dos grupos GINT e GPA, demonstrando que a aplicação tópica do extrato da *C. sativa*, nessa concentração, contribuiu para a redução do processo inflamatório, embora ainda não tenha sido capaz de cicatrizar as feridas. Outros autores como Saleem et al. (2019), em estudo histopatológico abordando os danos causados na pele de pequenos e grandes ruminantes por infestação de carrapatos, mostraram alterações na organização da estrutura epitelial, comprometendo assim a barreira física da pele, tornando-a mais suscetível a infecções e a outros tipos de lesões.

No grupo GT04, (infestadas e expostas à 0,4 mg/mL do extrato), observou-se que o processo inflamatório foi significativamente diminuído, com ausência da vermelhidão, observada nos grupos anteriores. Histologicamente, o epitélio, que normalmente está composto por estratos celulares organizados recuperou-se totalmente, como descrito na literatura (Griffiths et al., 2024; Annaidh et al., 2012). Nossos resultados mostraram que houve um leve espessamento do epitélio, em decorrência das picadas dos carrapatos, assim como também descrito por Chávez et al. (2021), em humanos e em camundongos. Esse leve aumento na espessura poderia estar indicando o início de um processo de recuperação epidérmica, com

reestruturação do tecido e consequente restauração da barreira cutânea. Ao contrário do observado no grupo GINT, cujas células do estrato germinativo apresentaram hipertrofia, neste grupo isso foi menos observado.

No presente estudo, quando analisados os grupos GT04 e o GT02, torna-se importante ressaltar a presença de estruturas translúcidas e arredondadas, provavelmente de natureza lipídica, distribuídas preferencialmente por entre as células dos estratos mais superficiais do epitélio. Segundo dados da literatura, esse lipídio poderia ser o resultado da aplicação tópica do extrato da *C. sativa*, que segundo Ferreira et al. (2023), representaria uma barreira que dificultaria a entrega do canabidiol (CBD) para as camadas mais profundas da pele, devido à alta lipofilicidade desse composto. O caráter lipofílico do CBD provocaria a formação de depósitos nos estratos mais superficiais, inclusive no córneo, limitando a penetração nas camadas mais internas.

Ainda quando comparou-se os resultados obtidos do uso tópico das concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL do extrato de *C. sativa*, ficou claro que houve um espessamento no estrato córneo, camada mais externa da pele e que está relacionada à proteção, principalmente em situações de trauma (Crowther et al., 2008; Russell et al., 2008), como foi o caso no presente trabalho. Os dados aqui obtidos corroboraram os achados de Žugić et al. (2024), que relataram uma situação semelhante observada em casos de dermatite atópica em humanos e que também foi tratada com *C. sativa*, e constataram que houve renovação celular e diminuição da inflamação. No caso em tela pode-se afirmar que o extrato da *Cannabis* conseguiu atenuar a inflamação provocada pelas picadas dos carrapatos minimizando as reações adversas na pele. Segundo Wakshlag et al. (2020) e Araújo et al. (2023), em estudos fazendo uso de produtos à base de *C. sativa* em diversos mamíferos e animais de estimação, como em cães e gatos verificaram que o CBD interage com os receptores CB1 e CB2 do sistema endocanabinoide, desempenhando funções antieméticas, ansiolíticas e analgésicas. Além disso, o CBD contribui para a redução da excitotoxicidade, do estresse oxidativo e da ativação pró-inflamatória, consolidando seu papel como agente anti-inflamatório. Esses estudos também indicaram que os canabinóides, ao serem aplicados, modulariam a resposta inflamatória, diminuindo-a. Dessa forma nossos dados

corroboraram essas informações, visto que o extrato da *Cannabis* nas concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL foram eficazes na redução da inflamação, facilitando a reparação da pele e a recuperação das funções da barreira cutânea.

Para finalizar, os dados obtidos para o grupo GT08 (infestadas e expostas ao extrato na concentração de 0,8 mg/mL) mostraram que houve um dano significativo na epiderme das coelhas, visto a mesma ter sofrido uma completa desorganização do epitélio, com afinamento da camada, persistência da inflamação e perda da maioria dos estratos. Segundo esses dados encontrados no presente trabalho, ficou evidente que essa concentração não pode ser utilizada como cicatrizante das lesões cutâneas aqui descritas, dados esse que corroboraram os de Klein et al. (2018), que ao utilizarem o canabidiol (CBD) nas concentrações de 5 e 10 mg/kg em injeções diárias em ratos com lesões orais, concluíram que não houve ação anti-inflamatória em ambas as doses testadas.

Ainda no grupo GT08, observou-se também um espessamento do estrato córneo (hiperqueratose), fenômeno que ocorre frequentemente em áreas de lesão como uma tentativa do organismo de fortalecer a barreira cutânea frente ao trauma (Saleem et al., 2019). Segundo Hebling et al. (2012) e Bozzatto et al. (2013), que investigaram a ação da inoculação de extratos das glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus*, bem como a ação da selamectina na pele de coelhas por meio de técnicas histopatológicas também verificaram um espessamento do estrato córneo, resultado das lesões das picadas e sugeriram que tal espessamento corresponderia à uma resposta da pele.

Na derme das coelhas desse grupo de estudo, observou-se a presença de significativo edema e aumento no número de vasos sanguíneos, confirmando essa intensa resposta inflamatória, dado que foi semelhante ao encontrado nos grupos GINT e GPA nas coelhas que foram infestadas, mas não foram expostas ao extrato da *Cannabis*.

De forma geral, a utilização do extrato da *C. sativa* como cicatrizante de lesões mecânicas resultantes de picadas de carrapatos na pele de animais hospedeiros, seria eficiente nas concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL, promovendo a melhora da cicatrização com consequente ação anti-inflamatória, aos contrário do

que foi observado para a concentração de 0,8 mg/mL, que ao invés de contribuir para o processo de cicatrização, provocou danos ainda mais severos ao tecido cutâneo dos animais.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2015. p. 205.

ABREU, Marina Rodrigues de; DELALIBERA JUNIOR, Italo; PEREIRA, Natalia Rubio Claret; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 42, n. 6, p. 507-516, 21 fev. 2020. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>

ANNAIDH, Aisling Ní; BRUYÈRE, Karine; DESTRADE, Michel; GILCHRIST, Michael D.; OTTÉNIO, Mélanie. Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin. **Journal Of the Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 5, n. 1, p. 139-148, jan. 2012. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.08.016](http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.08.016).

ARAÚJO, Mauro; ALMEIDA, Mauro Brito; NOGUEIRA, Lamartine. Mecanismo de ação dos canabinoides: visão geral. **Brazilian Journal of Pain**, v. 6, 2023. Disponível em: < <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20230028-pt> >.

BASWAN, Sudhir M; KLOSNER, Allison; GLYNN, Kelly; RAJGOPAL, Arun; MALIK, Kausar; YIM, Sunghan; STERN, Nathan. Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. **Clinical, Cosmetic And Investigational Dermatology**, v. 13, p. 927-942, dez. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ccid.s286411>.

BECHARA, Gervasio Henrique; SZABÓ, Matias Pablo Juan; FERREIRA, Beatriz Rossetti; GARCIA, Mv. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 4, p. 61-66, 1995.

BOPPANA, D. K. V.; WIKEL, S K; RAJ, D. G.; LALITHA, J. Cellular infiltration at skin lesions and draining lymph nodes of sheep infested with adult *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 657–667, 2005. Disponível em: [10.1017/S0031182005008243](https://doi.org/10.1017/S0031182005008243).

BOZZATTO, Vlamir; DE OLIVEIRA, Patrícia Rosa; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Histopathology of the tegument of rabbits infested by *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) ticks and exposed to selamectin (active principle of acaricide Revolution®, Pfizer). **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2551–2560, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-3422-3>>.

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. São Paulo: EDUNESP, Editora Unesp, 2018. 198 p.

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel; ABREU, Marina; SOCOLOWSKI, Priscila Cintra; RODRIGUES, Milena Lima; SILVA, Odaiza; GONÇALVES, Miguel Felipe Compri; GAINZA, Yousmel Alemán; INOUE, Lais Vieira Bello; BISPO, Yasmin Mayra; ARAÚJO, Bruna Jéssyca Nascimento; SILVA, Matheus Victor Maso Lacôrte; VINHA, Eduarda Cristina Da. A MORTE CELULAR COMO UMA ESTRATÉGIA

BIOLÓGICA DE SOBREVIVÊNCIA: benefícios e prejuízos. **Unpublished**, p. 1-654, dez. 2023. Unpublished. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.33543.37288>.

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel; RODRIGUES, Milena de Lima; SILVA, Odaiza da; ABREU, Marina Rodrigues de; SAPATINI, Davy. *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 332, p. 110314, dez. 2024.

CASIRAGHI, Antonella; MUSAZZI, Umberto M.; CENTIN, Giorgio; FRANZÈ, Silvia; MINGHETTI, Paola. Topical Administration of Cannabidiol: influence of vehicle-related aspects on skin permeation process. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 337, 23 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph13110337>.

CHAVEZ, Adela S; WANG, Xiaowei; MARNIN, Liron; *et al.* Tick extracellular vesicles enable arthropod feeding and promote distinct outcomes of bacterial infection. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038%2Fs41467-021-23900-8>.

CHAYASIRISOBHON, Sirichai. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of *Cannabis*. **The Permanente Journal**, v. 25, n. 1, p. 1-3, mar. 2021. <Http://dx.doi.org/10.7812/tpp/19.200>.

CROWTHER, J.M.; SIEG, A.; BLENKIRON, P.; MARCOTT, C.; MATTS, P.J.; KACZVINSKY, J.R.; RAWLINGS, A.V. Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. **British Journal Of Dermatology**, p. 567-577, jun. 2008. <Http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08703.x>.

DANBY, Simon G; TAREQ, Alenezi; SULTAN, Amani; *et al.* Effect of Olive and Sunflowers Seed Oil on the Adult Skin Barrier: Implications for Neonatal Skin Care. *Pediatric Dermatology*, v. 30, n. 1, p. 42–50, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2012.01865.x>.

DANTAS-TORRES, Filipe. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

DONATO-TRANCOSO, Aline; CORREA ATELLA, Geórgia; ROMANA-SOUZA, Bruna. Dietary olive oil intake aggravates psoriatic skin inflammation in mice via Nrf2 activation and polyunsaturated fatty acid imbalance. **International Immunopharmacology**, v. 108, p. 108851–108851, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108851>.

FERREIRA, Beatriz P.; COSTA, Gustavo; MASCARENHAS-MELO, Filipa; PIRES, Patrícia C.; HEIDARIZADEH, Fariba; GIRAM, Prabhanjan S.; MAZZOLA, Priscila Gava; CABRAL, Célia; VEIGA, Francisco; PAIVA-SANTOS, Ana Cláudia. Skin applications of cannabidiol: sources, effects, delivery systems, marketed formulations and safety. **Phytochemistry Reviews**, v. 22, n. 3, p. 781-828, 18 mar. 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-023-09860-5>.

FRANZIN, Alessandra Mara; MARUYAMA, Sandra Regina; GARCIA, Gustavo Rocha, *et al.* Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*.

Parasites & Vectors, v. 10, n. 1, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282843/>>.

FURQUIM, Karim Christina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; MATHIAS, Maria Izabel Camargo. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3-4, p. 325-335, jul. 2008.

[Http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.013).

GRIFFITHS, Christopher E. M.; BARKER, Jonathan; BLEIKER, Tanya O.; CHALMERS, Robert; CREAMER, Daniel. **Rook's Textbook of Dermatology**. 9. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016. 4696 p.

HEBLING, Letícia Maria Gráballos Ferraz. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806) (acari) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados**. 2011. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

HEBLING, Leticia Maria Gráballos Ferraz; FURQUIM, Karim Cristina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Inoculation of salivary gland extracts obtained from female of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) with 2, 4, and 6 days of feeding in rabbit: I—histopathology of the feeding lesion. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 577–584, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-012-3169-2>>.

JUNAID, Mohammad Shajid Ashraf; TIJANI, Akeemat O.; PURI, Ashana; BANGA, Ajay K. In vitro percutaneous absorption studies of cannabidiol using human skin: exploring the effect of drug concentration, chemical enhancers, and essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 616, p. 121540, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121540>.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 14. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2023. 592 p.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, v. 123, 1983.

KLEIN, Mariana; BORTOLLI, Juliane de Quadros de; GUIMARÃES, Francisco Silveira; SALUM, Fernanda Gonçalves; CHERUBINI, Karen; FIGUEIREDO, Maria Antonia Zancanaro de. Effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, on oral wound healing process in rats: clinical and histological evaluation. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 11, p. 2275-2281, 8 ago. 2018. [Http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6165](http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6165).

KUMAR, Pradeep; MAHATO, Dipendra Kumar; KAMLE, Madhu; BORAH, Rituraj; SHARMA, Bharti; PANDHI, Shikha; TRIPATHI, Vijay; YADAV, Hardeo Singh; DEVI, Sheetal; PATIL, Umesh. Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of *Cannabis sativa* L.: an overview. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 11, p. 6010-6029, 8 jul. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.7213>.

LIN, Tzu-Kai; ZHONG, Lily; SANTIAGO, Juan. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 70–70, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29280987/>.

LU, Hui-Chen; MACKIE, Ken. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607-615, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>.

MAHMOUDINOODEZH, Haleh; TELUKUTLA, Srinivasa Reddy; BHANGU, Sukhvir Kaur; BACHARI, Ava; CAVALIERI, Francesca; MANTRI, Nitin. The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 438, 18 fev. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14020438>.

MALABADI Ravindra B, Kolkar Kiran P, Chalannavar Raju Krishna. *Cannabis sativa*: Ethnobotany and Phytochemistry. **International Journal of Innovation Scientific Research and Review**. 2023; 5(2): 3990-3998.

MARQUES, Eduardo de Souza; FRODER, Juliano Gabriel; OLIVEIRA, Patrícia Rosa de; PERAZZO, Fábio Ferreira; ROSA, Paulo Cesar Pires; GAIVÃO, Isabel O’neill de Mascarenhas; MATHIAS, Maria Izabel Camargo; MAISTRO, Edson Luis. Cytotoxic effects of *Euterpe oleraceae* fruit oil (açai) in rat liver and thyroid tissues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 54-61, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.001>.

MARTINS, Ana M.; GOMES, Ana L.; BOAS, Inês Vilas; MARTO, Joana; RIBEIRO, Helena M. *Cannabis*-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: a timely review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 210, 9 fev. 2022. MDPI AG. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15020210>.

MIRANDA-CORTÉS, Agatha; MOTA-ROJAS, Daniel; CROSIGNANI-OUTEDA, Nadia; CASAS-ALVARADO, Alejandro; MARTÍNEZ-BURNES, Julio; OLMOS-HERNÁNDEZ, Adriana; MORA-MEDINA, Patricia; VERDUZCO-MENDOZA, Antonio; HERNÁNDEZ-ÁVALOS, Ismael. The role of cannabinoids in pain modulation in companion animals. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 9, p. 1050884, 2023. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1050884>

NWANADE, Chuks F.; WANG, Min; WANG, Tianhong; YU, Zhijun; LIU, Jingze. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental And Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 1-35, 14 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-020-00489-z>.

ODIEKA, Anwuli Endurance; OBUZOR, Gloria Ukalina; OYEDEJI, Opeoluwa Oyehan; GONDWE, Mavuto; HOSU, Yiseyon Sunday; OYEDEJI, Adebola Omowunmi. The Medicinal Natural Products of *Cannabis sativa* Linn.: a review. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1689, 4 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27051689>.

OSAFO, Newman; YEBOAH, Oduro K.; ANTWI, Aaron O. Endocannabinoid system and its modulation of brain, gut, joint and skin inflammation. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 4, p. 3665-3680, abr. 2021. [Http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06366-1](http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06366-1).

PEIXOTO, Luana dos Santos Fonseca; LIMA, Iasmin Fares Menezes de; SILVA, Carolina Pereira da; PIMENTEL, Luana Gonçalves; LIMA, Vanessa Bastos de Souza Rolim; SANTANA, Kássia Regina de; PAZ JÚNIOR, Francisco Braga da; PAZ, Eliana Santos Lyra da. Ansiedade: o uso da *Cannabis sativa* como terapêutica alternativa frente aos benzodiazepínicos. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 7, p. 50502-50509, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n7-631>.

PEREIRA, Melissa Carolina; ANHOLETO, Luis Adriano; KASA, Giovanna Gennari; CASTRO, Karina Neoob de Carvalho; CANUTO, Kirley Marques; SOUZA, Ana Sheila de Queiroz; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. 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, p. 1-7, jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108423>.

PICOT, Stephane; BEUGNET, Frederic; LEBOUCHER, Gilles; BIENVENU, Anne-Lise. Drug resistant parasites and fungi from a one-health perspective: a global concern that needs transdisciplinary stewardship programs. **One Health**, v. 14, p. 100368, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100368>.

POLJŠAK, Nina; KREFT, Samo; KOČEVAR GLAVAČ, Nina. Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 2, p. 254–269, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.6524>>.

QUADROS, Danilo G.; JOHNSON, Tammi L.; WHITNEY, Travis R.; OLIVER, Jonathan D.; CHÁVEZ, Adela S. Oliva. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: pragmatism or utopia?. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 1 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11080490>.

REMEDIIO, Rafael Neodini; NUNES, Pablo Henrique; ANHOLETO, Luís Adriano; OLIVEIRA, Patrícia Rosa; SÁ, I.C.G.; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, v. 83, p. 19-31, abr. 2016. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004).

RUSSELL, L; WIEDERSBERG, S; BEGONADELGADOCHARRO, M. The determination of stratum corneum thickness An alternative approach. **European**

Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics, v. 69, n. 3, p. 861-870, ago. 2008. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.002).

SALEEM, MZ; AKHTAR, R; ASLAM, Um; *et al.* Histopathological Investigation of Skin and Hides Damage of Small and Large Ruminants due to Naturally Infested Ticks. **Tropical biomedicine**, v. 36, n. 4, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33597477/>>.

SHAO, Kimberly; STEWART, Campbell; GRANT-KELS, Jane M.. *Cannabis* and the skin. **Clinics In Dermatology**, v. 39, n. 5, p. 784-795, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.05.006>.

SILVA, Isabela Santos; VALE, Letícia; COUTINHO, Ana Lúcia; SOUSA, Lainny Jordana Martins Pereira e; MARCHESINI, Paula; MATOS, Renata da Silva; ANHOLETO, Luís Adriano; MATHIAS, Maria Izabel Camargo; FERREIRA, Lorena Lopes; ARRUDA, Walquiria. Thymol and eugenol against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females: biological, histopathological and bioinformatic analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 319, p. 109938, jul. 2023. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109938](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109938).

ŠLAPETA, Jan; CHANDRA, Shona; HALLIDAY, Bruce. The “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus linnaei*. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 6, p. 431-436, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.001>.

STYRCZEWSKA, Monika; KOSTYN, Anna; KULMA, Anna; MAJKOWSKA-SKROBEK, Grazyna; AUGUSTYNIAK, Daria; PRESCHA, Anna; CZUJ, Tadeusz; SZOPA, Jan. Flax Fiber Hydrophobic Extract Inhibits Human Skin Cells Inflammation and Causes Remodeling of Extracellular Matrix and Wound Closure Activation. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/862391>.

TAMBELI, Claudia Herrera; MARTINS, Guilherme Arthur; BARBOSA, Sabrina Legaspe; MACHADO, Tassia Tillemont. Integrative approach to the therapeutic use of *Cannabis* for orofacial pain. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2023. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20230013-en>.

TORABI, Atefeh; MADSEN, Frederikke Bahrt; SKOV, Anne Ladegaard. Permeation-Enhancing Strategies for Transdermal Delivery of Cannabinoids. **Cannabis And Cannabinoid Research**, v. 9, n. 2, p. 449-463, 1 abr. 2024. [Http://dx.doi.org/10.1089/can.2023.0130](http://dx.doi.org/10.1089/can.2023.0130).

VIEIRA, Lindicacia Soares; MARQUES, Ana Emília Formiga; SOUSA, Vagner Alexandre de. O uso de *Cannabis sativa* para fins terapêuticos no Brasil: uma revisão de literatura. **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 2, p. 901-919, 2020.

WAKSHLAG, Joseph J; CITAL, Stephen; EATON, Scott J; PRUSSIN, Reece; HUDALLA, Christopher. Cannabinoid, Terpene, and Heavy Metal Analysis of 29 Over-the-Counter Commercial Veterinary Hemp Supplements. **Veterinary Medicine**:

Research and Reports, v. 11, p. 45-55, abr. 2020.
<http://dx.doi.org/10.2147/vmrr.s248712>.

WANG, Hui; ZHANG, Xiaoli; WANG, Xiao; ZHANG, Baowen; WANG, Minjing; YANG, Xiaolong; HAN, Xuying; WANG, Rui; REN, Shuguang; HU, Yuhong. Comprehensive Analysis of the Global Protein Changes That Occur During Salivary Gland Degeneration in Female Ixodid Ticks *Haemaphysalis longicornis*. **Frontiers In Physiology**, v. 9, p. 1-16, 22 jan. 2019. [Http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01943](http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01943).

ZHENG, Zhe; QI, Jianchao; HU, Liqiu; OUYANG, Dongfang; WANG, Huizhen; SUN, Qili; LIN, Lijun; YOU, Lidan; TANG, Bin. A cannabidiol-containing alginate-based hydrogel as novel multifunctional wound dressing for promoting wound healing. **Biomaterials Advances**, v. 134, p. 112560, mar. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2021.112560>.

ŽUGIĆ, Ana; MARTINOVIĆ, Milica; TADIĆ, Vanja; RAJKOVIĆ, Miloš; RACIĆ, Gordana; NEŠIĆ, Ivana; KOREN, Anamarija. Comprehensive Insight into Cutaneous Application of Hemp. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 6, p. 748, 31 maio 2024.
[Http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16060748](http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16060748).

Capítulo 2

Extrato da planta *Cannabis sativa*: uso como cicatrizante de lesões mecânicas provocadas pela infestação do carrapato do cão *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826), análise bioquímica (sangue) e histopatológica (fígado) do potencial tóxico desse bioativo em coelhas hospedeiras

Odaiza da Silva^a; Davy Sapatini^a; Milena de Lima Rodrigues^a; Bárbara Fernanda Evangelista^a; Brenda dos Santos Vicente^a; Adriana de Souza Marques^a; Maria Luiza de Jesus Leitão^a; Beatriz Carvalho Lancia^a; Maria Izabel Camargo-Mathias^{a*}.

^a Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Carrapatos *Rhipicephalus linnaei*, são popularmente conhecidos como carrapato-vermelho-do-cão, seu hospedeiro preferencial e a quem eles também transmitem diversos patógenos. O controle desses ectoparasitas geralmente é feito com produtos químicos sintéticos que podem levar ao desenvolvimento de resistência. Bioativos extraídos de plantas estão sendo estudados como estratégia para o controle de carrapatos, incluindo a *C. sativa*, que a partir de sua inflorescência, fornece um extrato que vem sendo utilizado devido as suas diversas propriedades terapêuticas e que é aplicável tanto para os humanos quanto para os animais. Diante disso, no presente trabalho, investigou-se os efeitos do extrato da inflorescência de *C. sativa*, nas diluições (em azeite) de 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL, sobre as lesões na pele de coelhas hospedeiras do carrapato *R. linnaei*, para avaliar o seu potencial de cicatrização. No entanto, a realização desse procedimento tornou necessário avaliar, o tecido hepático desses animais, uma vez que mesmo o extrato funcionando como carrapaticida e com potencial cicatrizante das lesões cutâneas, ele também deveria ser inócuo para os hospedeiros, para assim poder ser considerado viável para o controle dos ectoparasitas. Para tanto, foram aplicadas técnicas histológica e histoquímicas no fígado das coelhas, as quais foram divididas em: grupo controle (GC), expostas a 1 mL de azeite, onde não foram observadas alterações hepáticas; grupo tratado 1 (GT1), expostas a 0,2 mg/mL, onde observou-se vacuolização citoplasmática nos hepatócitos; grupo tratado 2 (GT2), expostas a 0,4 mg/mL, que apresentou intensas alterações morfológicas, incluindo desorganização dos cordões de hepatócitos, hipertrofia dos mesmos, núcleos alterados e sinais de morte celular; grupo tratado 3 (GT3), expostas a 0,8 mg/mL, que também mostrou desorganização do tecido e vacuolização celular, porém em menor intensidade do que a observada no GT2. Além da avaliação morfológica fez-se também a bioquímica das enzimas hepáticas TGO e TGP. Observou-se que além de um aumento da enzima TGP no grupo GT2, todos os outros grupos não sofreram alterações nesses parâmetros. Assim, de forma geral no presente estudo concluiu-se que embora o extrato da inflorescência de *C. sativa*, em várias diluições, tenha potencial carrapaticida e cicatrizante de lesões cutâneas (informação pessoal), os

mesmos ainda que em graus diferentes, causam danos ao tecido hepático de coelhas a eles expostos, enfatizando que a diluição de 0,4 mg/mL foi aquela com maior potencial hepatotóxico.

Palavras chaves: *Cannabis sativa*, carrapaticida, enzimas hepáticas, hospedeiro, *Rhipicephalus linnaei*, fígado.

ABSTRACT

Rhipicephalus linnaei ticks, commonly known as the red dog tick, are preferential hosts for dogs, to whom they also transmit various pathogens. The control of these ectoparasites is generally achieved through the use of synthetic chemical products, which can lead to the development of resistance. Bioactive compounds extracted from plants are being studied as an alternative strategy for tick control, including *Cannabis sativa*, which provides an extract from its inflorescence known for its diverse therapeutic properties, applicable to both humans and animals. Therefore, in the work that originated this project investigated the effects of *C. sativa* inflorescence extract in oil dilutions of 0.2, 0.4, and 0.8 mg/mL, applied to skin lesions of rabbit hosts of *R. linnaei* ticks, to evaluate their healing. In addition, this procedure made it necessary to evaluate, what was done in the present work, the hepatic tissue of these animals, as the extract, while functioning as a tickicide and promoting healing of skin lesions, should also be harmless to the hosts to be considered viable for ectoparasite control. For this purpose, histological and histochemical techniques were applied to the livers of the rabbits (to identify morphological alterations), which were divided into: control group (CG), exposed to 1 mL of oil, showing no hepatic alterations; treated group 1 (TG1), exposed to 0.2 mg/mL, showing cytoplasmic vacuolization in hepatocytes; treated group 2 (TG2), exposed to 0.4 mg/mL, displaying intense morphological alterations, including disorganization of hepatocyte cords, hepatocyte hypertrophy, altered nuclei, and signs of cell death; treated group 3 (TG3), exposed to 0.8 mg/mL, also showing tissue disorganization and cellular vacuolization, but to a lesser extent than TG2. In addition to morphological evaluation, the biochemical activity of hepatic enzymes AST and ALT was assessed. An increase in ALT was observed in TG2, while no other groups showed changes in these parameters. Overall, this study concluded that although the *C. sativa* inflorescence extract at various dilutions has potential as a tickicide and for healing skin lesions (personal communication), it causes hepatic tissue damage in rabbits to varying degrees, with the 0.4 mg/mL dilution showing the highest hepatotoxic potential.

Keywords: *Cannabis sativa*, tickicide, hepatic enzymes, host, *Rhipicephalus linnaei*, liver.

1. INTRODUÇÃO

A espécie de carrapatos *R. linnaei* (Audouin, 1826), linhagem tropical do *R. sanguineus* s.l. (Šlapeta et al., 2022), conhecida como carrapato-vermelho-do-cão, tem como principais hospedeiros, os canídeos. Esse artrópode está amplamente distribuído e além dos danos causados pela espoliação de sangue são agentes transmissores de patógenos como *Babesia canis* (babesiose) e *Ehrlichia canis* (erliquiose) em cães e em humanos a *Rickettsia conorii* e a *R. rickettsii* que leva ao desenvolvimento da febre maculosa (Abreu et al., 2019; Dantas-Torres, 2008; Fonsêca et al., 2022).

O controle desses ectoparasitas vem sendo realizado atualmente pela utilização de acaricidas formulados a partir de bases químicas sintéticas e com custos financeiros variáveis. Apesar de sua eficiência, os mesmos, além de sua toxicidade, devido ao uso contínuo, induzem nos carrapatos o surgimento de resistência o que torna as bases químicas, depois de determinado tempo, não tão eficazes contra os ectoparasitas, visto que os mesmos desenvolvem estratégias que permitem driblar o sistema imune do animal hospedeiro (Camargo-Mathias, et al., 2018; Becker et al., 2019; Sunkara et al., 2021).

Na busca por estratégias de controle desses ectoparasitas que sejam mais limpas e sustentáveis e que não tragam tantos prejuízos nem aos organismos não alvos nem ao meio ambiente, plantas com reconhecido valor carrapaticida têm sido estudadas com sucesso, visto as mesmas serem ricas fontes de compostos bioativos, os quais a grande maioria já é conhecida e utilizada pelas populações locais por atuarem contra uma gama considerável de doenças (Gonçalves; Huerta; Freitag, 2016; Mabasa et al., 2021). Esses bioativos, de forma geral vêm sendo estudados pelos pesquisadores por meio da extração dos mesmos nas formas de extrato bruto ou de óleos essenciais (Mabasa et al., 2021, Camargo-Mathias, et al., 2018).

A *C. sativa* é uma destas plantas consideradas fontes de bioativos potentes com funções diversificadas. Pertencente à família *Cannabaceae*, é exótica não típica do Brasil, conhecida popularmente como “maconha”, e vem sendo comercializada em diversos países devido às inúmeras propriedades terapêuticas em vários

setores, incluindo a medicina humana e veterinária (Gewehr, 2021; Miranda-Cortés et al., 2023). A *Cannabis* ganhou sua fama devido ao uso das fibras de cânhamo para fabricação de redes e cordas, além das suas sementes de onde são extraídos óleos essenciais, tornando-a popular no mundo todo. Na Índia, a *Cannabis* já foi utilizada na redução de dores, melhora da ansiedade, náuseas, apetite e sono, além de ter também efeito reconhecidamente relaxante e euforizante. Os benefícios decorrentes do uso dos bioativos presentes na *C. sativa* começaram a se propagar no Brasil no século XIX, após a divulgação de trabalhos desenvolvidos na Faculdade de Medicina da Tours, na França. Porém, seu uso de forma geral tem sido controverso devido a razões éticas e legais, impostas em regulamentos e leis de cada país (Lima; Alexandre; Santos, 2021; Carlini, 2006; Miranda-Cortés et al., 2023).

O interesse crescente na utilização terapêutica dos bioativos da *Cannabis*, além do seu uso recreativo, tem chamado a atenção dos pesquisadores da medicina humana e veterinária devido às diversas propriedades benéficas desses compostos (Neto; Pierre; Fernandes, 2023; Martins et al., 2022; Chicoine et al., 2020). Na década de 1960, a descoberta do sistema endocanabinoide revelou um mecanismo intrínseco de regulação do organismo, ativada pela presença de canabinóides da planta *Cannabis*, que interagem com esse sistema. Esses compostos têm sido aplicados terapeuticamente em humanos e animais devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras (Schoeman; Beukes; Frost, 2020; Tambeli; Martins; Barbosa; Machado, 2023; Vieira; Marques; Sousa, 2020). Como resultado, parte dos tutores de animais domésticos tem buscado tratamentos que utilizem os bioativos da *Cannabis*, contribuindo para a sua utilização na medicina veterinária (Chicoine et al., 2020).

Nas plantas do gênero *Cannabis*, foram identificados mais de 100 compostos fitocanabinoides, sendo os mais conhecidos o canabidiol (CBD), ácido canabidiólico (CBDA), terpenos, flavonoides e o tetra-hidrocarbinol (THC) reconhecido por seus efeitos psicotrópicos e farmacológicos (Tambeli; Martins; Barbosa; Machado, 2023; Naya et al., 2024). Por outro lado, o canabidiol (CBD), outro composto significativo, não produz efeitos psicotrópicos e é conhecido por suas propriedades farmacológicas e terapêuticas positivas, recentemente removido da lista de

substâncias proibidas pela ANVISA (Lima; Alexandre; Santos, 2021). Além disso, o ácido canabidiólico (CBDA), também não psicoativo, é encontrado em grande quantidade na inflorescência de várias espécies de *Cannabis*, apresentando propriedades antieméticas e ansiolíticas (Carvalho et al., 2020; Elsohly et al., 2017; Miranda-Cortés et al., 2023).

No contexto veterinário, os canabinoides têm sido amplamente reconhecidos como uma ferramenta terapêutica, sendo prescritos para cães e gatos no tratamento de diversas condições, incluindo dermatite de contato e atópica, epilepsia, asma, diabetes, glaucoma e outras doenças inflamatórias (Miranda-Cortés et al., 2023). Além disso, esses compostos demonstraram possuir propriedades que estimulam o apetite, o que pode ser especialmente benéfico para animais que sofrem de perda de apetite devido a condições como doença do carrapato, câncer, entre outras (Chicoine et al., 2020; Miranda-Cortés et al., 2023).

Os canabinoides são rapidamente distribuídos por todo o corpo, atingindo órgãos bem vascularizados, como pulmões, coração, cérebro e fígado. Essa distribuição é influenciada pelo tamanho e composição corporal, além de ser afetada por condições de saúde que podem alterar a permeabilidade das barreiras entre o sangue e os tecidos. É no fígado que o THC, um dos principais canabinoides, é metabolizado, com as enzimas CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 do citocromo P450 (CYP 450) desempenhando um papel crucial nesse processo (Naya et al., 2024; Lucas; Galettis; Schneider, 2018).

O fígado é um órgão essencial tanto para o corpo, sendo composto principalmente por dois tipos de células: os hepatócitos e os colangiócitos. Os hepatócitos desempenham uma variedade de funções vitais, constituindo a maior parte da massa hepática. Suas atividades incluem a síntese proteica, a desintoxicação do organismo, a produção de bile e o metabolismo de carboidratos e lipídios (Trefts; Gannon; Wasserman, 2017; Bechmann et al., 2012). Essas funções são cruciais para manter o equilíbrio metabólico e a saúde geral do corpo. Além disso, o fígado desempenha um papel central no metabolismo de substâncias exógenas, como drogas e toxinas, onde os hepatócitos processam e neutralizam essas substâncias, contribuindo significativamente para a manutenção do equilíbrio homeostático do organismo (Junqueira; Carneiro, 2023; Ramachandran et al., 2020).

Assim, devido aos resultados positivos que foram descritos quanto à eficácia e aos benefícios decorrentes do uso da *C. sativa*, com foco no universo veterinário, o presente projeto teve como objetivo verificar no próprio hospedeiro, por meio da avaliação morfohistológica do fígado e da análise bioquímica do sangue (avaliação das taxas das enzimas TGO e TGP), se os bioativos presentes nessa planta, caso fossem eficientes na cicatrização, não atuariam como agentes tóxicos para o organismo não alvo, neste caso, o próprio hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo morfohistológico e clínico do fígado de coelhas infestadas pelo carrapato do cão *R. linnaei*, (simulando modelos hospedeiros de carrapatos), em resposta a exposição tópica ao extrato da inflorescência da *C. sativa* (no processo de cicatrização) nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL.

2.2. Específicos

1. Avaliar se a exposição tópica às diversas concentrações do extrato da *C. sativa* (carrapaticida) provocaria alterações tanto teciduais quanto celulares no fígado, o que em caso positivo sinalizaria um efeito tóxico e aplicando para tanto as técnicas: histológica (HE) e histoquímicas (azul de bromofenol para detecção de proteínas totais e PAS, para detecção de polissacarídeos neutros).

2. Avaliar se a exposição provocaria alteração nas taxas das enzimas hepáticas TGO (aspartato aminotransferase) e TGP (alanina aminotransferase), por meio da realização de bioensaios bioquímicos, informações essas que indicariam se o extrato poderia ser utilizado com segurança para o controle de carrapatos do cão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e locais de realização do estudo

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP. Nesta instituição, está implantada a **Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM)**, onde vem sendo mantidas colônias de carrapatos, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

3.2. Obtenção do extrato da *Cannabis sativa*

O extrato utilizado para a realização deste trabalho foi cedido, pela Associação Canábica Maria Flor, localizada na cidade de Marília, São Paulo, e que tem como supervisora técnica a Dra. Caroline Marroni Cremonez.

3.3. Obtenção das coelhas hospedeiras

Foram utilizadas 12 coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu, com quatro meses de idade, pesando entre 2,5 a 3,0 Kg, e que não tiveram contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério Central da UNESP/Botucatu, (SP).

Para realização dos bioensaios as mesmas foram divididas em quatro grupos (3 coelhas/grupo), a saber: **GC (Grupo Controle)**, **GT1 (Grupo Tratado 1)**, **GT2 (Grupo Tratado 2)** e **GT3 (Grupo Tratado 3)**.

Os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA do Instituto de Biociências, UNESP – câmpus de Rio Claro, SP), decisão n. 13/2023.

3.4. Carrapatos

Foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *Rhipicephalus linnaei*, obtidas de colônias estabelecidas e mantidas em estufa BOD em condições controladas

(29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP, e que permaneceram em jejum no interior de seringas plásticas que tiveram a abertura do êmbolo vedada com algodão levemente umedecido, até o momento da infestação nas coelhas.

3.5. Confecção da câmara alimentadora (Bechara et al., 1995)

A confecção das câmaras alimentadoras seguiu o protocolo de Bechara et al., (1995). Foi cortado um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro que posteriormente foi revestido com tecido de algodão. Em seguida, a face revestida foi aderida com cola atóxica à pele (tosada dorsalmente) da hospedeira. Após, colocou-se um tubo plástico (tipo coletor universal) com 2 cm de altura, com a parte inferior removida, que foi fixado no dorso da coelha e vedado interna e externamente com cola atóxica e esparadrapo. A tampa que posteriormente seria colocada no coletor foi perfurada para entrada de ar e consequente oxigenação das fêmeas de *R. linnaei* (Fig. 1).

As câmaras permaneceram destampadas pelo período de 24 horas para secagem da cola, para só então serem depositados os carrapatos.



Figura 1 (A-H): Fotografias mostrando os vários passos dos procedimentos realizados no dorso das coelhas hospedeiras durante a infestação por *R. linnaei*, segundo Hebling, (2011) e Bechara et al. (1995).

3.6. Infestação das coelhas com carrapatos *R. linnaei*

Foram colocados 15 casais de carrapatos *R. linnaei*/câmara de alimentação, que ali permaneceram pelo período de 7 dias, tempo necessário para que ocorresse a fixação dos ectoparasitas para início da alimentação.

3.7. Preparo das diluições do extrato de *C. sativa*

O extrato bruto da inflorescência da *Cannabis sativa* foi diluído em azeite (solvente) para obtenção de concentrações de THC que fossem inferiores a 0,2%. As diluições foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro (UNESP/Araraquara) segundo os procedimentos:

4. Foi diluído 0,2 mg/mL do extrato bruto da *C. sativa* em 100 mL de azeite, para obtenção da concentração final de 0,05% de THC.
5. Foi diluído 0,4 mg/mL do extrato bruto da *C. sativa* em 100 mL de azeite, para obtenção da concentração final de 0,1% de THC.
6. Foi diluído 0,8 mg/mL do extrato bruto da *C. sativa* em 100 mL de azeite, para obtenção da concentração final de 0,2% de THC.

Após a realização das diluições garantiu-se que o produto final estivesse em conformidade com as regulamentações exigidas pela ANVISA, que estabelece um limite máximo permitido de THC de 0,2%.

As diluições do extrato da *Cannabis* foram baseadas naquelas propostas por Sangiovanni et al., (2019), autores que testaram o potencial cicatrizante e anti-inflamatório da *C. sativa* em células em cultura.

3.8. Aplicação tópica das concentrações do extrato da *C. sativa* nas lesões de pele das coelhas pós-infestadas por carrapatos *R. linnaei*

Após 7 dias quando as fêmeas dos carrapatos estavam completamente ingurgitadas e se desprenderam do hospedeiro, no local da pele onde estavam fixadas (picada) ficou uma lesão sobre a qual aplicou-se topicamente 1 mL (das concentrações preparadas) do extrato de *C. sativa*, diariamente pelo período de 7 dias, nos seguintes grupos:

- **Controle (GC):** Foi aplicado apenas 1 mL do azeite (que serviu como solvente)
- **Tratado 1 (GT1):** Foi aplicado extrato diluído a 0,2 mg/mL.
- **Tratado 2 (GT2):** Foi aplicado extrato diluído a 0,4 mg/mL.

- **Tratado 3 (GT3):** Foi aplicado extrato diluído a 0,8 mg/mL.

O monitoramento dos animais expostos em todos os grupos deu-se diariamente, quando também foram realizados registros de imagens para acompanhamento da evolução do processo de cicatrização.

3.9. Análises bioquímicas

Foram realizados exames bioquímicos, para avaliação das enzimas hepáticas TGO (aspartato aminotransferase) e TGP (alanina aminotransferase) após a exposição às diferentes concentrações do extrato da inflorescência da *Cannabis*. Para tanto foi coletado sangue nos dias:

- **D0:** 1º dia antes da infestação das coelhas pelos carrapatos *R. linnaei*;
- **D1:** 7º dia após o desprendimento dos carrapatos e 1º dia da exposição das concentrações da *C. sativa*;
- **D2:** 14º dia após desprendimento dos carrapatos e 7º dia após a exposição às concentrações do extrato de *C. sativa*.

A coleta foi realizada pela médica veterinária Brunna Fernanda Arraez Alves, CRMV nº 59838, via punção jugular, para extração de 2 mL de sangue/coelha, com auxílio de seringa de 3 mL e agulha 25x0,08mm (estéril) e acondicionamento em tubos secos da marca Vacuntainer® contendo gel separador.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório CEDIVET localizado na cidade de Rio Claro-SP, sob a responsabilidade das médicas veterinárias Tamara Maria Franzin Julio, CRMV nº 20.137 e Tassiana Ferreira de Mello, CRMV nº 31.267, que fizeram uso do aparelho URIT 8031 (analisador automático bioquímico e turbidimétrico), com auxílio de reagentes da marca Bioclin® seguindo os protocolos do fabricante.

3.10. Análise estatística

Os dados das enzimas foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e posteriormente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. Em seguida, estes dados foram analisados por meio do teste ANOVA/Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Estas análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0®.

3.11. Análises morfológicas

3.11.1. Obtenção das amostras do fígado das coelhas

Após completados os bioensaios, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP, foi realizada a eutanásia das coelhas pela médica veterinária Brunna Fernanda Arraez Alves, CRMV nº 59838, fazendo uso da ketamina e xilazina, via intraperitoneal nas dosagens de 300 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, para coleta de fragmentos do fígado.

3.11.2. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983).

Depois de coletados, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4°C. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico a 70%-95% (banhos de 30 minutos cada), foi embebido em historesina Leica® por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após, os blocos foram seccionados (3 μ m de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e coradas pela hematoxilina de Harris durante oito minutos. Depois de lavadas por três minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, foram mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e

lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro - SP.

3.12. Histoquímica

3.12.1. Técnica do azul de bromofenol (Pearse, 1985)

Para detecção de proteínas totais, fragmentos do fígado das hospedeiras foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%-95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica® por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após esse processo, os blocos foram seccionados (3 µm de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas para posterior coloração pelo azul de bromofenol, por uma hora, à temperatura ambiente. Após serem passadas em ácido acético 0,5% por 5 minutos e lavadas em água corrente por 15 minutos, as mesmas passaram rapidamente pela solução de álcool butílico terciário. A seguir, as lâminas contendo as secções foram secas ao ar livre e foram mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.12.2. Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983).

Para a detecção de polissacarídeos neutros, fragmentos do fígado das hospedeiras foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4°C. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L), onde permaneceram por 24 horas. Depois foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%-95%) em banhos de 30 minutos cada. Na sequência, foram embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em

moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit). Após, os blocos foram seccionados (3 µm de espessura) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Após, foram lavadas em água destilada por 1 minuto e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Foram lavadas por 30 minutos em água corrente, secas à temperatura ambiente, mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan® e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.13. Confeção dos esquemas

Os esquemas apresentados no Capítulo 2 (Figura 2) foram obtidos a partir de imagens histológicas e foram confeccionados utilizando os programas Graphics Suite 2023 e Canva Create 2023. A confecção foi realizada por Odaiza da Silva.

4. RESULTADOS

4.1. Análises bioquímicas

Os resultados da atividade das enzimas TGO (aspartato aminotransferase) e TGP (alanina aminotransferase) obtidas por meio da análise do sangue das coelhas expostas ao extrato da inflorescência da *C. sativa* e diluído nas concentrações de: 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL estão apresentados nas Tabelas I e II, respectivamente e indicaram que, para a enzima aspartato aminotransferase (TGO) não houve alterações significativas nem entre os grupos expostos às diferentes concentrações e nem entre os dias de exposição ao extrato, ressaltando que todos os valores obtidos mantiveram-se abaixo dos valores de referência estabelecidos pelos reagentes da marca Bioclin®, conforme recomendado pelo fabricante. Por outro lado, observou-se que a enzima alanina aminotransferase (TGP) apresentou alterações que foram estatisticamente significativas somente no Grupo Tratado 2 (GT2), visto que o resultado obtido ultrapassou o limite superior dos valores de referência pré estabelecidos para essa enzima (no dia D2 de exposição).

Assim, de maneira geral, os resultados aqui obtidos corroboraram aqueles obtidos por meio das técnicas histológica e histoquímicas, destacando que a concentração de 0,4 mg/mL (GT2) foi aquela que causou os maiores danos no tecido hepático, a saber, nessas condições, houve a perda da estrutura normal dos hepatócitos, mostrando vacuolização e hipertrofia, além dos núcleos apresentarem-se com sua forma irregular, indicando possível morte celular.

Tabela 1. Dados da enzima aspartato aminotransferase (TGO) das coelhas expostas às concentrações do extrato da inflorescência da *C. sativa*. GC = Grupo Controle; GT1 = Grupo Tratado 1 (0,2 mg/mL); GT2 = Grupo Tratado 2 (0,4 mg/mL); GT3 = Grupo Tratado 3 (0,8 mg/mL). U/L = Unidade por litro. D0= 1º dia antes da infestação pelos carrapatos *R. linnaei*; D1= 7º dia após o desprendimento dos carrapatos e 1º dia da exposição às concentrações da *C. sativa*; D2= 14º dia após desprendimento dos carrapatos e 7º dia após a exposição às concentrações. Letras maiúsculas na mesma linha: diferenças significativas entre os dias de coleta dentro do mesmo grupo. Letras minúsculas na mesma coluna: diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta. Teste ANOVA Two-way Tukey, com $p \leq 0,05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
GC	52,33 ± 1,07 ^{Aa}	79,33 ± 1,07 ^{Ba}	68,33 ± 1,05 ^{Aa}	14 a 113 U/L
GT1	55,33 ± 1,22 ^{Aa}	81,60 ± 1,25 ^{Ba}	72,43 ± 1,50 ^{Aa}	
GT2	59,67 ± 1,85 ^{Aa}	82,33 ± 1,23 ^{Ba}	89,65 ± 1,75 ^{Ac}	
GT3	49,67 ± 1,05 ^{Aa}	74,62 ± 1,70 ^{Ba}	41,25 ± 1,85 ^{Ab}	

Tabela 2. Dados da enzima alanina aminotransferase (TGP) das coelhas expostas às concentrações do extrato da inflorescência da *C. sativa*. GC = Grupo Controle; GT1 = Grupo Tratado 1 (0,2 mg/mL); GT2 = Grupo Tratado 2 (0,4 mg/mL); GT3 = Grupo Tratado 3 (0,8 mg/mL). U/L = Unidade por litro. D0= 1º dia antes da infestação pelos carrapatos *R. linnaei*; D1= 7º dia após o desprendimento dos carrapatos e 1º dia da exposição às concentrações da *C. sativa*; D2= 14º dia após desprendimento dos carrapatos e 7º dia após a exposição às concentrações. Letras maiúsculas na mesma linha: diferenças significativas entre os dias de coleta dentro do mesmo grupo. Letras minúsculas na mesma coluna: diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta. Teste ANOVA Two-way Tukey, com $p \leq 0,05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
GC	57,14 ± 1,77 ^{Aa}	84,33 ± 1,87 ^{Ba}	72,31 ± 1,05 ^{Aa}	<100 U/L
GT1	58,56 ± 1,42 ^{Aa}	81,60 ± 1,54 ^{Ba}	74,47 ± 1,50 ^{Aa}	
GT2	63,67 ± 1,75 ^{Aa}	90,33 ± 2,69 ^{Ba}	112,45 ± 1,75 ^{Ab}	
GT3	52,67 ± 1,15 ^{Aa}	68,62 ± 1,79 ^{Aa}	57,40 ± 1,85 ^{Aa}	

4.2. Morfologia

4.2.1. Grupo Controle (GC)

No presente trabalho foram obtidos resultados da morfohistologia do tecido hepático (Fig. 2A-M) das coelhas modelos de hospedeiros de carrapatos, alocadas em diferentes grupos para o desenvolvimento dos bioensaios, que buscou avaliar quais seriam os efeitos no próprio organismo hospedeiro da eficácia dos bioativos presentes no extrato da inflorescência da *C. sativa* no processo de cicatrização das lesões de pele causadas pela fixação dos ectoparasitas.

Os resultados obtidos para o Grupo Controle, ou seja, no grupo onde as coelhas foram infestadas com carrapatos *R. linnaei* e as lesões foram expostas topicamente a apenas 1 mL de azeite, como já era de se esperar, não foram detectadas alterações no tecido hepático, nem na sua organização nem na sua histologia, visto que as células (hepatócitos) mantiveram sua forma cúbica, apresentando limites celulares nítidos, citoplasma homogêneo, bem como núcleos (um ou dois/célula) com cromatina ativa (Fig. 2B). A organização das células em cordões hepáticos foi preservada (Fig. 2B).

Também no tecido hepático foram observadas as células de Kupffer (seus núcleos e não seus limites) entre os cordões hepáticos, com núcleos bem marcados e alongados (Fig. 2B).

Histoquimicamente para a detecção de proteínas, pela coloração pelo azul de bromofenol, bem como na detecção de polissacarídeos pela técnica do PAS, houve forte marcação dos hepatócitos (Figs. 2C-D), confirmando a presença destes elementos.

Na figura 2C, observou-se que o citoplasma apresentou estruturas arredondadas que sugeriram ser locais onde estariam abrigadas gotículas de lipídeos, as quais não puderam ser visualizadas/marcadas devido a inespecificidade da técnica. Os núcleos dos hepatócitos foram fracamente marcados, ao contrário dos núcleos das células de Kupffer, que apresentaram-se fortemente positivos (Fig. 2C).

A detecção de polissacarídeos pela reação do PAS, (Fig. 2D), mostrou que o citoplasma dos hepatócitos foi fortemente marcado, deixando evidenciada a presença de uma granulação homogeneamente distribuída no interior da célula. Os núcleos dos hepatócitos e das células de Kupffer não puderam ser evidenciados, visto essa técnica ser específica para marcação de polissacarídeos.

4.2.2. Grupo Tratado 1 (GT1)

No fígado das coelhas do Grupo Tratado 1 (GT1), que foi exposto a solução diluída de 0,2 mg/mL do extrato da *C. sativa*, também observou-se uma desorganização na disposição dos hepatócitos no tecido, a qual não seguiu a estrutura de cordões (Fig. 2E). Nesse grupo notou-se também que entre os cordões de hepatócitos, houve uma vacuolização tecidual, que em muitas regiões impediu o contato entre as células dos cordões adjacentes (Fig. 2E).

A morfologia dos hepatócitos também sofreu alterações, visto o seu citoplasma ter apresentado a presença de leve vacuolização (Fig. 2E). Alguns núcleos dos hepatócitos também sofreram alterações passando a ter aspecto irregular e ainda muitos deles com cromatina marginalizada indicando um possível início de processo de morte celular (Fig. 2E). Os núcleos das células de Kupffer foram preservados.

A detecção de proteínas pelo azul de bromofenol confirmou a presença de vacuolização no tecido hepático, porém estes vacúolos reagiram ao corante aplicado, indicando a presença nos mesmos de elementos proteicos, ou complexos proteicos (Fig. 2F). Os núcleos das células de Kupffer, localizados entre os cordões de hepatócitos foram bem marcados, ficando assim bem visíveis.

Assim como observado no GC, a reação do PAS para detecção de polissacarídeos mostrou que o tecido hepático do GT1 apresentou resultado muito semelhante (Figs. 2D e G) ao do grupo controle (GC).

4.2.3. Grupo Tratado 2 (GT2)

O tecido hepático das coelhas do Grupo Tratado 2 (GT2), expostas a concentração de 0,4 mg/mL do extrato da *C. sativa*, foi o que mais sofreu alterações morfológicas em virtude da exposição. O arranjo dos hepatócitos na forma de cordões foi totalmente perdido, visto que as células, devido a sua extensa e intensa vacuolização, perderam sua forma cubica original e sofreram hipertrofia, o que desconfigurou o arranjo hepático inicial (Fig. 2H).

Além da própria morfologia celular, notou-se nesse grupo que os núcleos dos hepatócitos também sofreram alterações na sua forma, passando de arredondados para completamente irregulares (Fig. 2H), além de terem nitidamente marginalização de cromatina, sinal evidente de que estes hepatócitos entrariam em processo de morte celular. Os núcleos das células de Kupffer aparentemente não sofreram alterações e foram fortemente marcados pela hematoxilina (Fig. 2H). Observou-se também no tecido hepático desse grupo que houve uma congestão (acúmulo de sangue) nos espaços extracelulares (Fig. 2H).

A análise histoquímica para detecção de proteína no tecido hepático dos animais do GT2 mostrou forte marcação positiva no citoplasma dos hepatócitos, com núcleos mediantemente marcados, ao contrário daqueles das células de Kupffer (Fig. 2I).

A aplicação da técnica para detecção de polissacarídeos também confirmou que o tecido hepático desse grupo foi o que mais sofreu alterações morfológicas diante da exposição ao extrato da *C. sativa*. Observou-se uma forte marcação positiva para polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos, sob a forma de granulação que foi mais intensa e que ocupou de forma mais acentuada toda a área do citoplasma dessas células (Fig. 2J). Aqui também devido a especificidade da técnica, os núcleos tanto dos hepatócitos quanto das células de Kupffer não foram marcados (Fig. 2J).

4.2.4. Grupo Tratado 3 (GT3)

As coelhas do Grupo Tratado 3 (GT3), foram aquelas que tiveram suas lesões expostas ao extrato da *C. sativa*, na concentração de 0,8 mg/mL (Figs. 2K-M). Os

resultados quando comparados com aqueles do GC, mostraram que houve uma leve alteração no tecido hepático, não na sua organização, mas sim na histologia dos hepatócitos, que apresentaram vacuolização citoplasmática e marginalização de cromatina (Fig. 2K).

Os dados histoquímicos para esse grupo mostraram que a técnica para detecção de proteínas, confirmou a presença de vacuolização citoplasmática, cujo conteúdo dos vacúolos não foi marcado, indicando que não era de natureza proteica (Fig. 2L). Os núcleos das células de Kupffer ficaram bem evidentes.

Para a detecção de polissacarídeos observou-se que os resultados foram muito semelhantes àqueles observados nos animais do GC (Fig. 2M).

Tabela 3. Resumo dos resultados das marcações no tecido hepático de coelhas modelos hospedeiros de carrapatos *R. linnaei*, expostas ao extrato da inflorescência da *Cannabis sativa* nas concentrações: 0,2 mg/mL (GT1); 0,4 mg/mL (GT2) e 0,8 mg/mL (GT3). GC= Grupo Controle; HE= hematoxilina e eosina; AB=azul de bromofenol; PAS= reação pelo ácido periódico Schiff.

Grupos	HE (organização do tecido)	AB (detecção de proteínas)	PAS (detecção de polissacarídeos)
Controle (GC)	+++	++	+++
Tratamento 1 (GT1)	+++	+++	+++
Tratamento 2 (GT2)	+++	++++	++++
Tratamento 3 (GT3)	++	++	+++

Figura 2. Esquema (**A**) (FreePik) e secções histológicas (**B-M**) do fígado de coelhas submetidas a exposição das concentrações do extrato da inflorescência da *Cannabis sativa*.

Grupo Controle-GC (**B-D**),

Grupo Tratado 1-GT1 (**E-G**),

Grupo Tratado 2-GT2 (**H-J**),

Grupo Tratado 3-GT3 (**K-M**):

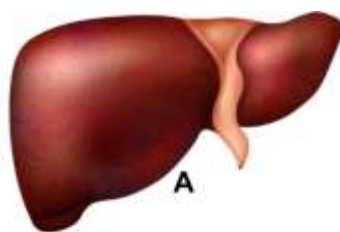
B, E, H, K= Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE);

C, F, I, L= Coloração pelo Azul de Bromofenol para detecção de proteínas totais;

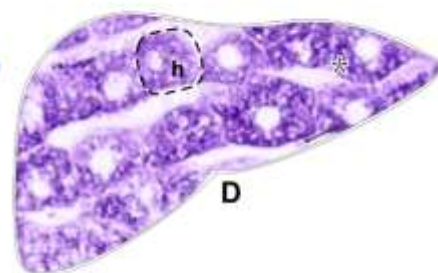
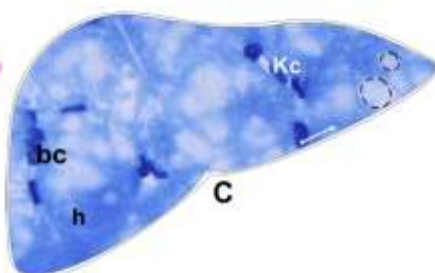
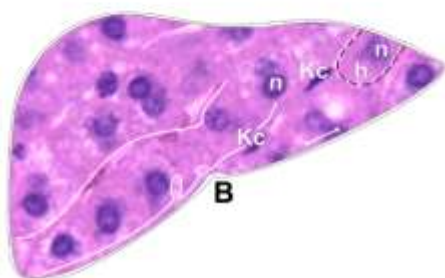
D, G, J, M= Reação pelo PAS para detecção de polissacarídeos neutros.

Círculo= acúmulo de sangue (congestão), **n**= núcleo de hepatócito, **seta**= núcleo das células de Kupffer (**Kc**), **linhas contínuas**= cordões de hepatócitos, **va e**= vacúolo externo, **va i**= vacúolo interno, **h**= hepatócito, **bc**= células sanguíneas, **asterisco**= granulação polissacarídica.

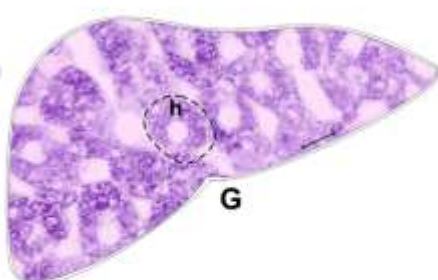
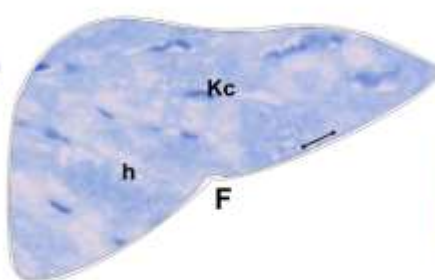
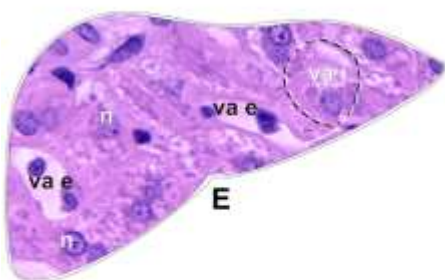
Barra de escala: 50 µm



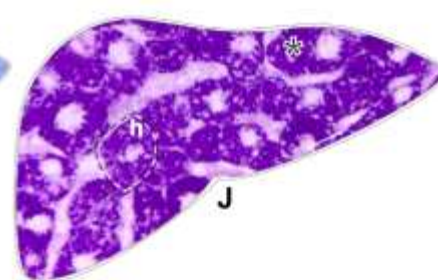
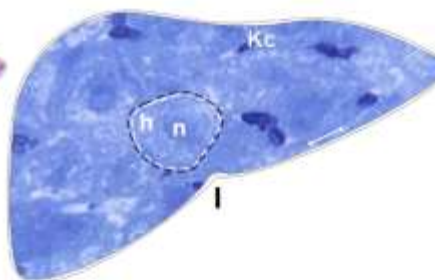
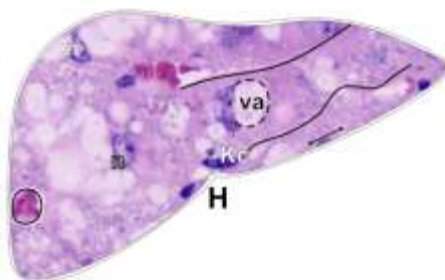
Controle



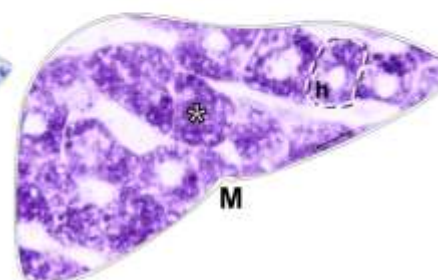
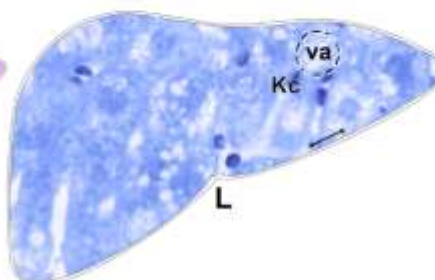
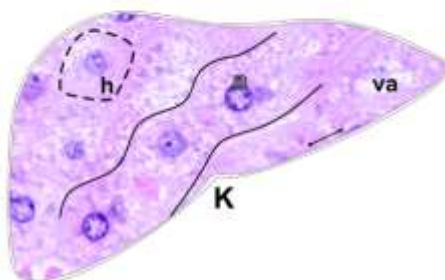
Tratamento 1



Tratamento 2



Tratamento 3



5. DISCUSSÃO

O controle de carrapatos realizado de forma a não causar danos ao ambiente ou aos organismos não-alvos, têm sido uma preocupação persistente, visto que encontrar mecanismos que sejam eficientes e que não afetem o ambiente e os seres nele viventes, tem se tornado uma meta nas pesquisas dentro dessa temática. Dentre as espécies de carrapatos que tem sido o foco desse tipo de controle, está o carrapato do cão, *R. linnaei*, ectoparasita amplamente distribuído e causador de danos, tanto decorrentes da espoliação sanguínea, quanto por ser vetor de inúmeras doenças (Camargo-Mathias, 2018). Ressalta-se que, atualmente o impacto da presença desse ectoparasita se estende aos seres humanos, com a transmissão de agentes patogênicos como *Rickettsia*, que está associado ao desenvolvimento de condições patológicas como a febre maculosa (Abreu et al., 2019; Dantas-Torres, 2008; Fonsêca et al., 2022).

Essa busca urgente por novas estratégias têm levado os pesquisadores a explorar o potencial dos bioativos que são produzidos por uma grande diversidade de plantas e que tem, além de outras, propriedades acaricidas. Esses bioativos vêm sendo extraídos dessas plantas e podem ser utilizados sob a forma de extratos brutos, óleos essenciais ou ainda de outras formas (Abreu et al., 2020; Pereira et al., 2023).

Entre os diversos estudos já conduzidos nessa direção, registros confirmam a descoberta de formulações com propriedades carrapaticidas contendo bioativos extraídos de plantas e, dentre eles estão aqueles como os do óleo de neem (*Azadirachta indica*) (Remedio et al., 2016), de *Euterpe oleraceae* (Marques et al., 2019) e de andiroba (Roma et al., 2011; Camargo-Mathias et al., 2018). Além dessas plantas, atualmente a *C. sativa* emerge como um potencial carrapaticida já comprovado em estudos em laboratório (Camargo-Mathias et al., 2024), visto seus compostos ativos, conhecidos como canabinóides, além da propriedade carrapaticida, terem mostrado em humanos eficácia terapêutica no tratamento de doenças como dores crônicas, epilepsia, ansiedade e até mesmo em certos tipos de câncer (Martins et al., 2022; Vieira, Marques, Sousa, 2020) e, na medicina veterinária, principalmente no tratamento da dor, dermatite de contato e atópica, epilepsia, diabetes, asma, glaucoma e outras doenças inflamatórias, atuando

também no estímulo de apetite em animais acometidos pela doença do carrapato (Miranda-Cortés et al., 2023). Os canabinóides são substâncias lipofílicas que, quando presentes no sistema dos organismos, são rapidamente distribuídas e, conseqüentemente, passam pelo fígado, local onde os mesmos são processados (Lucas; Galettis; Schneider, 2018; Naya et al., 2024).

Assim, diante das informações anteriormente expostas, o presente trabalho teve como objetivo mostrar os efeitos da exposição de coelhas, simulando modelos hospedeiros de carrapatos do cão *R. linnaei*, à diferentes concentrações do extrato obtido da inflorescência da *C. sativa*, a qual tem sido utilizada em diversas áreas (médica, veterinária, entre outras), no tratamento de doenças, e agora também tendo seu potencial carrapaticida comprovado.

A partir dos bioensaios realizados, os resultados indicaram que a exposição das coelhas à *C. sativa* não alterou significativamente os valores das enzimas TGO e TGP (Tabelas I e II), exceto no grupo GT2. Os níveis dessas enzimas permaneceram muito próximos aos observados no Grupo Controle (GC). TGO e TGP são enzimas que sinalizam o adequado funcionamento do fígado, uma vez que a alanina aminotransferase (TGP) é encontrada principalmente nos hepatócitos, enquanto o aspartato aminotransferase (TGO) além do miocárdio, também está presente no fígado, rins, bem como em outros tecidos (Luo et al., 2022). Dentre os vários estudos que analisaram os valores de referência de enzimas hepáticas em organismos que foram expostos a agentes químicos tanto sintéticos quanto naturais, encontra-se aquele de Sodelli et al. (2023), que demonstraram em estudo clínico-morfológico comparativo que coelhas expostas aos bioativos dos ésteres do óleo de mamona (*Ricinus communis*), não sofreram alteração no padrão das enzimas hepáticas, ficando os resultados dentro dos valores de referência e, conseqüentemente muito próximos àqueles obtidos do grupo controle (GC), o que foi corroborado pelos dados aqui encontrados.

Embora, no presente trabalho, os resultados obtidos tenham sido muito semelhantes aos do GC, cabe ressaltar que houve apenas uma alteração no perfil das enzimas hepáticas durante a exposição das coelhas à *C. sativa*, que foi observada nos animais alocados no grupo GT2 (0,4 mg/mL), dose que induziu o aumento nos níveis da TGP, e que sinalizou assim a ocorrência de uma leve

disfunção hepática, muito provavelmente, em decorrência da presença do extrato no sistema do animal, indicativo de que, numa possível utilização dos extratos da *Cannabis* para controlar carrapatos *R. linnaei*, essa dosagem muito embora tenha sido eficaz como carrapaticida, não seria indicada. De forma geral a literatura tem disponibilizado informações sobre a ocorrência de alterações patológicas em diversos órgãos, inclusive no fígado, provocadas pela exposição a bioativos. Estudos que foram conduzidos por Luo et al. (2022) e Bouassa et al. (2022), autores que investigaram, respectivamente, a exposição do efeito protetor da isoorientina (contra danos do ácido oleico) em ratos e ação dos canabinóides nas doenças hepáticas crônicas em células humanas e de ratos, também demonstraram que houve um aumento nos níveis de alanina aminotransferase (TGP), resultado esse que foi interpretado como indicativo de intoxicação associada a danos hepáticos, muito provavelmente pela presença da substância tóxica, e enfatizando a origem da mesma como não alcoólica (Bothrel et al., 2024; Nakadate et al., 2023; Marques et al., 2019).

No presente trabalho, quando procedeu-se a avaliação histopatológica do fígado das coelhas expostas às diferentes concentrações do extrato da *Cannabis*, verificou-se, no GC, como já era esperado, que o tecido hepático dessas coelhas (expostas apenas ao azeite), não sofreu alterações nem na organização do tecido e nem na morfologia das células (hepatócitos e células de Kupffer), o que corroborou a descrição da arquitetura de um fígado íntegro, encontrada na literatura (Junqueira; Carneiro, 2023; Ramachandran et al., 2020; Marques et al., 2019).

Nos grupos GT1, GT2 e GT3, os dados histológicos mostraram que houve desorganização na disposição dos hepatócitos no tecido, bem como vacuolização celular (e tecidual), as quais foram interpretadas também como um indicativo de processo de morte celular. A vacuolização citoplasmática é um processo caracterizado pela formação de vacúolos ou compartimentos delimitados por membranas dentro do citoplasma, resultantes geralmente da dilatação do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. Esse fenômeno pode ser um indicativo de estresse celular e frequentemente está associado à morte celular, a qual ocorreria através de mecanismos não apoptóticos como a paraptose. A morte celular em geral é um processo caracterizado como sendo essencial para a manutenção da

homeostase dos tecidos e pode ocorrer por diferentes vias (Alberts et al., 2017; Camargo-Mathias et al., 2023). Estudos conduzidos por Schoeman, Beukes e Frost (2020), obtiveram resultados que mostraram a presença de vacuolização em células cancerígenas mamárias humanas expostas às concentrações de 40 μ M e 5 μ g/mL de CBD, além da ocorrência de inchaço celular. No presente trabalho inferiu-se que essa vacuolização citoplasmática nos hepatócitos poderia estar indicando que as células estariam empacotando e isolando em vacúolos fagocíticos ou pinocíticos, regiões citoplasmáticas ou mesmo organelas que já estivessem danificadas pela substância tóxica, como tentativa de preservar o restante do ambiente citoplasmático, ainda íntegro, para que a célula não sofresse maiores danos e que assim pudesse estar apta para continuar a desempenhar suas funções, o que corrobora dados de outros autores (Nodari et al., 2011; Pereira et al., 2009; Erukainure et al., 2021). Ainda em outros trabalhos que expuseram camundongos a carrapaticidas tanto formulados com bases químicas sintéticas (fipronil), quanto naturais (timol), também ficou demonstrada a presença de áreas de vacuolização no citoplasma de hepatócitos (Cunha et al., 2017; Lahmi et al., 2024).

Aqui, especificamente nos animais dos GT1 e GT2, observou-se que os núcleos dos hepatócitos também manifestaram alterações morfológicas, caracterizadas pela mudança de sua forma que passou de arredondada para irregular, bem como pela marginalização da cromatina, confirmando o início de processo de morte celular, na maioria das vezes por autofagia ou por apoptose, enfatizando que a autofagia é um processo conservado no qual o conteúdo citoplasmático é sequestrado em autofagossomos, que posteriormente se fundem a lisossomos para que no interior destes ocorra degradação ou reciclagem do conteúdo. Schoeman et al., (2020), quando fizeram a exposição de linhagens de células cancerígenas humanas (mama) à combinação de canabinóides C6 (THC, CBG, CBN e CBD), mostraram que houve uma parada do ciclo celular na fase G2. Segundo diversos autores, a ativação da autofagia induzida por canabinóides seria frequentemente mediada pela indução do estresse do retículo endoplasmático (Camargo-Mathias et al., 2023; Aarestrup, 2015).

As coelhas alocadas no GT2, expostas a concentração de 0,4 mg/mL do extrato da *C. sativa* apresentaram alterações morfológicas no tecido hepático,

representadas pela significativa perda de organização tecidual, ou seja, os hepatócitos perderam seu arranjo em cordões, além de nas células ter-se verificado não só a presença de extensa vacuolização, mas também a hipertrofia, o que certamente contribuiria para modificar a circulação hepática, uma vez que esse aumento no tamanho celular alteraria o arranjo dos hepatócitos em cordões/placas, provocando o desarranjo normal da circulação sanguínea que certamente deixaria de ser eficiente, tanto na remoção de produtos do metabolismo quanto no desempenho das demais funções hepáticas (Junqueira; Carneiro, 2023; Sodelli et al., 2023; Shanmuganath et al., 2021). Dessa forma a exposição à essa concentração trouxe uma lesão hepática, que poderia inclusive estar associada a uma série de respostas celulares e teciduais, incluindo o estabelecimento de processos inflamatórios (Devaraj et al., 2021; Ezhilarasan; Najimi, 2022; Aarestrup, 2015). A presença de células hipertróficas, bem como de congestão sanguínea neste grupo, poderia também dar suporte à hipótese de que em função da exposição aos extratos, houve um aumento do metabolismo hepático, caracterizado pelo aumento da síntese de proteínas e de carboidratos pelos hepatócitos, cujos produtos resultantes, ou pelo menos parte deles necessitariam ficar armazenados no citoplasma, o que aumentaria consideravelmente o tamanho das células (Cunha et al., 2017; Hall; Hall, 2021).

Nos animais do GT3 também foram detectadas alterações no tecido/células hepáticas, tais como: vacuolização citoplasmática, cromatina marginalizada nos núcleos, além de outras, em resposta a exposição. Entretanto, as respostas inflamatórias observadas nesse grupo foram menos intensas quando comparadas com aquelas dos animais do GT2, caracterizando o conhecido efeito bifásico ou hormético, que ocorre quando a exposição a doses menores de determinadas substâncias tóxicas resultam em danos maiores, assim como registrado por Ewing et al. (2019) que observaram que ratos expostos as doses menores de CBD, tiveram a expressão de vários genes relacionados à hepatotoxicidade, enquanto que aqueles expostos às doses maiores tiveram a expressão desses mesmos genes inibida. Além disso, também foi observado por Pandelines et al. (2020) que doses menores de CBD aumentariam a incidência de marcadores de senescência e de inflamação nos fígados de *zebrafish* (*Danio rerio*), pois peixes expostos às doses mais baixas de CBD teriam níveis mais elevados de indicadores de estresse celular e

inflamação, o que sugeriu que a dose, em caso de exposição, seria um fator crítico na determinação dos efeitos tóxicos/biológicos. Assim, de acordo com os resultados histológicos obtidos no presente estudo, ficou demonstrado que os danos provocados pela exposição aos extratos da *C. sativa* não foram dose dependentes, uma vez que a dose que trouxe mais prejuízos ao fígado dos animais foi a de 0,4 mg/L. Esses dados foram corroborados pela análise histoquímica que mostrou que os animais do GT1 e do GT3 não sofreram alterações significativas na biossíntese ou na taxa de degradação de polissacarídeos, pois os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos observados no GC o que sinalizou que os processos metabólicos relacionados aos carboidratos no fígado, cruciais para a estabilidade dos níveis de glicose no sangue, não foram drasticamente alterados, corroborando outros estudos conduzidos por outros autores (Zhang et al., 2020; Trefts, Gannon, Wasserman, 2017; Yang et al., 2020).

Ao contrário do que foi observado nos GT1 e GT3, no grupo GT2 foi onde detectou-se as maiores alterações histoquímicas no tecido hepático, onde a marcação para polissacarídeos foi fortemente positiva, assim como também o foi para proteínas. Vários autores que fizeram exposição de animais à substâncias químicas sintéticas ou extraídas de plantas para estudos de potencial tóxico, mostraram a ocorrência de mudanças principalmente na síntese proteica hepática (Roma et al., 2011; Ali et al., 2024). Camundongos que foram expostos à permetrina e às composições antivirais sofosbuvir e ribavirina, respectivamente, tiveram um aumento na síntese de proteínas, sugerindo a intensificação da atividade celular na produção não só para a manutenção celular, mas também para a exportação de proteínas plasmáticas, como albumina, protrombina, fibrinogênio e lipoproteínas. Esse fenômeno, também observado neste estudo, indicou uma resposta semelhante quando as coelhas foram expostas à *C. sativa* a 0,4 mg/mL, visto ter ocorrido um aumento na síntese e degradação das proteínas, devido ao estresse causado no organismo. Observou-se também um aumento da marcação de polissacarídeos no tecido hepático, especialmente no citoplasma dos hepatócitos, provavelmente em resposta a exposição aos bioativos presentes na *Cannabis*, sugerindo que houve um aumento na síntese/armazenamento de polissacarídeos, especificamente glicogênio, considerado o combustível energético dos animais e cuja síntese e degradação são processos regulados de acordo com a necessidade celular (Alberts et al., 2017).

Essa regulação envolve diversos hormônios, como a insulina e o glucagon e a adrenalina, que estimulam a degradação (Junqueira; Carneiro, 2008). No estudo em questão, que realizou a exposição de coelhas ao extrato da *Cannabis*, foram obtidos resultados que corroboraram os de outros autores quanto ao aumento na síntese/armazenamento de polissacarídeos, provavelmente glicogênio, no citoplasma dos hepatócitos, ocorrido em resposta ao estresse crônico e prolongado aos bioativos.

Nos animais do GT3, no teste histoquímico para detecção de proteínas nos hepatócitos, ficou clara a extensa vacuolização citoplasmática. No entanto, esses vacúolos não foram marcados pelo azul de bromofenol nem pelo PAS, indicando que o seu conteúdo provavelmente deva ter origem lipídica (técnica histoquímica que não foi aqui realizada). Essa hipótese decorre também do fato de o fígado ser o principal órgão responsável pela homeostase dos ácidos graxos e do colesterol, desempenhando papel importante na regulação dos triacilgliceróis, provenientes das refeições, e dos ácidos graxos não esterificados (Fuhrman et al., 2004). Além disso, o colesterol sintetizado no fígado pode ficar armazenado em gotículas, para ser posteriormente ou empacotado e secretado como lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ou utilizado na síntese de ácidos biliares, hormônios esteróides e vitaminas.

Os dados encontrados no presente estudo, que foi realizado para avaliar a segurança do extrato da inflorescência da *C. sativa* diluído em diversas concentrações como carrapaticida no controle de carrapatos *R. linnaei*, sugerem que o uso deste extrato pode ser danoso para o tecido hepático de coelhas, utilizadas como modelos de hospedeiros. As análises mostraram que todas as concentrações testadas (0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL) causaram danos histopatológicos ao fígado. Notavelmente, a concentração de 0,4 mg/mL foi a que mais alterou tanto a estrutura tecidual hepática quanto os hepatócitos. Estes resultados indicam que o extrato da inflorescência da *Cannabis C. sativa*, nas concentrações testadas, não é adequado para o controle de carrapatos em cães, pois causou danos hepáticos significativos nos animais expostos.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2015. p. 205.

ABREU, Marina Rodrigues de; DELALIBERA JUNIOR, Italo; PEREIRA, Natalia Rubio Claret; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 42, n. 6, p. 507-516, 21 fev. 2020. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>

ABREU, Marina Rodrigues de; PEREIRA, Melissa Carolina; SIMIONI, Patrícia Ucelli; NODARI, Elen Fernanda; PAIATTO, Lisiery Negrini; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.11.017>

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter; Wilson, John; Hunt, Tim. **Biologia molecular da célula**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed; 2017.

ALI, Rana A.; AWADALLA, Eatemad A.; AMIN, Yahia A.; FOUAD, Samer S.; AHMED, Maha Abd-El Baki; HASSAN, Mohammed H.; ABDEL-KAHAAR, Emaad; ABDEL-AZIZ, Rehab H.. The deleterious effects of sofosbuvir and ribavirin (antiviral drugs against hepatitis C virus) on different body systems in male albino rats regarding reproductive, hematological, biochemical, hepatic, and renal profiles and histopathological changes. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 0-5, 7 mar. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-55950-5>.

BECHARA, Gervasio Henrique; SZABÓ, Matias Pablo Juan; FERREIRA, Beatriz Rossetti; GARCIA, Mv. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 4, p. 61-66, 1995.

BECHMANN, Lars P.; HANNIVOORT, Rebekka A.; GERKEN, Guido; HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; TRAUNER, Michael; CANBAY, Ali. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal Of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>.

BECKER, Simone; WEBSTER, Anelise; DOYLE, Rovaina L.; MARTINS, João Ricardo; RECK, José; KLAFKE, Guilherme M.. 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, n. 5, p. 1046-1050, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.015>

BOTHREL, João Pedro Mendonça; MACIEL, Laura Aschar; OLIVEIRA, Luiz Antonio Terra de; COSTA, Letícia Ferreira; ARAËJO, Ivana. Achados hematológicos da erliquiose canina: um estudo de casos. **Research, Society And Development**, v.

13, n. 6, p. e3513646021. Research, Society and Development.
<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v13i6.46021>.

BOUASSA, Ralph-Sydney Mboumba; SEBASTIANI, Giada; MARZO, Vincenzo di; JENABIAN, Mohammad-Ali; COSTINIUK, Cecilia T. Cannabinoids and Chronic Liver Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9423, 20 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23169423>.

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. São Paulo: EDUNESP, Editora Unesp, 2018. 198 p.

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel; ABREU, Marina; SOCOLOWSKI, Priscila Cintra; RODRIGUES, Milena Lima; SILVA, Odaiza; GONÇALVES, Miguel Felipe Compri; GAINZA, Yousmel Alemán; INOUE, Lais Vieira Bello; BISPO, Yasmin Mayra; ARAÚJO, Bruna Jéssyca Nascimento; SILVA, Matheus Victor Maso Lacôrte; VINHA, Eduarda Cristina Da. A MORTE CELULAR COMO UMA ESTRATÉGIA BIOLÓGICA DE SOBREVIVÊNCIA: benefícios e prejuízos. **Unpublished**, p. 1-654, dez. 2023. Unpublished. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.33543.37288>.

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel; RODRIGUES, Milena de Lima; SILVA, Odaiza da; ABREU, Marina Rodrigues de; SAPATINI, Davy. *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 332, p. 110314, dez. 2024.

CARLINI, Elisaldo Araújo. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 314-317, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000400008>

CARVALHO, Virgínia; AGUIAR, Andrey; BARATTO, Leopoldo; SOUZA, Fábio; ROCHA, Ernesto. Quantificação de canabinóides em extratos medicinais de *Cannabis* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 43, p. 90-97, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170457>

CHICOINE, Alan; ILLING, Kate; VUONG, Stephanie; PINTO, K. Romany; ALCORN, Jane; COSFORD, Kevin. Pharmacokinetic and Safety Evaluation of Various Oral Doses of a Novel 1: 20 thc. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 7, p. 1-12, 29 set. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.583404>.

CUNHA, Eric Leonardo Rodrigues da; MATOS, Renata da Silva; PEREIRA, Natalia Rubio Claret; OLIVEIRA, Patrícia Rosa de; DAEMON, Erik; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal Of Histology And Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017. Herbert Publications PVT LTD. <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091x-4-9>.

DANTAS-TORRES, Filipe. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

DEVARAJ, Ezhilarasan; PERUMAL, Elumalai; SUBRAMANIYAN, Raghunandhakumar; MUSTAPHA, Najimi. Liver fibrosis: extracellular vesicles mediated intercellular communication in perisinusoidal space. **Hepatology**, v. 76, n. 1, p. 275-285, 18 dez. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.32239>.

ELSOHLY, Mahmoud A.; RADWAN, Mohamed M.; GUL, Waseem; CHANDRA, Suman; GALAL, Ahmed. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. **Progress In The Chemistry Of Organic Natural Products**, v. 103, p. 1-36, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1

ERUKAINURE, Ochuko L.; MATSABISA, Motlalepula G.; SALAU, Veronica F.; OYEDEMI, Sunday O.; OYENIHI, Omolola R.; IBEJI, Collins U.; ISLAM, Md. Shahidul. *Cannabis sativa* L. (var. indica) Exhibits Hepatoprotective Effects by Modulating Hepatic Lipid Profile and Mitigating Gluconeogenesis and Cholinergic Dysfunction in Oxidative Hepatic Injury. **Frontiers In Pharmacology**, v. 12, p. 705402, 21 dez. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.705402>.

EWING, Laura E.; SKINNER, Charles M.; QUICK, Charles M.; KENNON-MCGILL, Stefanie; MCGILL, Mitchell R.; WALKER, Larry A.; ELSOHLY, Mahmoud A.; GURLEY, Bill J.; KOTURBASH, Igor. Hepatotoxicity of a Cannabidiol-Rich *Cannabis* Extract in the Mouse Model. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1694, 30 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24091694>.

EZHILARASAN, Devaraj; NAJIMI, Mustapha. Intercellular communication among liver cells in the perisinusoidal space of the injured liver: pathophysiology and therapeutic directions. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 238, n. 1, p. 70-81, 21 nov. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.30915>.

FONSÊCA, Arícia Débora Vasconcelos; OLIVEIRA, Lorena Mayana Beserra de; JORGE, Felipe Rodrigues; CAVALCANTE, Ramuely Olinda; BEVILAQUA, Claudia Maria Leal; PINTO, Francisco José Maia; SANTOS, Jessica Maria Leite dos; TEIXEIRA, Bruno Marques; RODRIGUES, Ana Kétylla Ponte Prado; BRAZ, Gissandra Farias. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022010>

FUHRMAN, M.Patricia; CHARNEY, Pamela; MUELLER, Charles M.. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal Of The American Dietetic Association**, v. 104, n. 8, p. 1258-1264, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2004.05.213>.

GEWEHR, João Lourenço Hasckel. **Guia Inicial da Cannabis na Medicina Veterinária**. Santa Catarina: João Lourenço Hasckel Gewehr, 90 p. 2021.

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. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.29096>

HALL, John E.; HALL, Michael E.. **Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Gen Guanabara Koogan, 1120 p. 2021.

HEBLING, Letícia Maria Gráballos Ferraz. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806) (acarí) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados**. 2011. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 14. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2023. 592 p.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, v. 123, 1983.

LAHMI, Arash; ORYAN, Shahrbanoo; EIDI, Akram; ROHANI, Ali Haeri. Comparative effects of thymol and vitamin E on nonalcoholic fatty liver disease in male Wistar rats. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 84, 2024. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.268781>.

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, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.19829>

LUCAS, Catherine J.; GALETTIS, Peter; SCHNEIDER, Jennifer. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477-2482, 7 ago. 2018. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>

LUO, Tongwang; JIANG, Sheng; ZHOU, Bin; SONG, Quanjiang; DU, Jing; LIU, Ping; WANG, Xiaodu; SONG, Houhui; SHAO, Chunyan. Protective Effect of Isoorientin on Oleic Acid-Induced Oxidative Damage and Steatosis in Rat Liver Cells. **Frontiers In Pharmacology**, v. 13818159, n. 13, p. 1-12, 3 fev. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.818159>

MABASA, Rixile; MALEMELA, Kholofelo; SERALA, Karabo; KGAKISHE, Mante; MATSEBATLELA, Thabe; MOKGOTHO, Matlou; MBAZIMA, Vusi. *Ricinus communis* Butanol Fraction Inhibits MCF-7 Breast Cancer Cell Migration, Adhesion, and Invasiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 20, p. 153473542097768, jan. 2021. <https://doi.org/10.1177/1534735420977684>

MARQUES, Eduardo de Souza; FRODER, Juliano Gabriel; OLIVEIRA, Patrícia Rosa de; PERAZZO, Fábio Ferreira; ROSA, Paulo Cesar Pires; GAIVÃO, Isabel O’neill de Mascarenhas; MATHIAS, Maria Izabel Camargo; MAISTRO, Edson Luis. Cytotoxic effects of Euterpe oleraceae fruit oil (açaí) in rat liver and thyroid tissues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 54-61, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.001>.

MARTINS, Ana M.; GOMES, Ana L.; BOAS, Inês Vilas; MARTO, Joana; RIBEIRO, Helena M.. Cannabis-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: a timely review. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 210, 9 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15020210>

MIRANDA-CORTÉS, Agatha; MOTA-ROJAS, Daniel; CROSIGNANI-OUTEDA, Nadia; CASAS-ALVARADO, Alejandro; MARTÍNEZ-BURNES, Julio; OLMOS-HERNÁNDEZ, Adriana; MORA-MEDINA, Patricia; VERDUZCO-MENDOZA, Antonio; HERNÁNDEZ-ÁVALOS, Ismael. The role of cannabinoids in pain modulation in companion animals. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 9, p. 1050884, 2023. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1050884>

NAKADATE, Kazuhiko; SONO, Chiaki; MITA, Homura; ITAKURA, Yuki; KAWAKAMI, Kiyoharu. Severe Acute Liver Dysfunction Induces Delayed Hepatocyte Swelling and Cytoplasmic Vacuolization, and Delayed Cortical Neuronal Cell Death. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7351, 16 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087351>.

NAYA, Nadia Martinez; KELLY, Jazmin; CORNA, Giuliana; GOLINO, Michele; POLIZIO, Ariel H.; ABBATE, Antonio; TOLDO, Stefano; MEZZAROMA, Eleonora. An Overview of Cannabidiol as a Multifunctional Drug: pharmacokinetics and cellular effects. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 473, 18 jan. 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29020473>

NETO, Pedro Antonio Pierro; PIERRO, Luiz Marcelo Chiarotto; FERNANDES, Sergio Tadeu. Cannabis: 12.000 anos de experiências e preconceitos. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2023. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20230055-pt>.

NODARI, Elen Fernanda; ROMA, Gislaine Cristina; FURQUIM, Karim Christina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; MATHIAS, Maria Izabel Camargo. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 151-158, jun. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>

PANDELIDES, Zacharias; THORNTON, Cammi; LOVITT, Kayla G.; FARUQUE, Anika S.; WHITEHEAD, Alyssa P.; WILLETT, Kristine L.; ASHPOLE, Nicole M.. Developmental exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) causes biphasic effects on longevity, inflammation, and reproduction in aged zebrafish (*Danio rerio*). **Geroscience**, v. 42, n. 3, p. 923-936, 30 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-020-00175-3>.

PEARSE, Anthony Guy Everson, **Histochemistry theoretical and applied**, 3 ed. Livingstone: Churchill, 214 p., 1985.

PEREIRA, Carolina Parga Martins; OLIVEIRA, Patricia Rosa; FURQUIM, Karim Cristina Scopim; BECHARA, Gervásio Henrique; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). **Veterinary**

Parasitology, v. 166, n. 1-2, p. 124-130, dez. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.015>

PEREIRA, Melissa Carolina; ANHOLETO, Luis Adriano; KASA, Giovanna Gennari; CASTRO, Karina Neoob de Carvalho; CANUTO, Kirley Marques; SOUZA, Ana Sheila de Queiroz; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. 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, p. 1-7, jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108423>

RAMACHANDRAN, Prakash; MATCHETT, Kylie P.; DOBIE, Ross; WILSON-KANAMORI, John R.; HENDERSON, Neil C.. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 8, p. 457-472, 1 jun. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-0304-x>.

Realistic composition of human internal organs with isolated image of vector liver illustration | Free vector. *Freepik*. (Figure 2A).

REMEDIIO, Rafael Neodini.; NUNES, Pablo Henrique; ANHOLETO, Luis Adriano; OLIVEIRA, Patricia Rosa; SÁ, I.C.G.; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, v. 83, p. 19-31, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004>

ROMA, Gislaine Cristina; FURQUIM, Karim Christina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; MATHIAS, Maria Izabel Camargo. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae) fully engorged females. **Experimental And Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287-299, 20 out. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>.

SANGIOVANNI, Enrico; FUMAGALLI, Marco; PACCHETTI, Barbara; PIAZZA, Stefano; MAGNAVACCA, Andrea; KHALILPOUR, Saba; MELZI, Gloria; MARTINELLI, Giulia; DELL'AGLI, Mario. *Cannabis sativa* L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 8, p. 2083-2093, 2019. <https://doi.org/10.1002/ptr.6400>.

SCHOEMAN, Recardia; BEUKES, Natasha; FROST, Carminita. Cannabinoid Combination Induces Cytoplasmic Vacuolation in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4682, 14 out. 2020. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204682>.

SHANMUGANATHAN, Meera; SARFARAZ, Mohammad Omair; KROEZEN, Zachary; PHILBRICK, Holly; POON, Richel; DON-WAUCHOPE, Andrew; PUGLIA, Marco; WISHART, David; BRITZ-MCKIBBIN, Philip. A Cross-Platform Metabolomics Comparison Identifies Serum Metabolite Signatures of Liver Fibrosis Progression in Chronic Hepatitis C Patients. **Frontiers In Molecular Biosciences**, v. 8, p. 1-15, 3 ago. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.676349>.

SILVA, Isabela Santos; VALE, Letícia; COUTINHO, Ana Lúcia; SOUSA, Lainny Jordana Martins Pereira e; MARCHESINI, Paula; MATOS, Renata da Silva; ANHOLETO, Luís Adriano; MATHIAS, Maria Izabel Camargo; FERREIRA, Lorena Lopes; ARRUDA, Walquiria. Thymol and eugenol against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females: biological, histopathological and bioinformatic analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 319, p. 109938, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109938>.

ŠLAPETA, Jan; HALLIDAY, Bruce; CHANDRA, Shona; ALANAZI, Abdullah; ABDEL-SHAIFY, Sobhy. *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. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>.

SODELLI, Luís Fernando; SILVA, Odaiza da; ARAÚJO, Bruna Jéssyca Nascimento; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 3, p. 1-13, 2023. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023041>.

SUNKARA, Prathyusha; CHENNURU, Sreedevi; KROVVIDI, Sudhakar; CHITICHOTI, Jyothisree. Cypermethrin and ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latrielle, 1806) collected from dogs in south India. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n. 1, p. 67-78, 18 set. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09830-2>.

TAMBELI, Claudia Herrera; MARTINS, Guilherme Arthur; BARBOSA, Sabrina Legaspe; MACHADO, Tassia Tillemont. Integrative approach to the therapeutic use of *Cannabis* for orofacial pain. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2023. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20230013-en>.

TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen; WASSERMAN, David H.. The liver. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. 1147-1151, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.

VIEIRA, Lindicacia Soares; MARQUES, Ana Emília Formiga; SOUSA, Vagner Alexandre de. O uso de *Cannabis sativa* para fins terapêuticos no Brasil: uma revisão de literatura. **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 2, p. 901-919, 2020.

YANG, Ying; JI, Jing; DI, Liuqing; LI, Junsong; HU, Lihong; QIAO, Hongzhi; WANG, Lingchong; FENG, Yibin. Resource, chemical structure and activity of natural polysaccharides against alcoholic liver damages. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, p. 116355, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116355>.

ZHANG, Cheng; BJORNSEN, Elias; ARIF, Muhammad; TEBANI, Abdellah; LOVRIC, Alen; BENFEITAS, Rui; OZCAN, Mehmet; JUSZCZAK, Kajetan; KIM, Woonghee; KIM, Jung Tae. The acute effect of metabolic cofactor supplementation: a potential therapeutic strategy against non-alcoholic fatty liver disease. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 4, p. 1-16, abr. 2020. <https://doi.org/10.15252/msb.209495>.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

1. O azeite isolado e aqui utilizado como solvente do extrato não foi eficiente na redução do processo inflamatório decorrente das picadas na pele das coelhas.
2. As concentrações de 0,2 e de 0,4 mg/mL reduziram a inflamação e foram eficazes no processo de cicatrização da pele.
3. A concentração de 0,8 mg/mL do extrato intensificou os danos morfológicos na pele das coelhas.
4. Todas as concentrações do extrato que foram aplicadas topicamente na pele (0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL) provocaram danos histopatológicos no fígado.
5. A concentração de 0,4 mg/mL do extrato foi a mais agressiva ao tecido hepático.
6. A única alteração nas enzimas hepáticas foi observada na exposição ao extrato na concentração de 0,4 mg/mL, cujo índice da TGP foi aumentado.
7. O uso do extrato da inflorescência da *C. sativa* auxilia no processo de cicatrização das lesões da pele decorrentes das picadas dos carrapatos, no entanto, provoca toxicidade hepática no hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2015. p. 205.

ABREU, Marina Rodrigues de; DELALIBERA JUNIOR, Italo; PEREIRA, Natalia Rubio Claret; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 42, n. 6, p. 507-516, 21 fev. 2020.
<https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>

ABREU, Marina Rodrigues de; PEREIRA, Melissa Carolina; SIMIONI, Patrícia Ucelli; NODARI, Elen Fernanda; PAIATTO, Lisiery Negrini; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.11.017>

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter; Wilson, John; Hunt, Tim. **Biologia molecular da célula**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed; 2017.

ALI, Rana A.; AWADALLA, Eatemad A.; AMIN, Yahia A.; FOUAD, Samer S.; AHMED, Maha Abd-El Baki; HASSAN, Mohammed H.; ABDEL-KAHAAR, Emaad; ABDEL-AZIZ, Rehab H.. The deleterious effects of sofosbuvir and ribavirin (antiviral drugs against hepatitis C virus) on different body systems in male albino rats regarding reproductive, hematological, biochemical, hepatic, and renal profiles and histopathological changes. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 0-5, 7 mar. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-55950-5>.

ANNAIDH, Aisling Ní; BRUYÈRE, Karine; DESTRADE, Michel; GILCHRIST, Michael D.; OTTÉNIO, Mélanie. Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin. **Journal Of the Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 5, n. 1, p. 139-148, jan. 2012.
<Http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.08.016>.

ARAÚJO, Mauro; ALMEIDA, Mauro Brito; NOGUEIRA, Lamartine. Mecanismo de ação dos canabinoides: visão geral. **Brazilian Journal of Pain**, v. 6, 2023. Disponível em: < <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20230028-pt> >.

BASWAN, Sudhir M; KLOSNER, Allison; GLYNN, Kelly; RAJGOPAL, Arun; MALIK, Kausar; YIM, Sunghan; STERN, Nathan. Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. **Clinical, Cosmetic And Investigational Dermatology**, v. 13, p. 927-942, dez. 2020. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.2147/ccid.s286411>.

BECHARA, Gervasio Henrique; SZABÓ, Matias Pablo Juan; FERREIRA, Beatriz Rossetti; GARCIA, Mv. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 4, p. 61-66, 1995.

- BECHMANN, Lars P.; HANNIVOORT, Rebekka A.; GERKEN, Guido; HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; TRAUNER, Michael; CANBAY, Ali. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal Of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>.
- BECKER, Simone; WEBSTER, Anelise; DOYLE, Rovaina L.; MARTINS, João Ricardo; RECK, José; KLAFKE, Guilherme M.. 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, n. 5, p. 1046-1050, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.015>
- BOPPANA, D. K. V.; WIKEL, S K; RAJ, D. G.; LALITHA, J. Cellular infiltration at skin lesions and draining lymph nodes of sheep infested with adult *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 657–667, 2005. Disponível em: 10.1017/S0031182005008243.
- BOTHREL, João Pedro Mendonça; MACIEL, Laura Aschar; OLIVEIRA, Luiz Antonio Terra de; COSTA, Letícia Ferreira; ARAÚJO, Ivana. Achados hematológicos da erliquiose canina: um estudo de casos. **Research, Society And Development**, v. 13, n. 6, p. e3513646021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v13i6.46021>.
- BOUASSA, Ralph-Sydney Mboumba; SEBASTIANI, Giada; MARZO, Vincenzo di; JENABIAN, Mohammad-Ali; COSTINIUK, Cecilia T. Cannabinoids and Chronic Liver Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9423, 20 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23169423>.
- BOZZATTO, Vlamir; DE OLIVEIRA, Patrícia Rosa; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Histopathology of the tegument of rabbits infested by *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) ticks and exposed to selamectin (active principle of acaricide Revolution®, Pfizer). **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2551–2560, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-3422-3>>.
- CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. São Paulo: EDUNESP, Editora Unesp, 2018. 198 p.
- CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel; ABREU, Marina; SOCOLOWSKI, Priscila Cintra; RODRIGUES, Milena Lima; SILVA, Odaiza; GONÇALVES, Miguel Felipe Compri; GAINZA, Yousmel Alemán; INOUE, Lais Vieira Bello; BISPO, Yasmin Mayra; ARAÚJO, Bruna Jéssyca Nascimento; SILVA, Matheus Victor Maso Lacôrte; VINHA, Eduarda Cristina Da. A MORTE CELULAR COMO UMA ESTRATÉGIA BIOLÓGICA DE SOBREVIVÊNCIA: benefícios e prejuízos. **Unpublished**, p. 1-654, dez. 2023. Unpublished. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.33543.37288>.
- CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel; RODRIGUES, Milena de Lima; SILVA, Odaiza da; ABREU, Marina Rodrigues de; SAPATINI, Davy. *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 332, p. 110314, dez. 2024.

CARLINI, Elisaldo Araújo. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 314-317, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000400008>

CARVALHO, Virgínia; AGUIAR, Andrey; BARATTO, Leopoldo; SOUZA, Fábio; ROCHA, Ernesto. Quantificação de canabinóides em extratos medicinais de *Cannabis* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 43, p. 90-97, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170457>

CASIRAGHI, Antonella; MUSAZZI, Umberto M.; CENTIN, Giorgio; FRANZÈ, Silvia; MINGHETTI, Paola. Topical Administration of Cannabidiol: influence of vehicle-related aspects on skin permeation process. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 337, 23 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph13110337>.

CHAVEZ, Adela S; WANG, Xiaowei; MARNIN, Liron; *et al.* Tick extracellular vesicles enable arthropod feeding and promote distinct outcomes of bacterial infection. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23900-8>.

CHAYASIRISOBHON, Sirichai. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of *Cannabis*. **The Permanente Journal**, v. 25, n. 1, p. 1-3, mar. 2021. <Http://dx.doi.org/10.7812/tpp/19.200>.

CHICOINE, Alan; ILLING, Kate; VUONG, Stephanie; PINTO, K. Romany; ALCORN, Jane; COSFORD, Kevin. Pharmacokinetic and Safety Evaluation of Various Oral Doses of a Novel 1: 20 thc. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 7, p. 1-12, 29 set. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.583404>.

CROWTHER, J.M.; SIEG, A.; BLENKIRON, P.; MARCOTT, C.; MATTS, P.J.; KACZVINSKY, J.R.; RAWLINGS, A.V. Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. **British Journal Of Dermatology**, p. 567-577, jun. 2008. <Http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08703.x>.

CUNHA, Eric Leonardo Rodrigues da; MATOS, Renata da Silva; PEREIRA, Natalia Rubio Claret; OLIVEIRA, Patrícia Rosa de; DAEMON, Erik; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal Of Histology And Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017. Herbert Publications PVT LTD. <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091x-4-9>.

DANBY, Simon G; TAREQ, Alenezi; SULTAN, Amani; *et al.* Effect of Olive and Sunflowers Seed Oil on the Adult Skin Barrier: Implications for Neonatal Skin Care. **Pediatric Dermatology**, v. 30, n. 1, p. 42–50, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2012.01865.x>.

DANTAS-TORRES, Filipe. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>.

DEVARAJ, Ezhilarasan; PERUMAL, Elumalai; SUBRAMANIYAN, Raghunandhakumar; MUSTAPHA, Najimi. Liver fibrosis: extracellular vesicles mediated intercellular communication in perisinusoidal space. **Hepatology**, v. 76, n. 1, p. 275-285, 18 dez. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.32239>.

DONATO-TRANCOSO, Aline; CORREA ATELLA, Geórgia; ROMANA-SOUZA, Bruna. Dietary olive oil intake aggravates psoriatic skin inflammation in mice via Nrf2 activation and polyunsaturated fatty acid imbalance. **International Immunopharmacology**, v. 108, p. 108851–108851, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108851>.

ELSOHLY, Mahmoud A.; RADWAN, Mohamed M.; GUL, Waseem; CHANDRA, Suman; GALAL, Ahmed. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. **Progress In The Chemistry Of Organic Natural Products**, v. 103, p. 1-36, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1.

ERUKAINURE, Ochuko L.; MATSABISA, Motlalepula G.; SALAU, Veronica F.; OYEDEMI, Sunday O.; OYENIHI, Omolola R.; IBEJI, Collins U.; ISLAM, Md. Shahidul. *Cannabis sativa* L. (var. indica) Exhibits Hepatoprotective Effects by Modulating Hepatic Lipid Profile and Mitigating Gluconeogenesis and Cholinergic Dysfunction in Oxidative Hepatic Injury. **Frontiers In Pharmacology**, v. 12, p. 705402, 21 dez. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.705402>.

EWING, Laura E.; SKINNER, Charles M.; QUICK, Charles M.; KENNON-MCGILL, Stefanie; MCGILL, Mitchell R.; WALKER, Larry A.; ELSOHLY, Mahmoud A.; GURLEY, Bill J.; KOTURBASH, Igor. Hepatotoxicity of a Cannabidiol-Rich *Cannabis* Extract in the Mouse Model. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1694, 30 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24091694>.

EZHILARASAN, Devaraj; NAJIMI, Mustapha. Intercellular communication among liver cells in the perisinusoidal space of the injured liver: pathophysiology and therapeutic directions. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 238, n. 1, p. 70-81, 21 nov. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.30915>.

FERREIRA, Beatriz P.; COSTA, Gustavo; MASCARENHAS-MELO, Filipa; PIRES, Patrícia C.; HEIDARIZADEH, Fariba; GIRAM, Prabhanjan S.; MAZZOLA, Priscila Gava; CABRAL, Célia; VEIGA, Francisco; PAIVA-SANTOS, Ana Cláudia. Skin applications of cannabidiol: sources, effects, delivery systems, marketed formulations and safety. **Phytochemistry Reviews**, v. 22, n. 3, p. 781-828, 18 mar. 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-023-09860-5>.

FONSÊCA, Arícia Débora Vasconcelos; OLIVEIRA, Lorena Mayana Beserra de; JORGE, Felipe Rodrigues; CAVALCANTE, Ramuelly Olinda; BEVILAQUA, Claudia Maria Leal; PINTO, Francisco José Maia; SANTOS, Jessica Maria Leite dos; TEIXEIRA, Bruno Marques; RODRIGUES, Ana Kétylla Ponte Prado; BRAZ, Gissandra Farias. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of

the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022010>

FRANZIN, Alessandra Mara; MARUYAMA, Sandra Regina; GARCIA, Gustavo Rocha, *et al.* Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282843/>>.

FUHRMAN, M.Patricia; CHARNEY, Pamela; MUELLER, Charles M.. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal Of The American Dietetic Association**, v. 104, n. 8, p. 1258-1264, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2004.05.213>.

FURQUIM, Karim Christina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; MATHIAS, Maria Izabel Camargo. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3-4, p. 325-335, jul. 2008. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.013).

GEWEHR, João Lourenço Hasckel. **Guia Inicial da Cannabis na Medicina Veterinária**. Santa Catarina: João Lourenço Hasckel Gewehr, 90 p. 2021.

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. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v3i1.29096>

GONZAGA, Bruno César Ferreira; BARROZO, Mayara Macêdo; COUTINHO, Ana Lúcia; SOUSA, Lainny Jordana Martins Pereira e; VALE, Francisca Letícia; MARRETO, Laís; MARCHESINI, Paula; RODRIGUES, Daniel de Castro; SOUZA, Evandro Davanço Ferreira de; SABATINI, Gustavo Adolfo. Essential oils and isolated compounds for tick control: advances beyond the laboratory. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, 14 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-023-05969-w>.

GRIFFITHS, Christopher E. M.; BARKER, Jonathan; BLEIKER, Tanya O.; CHALMERS, Robert; CREAMER, Daniel. **Rook's Textbook of Dermatology**. 9. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016. 4696 p.

HALL, John E.; HALL, Michael E.. **Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Gen Guanabara Koogan, 1120 p. 2021.

HEBLING, Letícia Maria Gráballos Ferraz. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806) (acari) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados**. 2011. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

HEBLING, Leticia Maria Gráballos Ferraz; FURQUIM, Karim Cristina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Inoculation of salivary gland extracts obtained from female of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) with 2, 4, and 6 days of feeding in rabbit: I—histopathology of the feeding lesion. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 577–584, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-012-3169-2>>.

JUNAID, Mohammad Shajid Ashraf; TIJANI, Akeemat O.; PURI, Ashana; BANGA, Ajay K. In vitro percutaneous absorption studies of cannabidiol using human skin: exploring the effect of drug concentration, chemical enhancers, and essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 616, p. 121540, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121540>.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 14. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2023. 592 p.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, v. 123, 1983.

KLEIN, Mariana; BORTOLLI, Juliane de Quadros de; GUIMARÃES, Francisco Silveira; SALUM, Fernanda Gonçalves; CHERUBINI, Karen; FIGUEIREDO, Maria Antonia Zancanaro de. Effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, on oral wound healing process in rats: clinical and histological evaluation. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 11, p. 2275-2281, 8 ago. 2018. [Http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6165](http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6165).

KUMAR, Pradeep; MAHATO, Dipendra Kumar; KAMLE, Madhu; BORAH, Rituraj; SHARMA, Bharti; PANDHI, Shikha; TRIPATHI, Vijay; YADAV, Hardeo Singh; DEVI, Sheetal; PATIL, Umesh. Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of *Cannabis sativa* L.: an overview. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 11, p. 6010-6029, 8 jul. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.7213>.

LAHMI, Arash; ORYAN, Shahrbanoo; EIDI, Akram; ROHANI, Ali Haeri. Comparative effects of thymol and vitamin E on nonalcoholic fatty liver disease in male Wistar rats. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 84, 2024. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.268781>.

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, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.19829>

LIN, Tzu-Kai; ZHONG, Lily; SANTIAGO, Juan. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 70–70, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29280987/>>.

LU, Hui-Chen; MACKIE, Ken. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607-615, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>.

- LUCAS, Catherine J.; GALETTIS, Peter; SCHNEIDER, Jennifer. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477-2482, 7 ago. 2018. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>
- LUO, Tongwang; JIANG, Sheng; ZHOU, Bin; SONG, Quanjiang; DU, Jing; LIU, Ping; WANG, Xiaodu; SONG, Houhui; SHAO, Chunyan. Protective Effect of Isoorientin on Oleic Acid-Induced Oxidative Damage and Steatosis in Rat Liver Cells. **Frontiers In Pharmacology**, v. 13818159, n. 13, p. 1-12, 3 fev. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.818159>
- MABASA, Rixile; MALEMELA, Kholofelo; SERALA, Karabo; KGAKISHE, Mante; MATSEBATTLELA, Thabe; MOKGOTHO, Matlou; MBAZIMA, Vusi. Ricinus communis Butanol Fraction Inhibits MCF-7 Breast Cancer Cell Migration, Adhesion, and Invasiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 20, p. 153473542097768, jan. 2021. <https://doi.org/10.1177/1534735420977684>
- MAHMOUDINOODEZH, Haleh; TELUKUTLA, Srinivasa Reddy; BHANGU, Sukhvir Kaur; BACHARI, Ava; CAVALIERI, Francesca; MANTRI, Nitin. The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 438, 18 fev. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14020438>.
- MALABADI, Ravindra B; KOLKAR Kiran P; CHALANNAVAR, Raju Krishna. *Cannabis sativa*: Ethnobotany and Phytochemistry. **International Journal of Innovation Scientific Research and Review**. 2023; 5(2): 3990-3998.
- MARQUES, Eduardo de Souza; FRODER, Juliano Gabriel; OLIVEIRA, Patrícia Rosa de; PERAZZO, Fábio Ferreira; ROSA, Paulo Cesar Pires; GAIVÃO, Isabel O'neill de Mascarenhas; MATHIAS, Maria Izabel Camargo; MAISTRO, Edson Luis. Cytotoxic effects of Euterpe oleraceae fruit oil (açai) in rat liver and thyroid tissues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 54-61, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.001>.
- MARTINS, Ana M.; GOMES, Ana L.; BOAS, Inês Vilas; MARTO, Joana; RIBEIRO, Helena M.. Cannabis-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: a timely review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 210, 9 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15020210>
- MIRANDA-CORTÉS, Agatha; MOTA-ROJAS, Daniel; CROSIGNANI-OUTEDA, Nadia; CASAS-ALVARADO, Alejandro; MARTÍNEZ-BURNES, Julio; OLMOS-HERNÁNDEZ, Adriana; MORA-MEDINA, Patricia; VERDUZCO-MENDOZA, Antonio; HERNÁNDEZ-ÁVALOS, Ismael. The role of cannabinoids in pain modulation in companion animals. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 9, p. 1050884, 2023. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1050884>
- NAKADATE, Kazuhiko; SONO, Chiaki; MITA, Homura; ITAKURA, Yuki; KAWAKAMI, Kiyoharu. Severe Acute Liver Dysfunction Induces Delayed Hepatocyte Swelling and Cytoplasmic Vacuolization, and Delayed Cortical Neuronal Cell Death. **International**

Journal Of Molecular Sciences, v. 24, n. 8, p. 7351, 16 abr. 2023. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087351>.

NAYA, Nadia Martinez; KELLY, Jazmin; CORNA, Giuliana; GOLINO, Michele; POLIZIO, Ariel H.; ABBATE, Antonio; TOLDO, Stefano; MEZZAROMA, Eleonora. An Overview of Cannabidiol as a Multifunctional Drug: pharmacokinetics and cellular effects. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 473, 18 jan. 2024.
<https://doi.org/10.3390/molecules29020473>

NETO, Pedro Antonio Pierro; PIERRO, Luiz Marcelo Chiarotto; FERNANDES, Sergio Tadeu. Cannabis: 12.000 anos de experiências e preconceitos. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2023. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20230055-pt>.

NODARI, Elen Fernanda; ROMA, Gislaine Cristina; FURQUIM, Karim Christina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; MATHIAS, Maria Izabel Camargo. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 151-158, jun. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>

NWANADE, Chuks F.; WANG, Min; WANG, Tianhong; YU, Zhijun; LIU, Jingze. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental And Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 1-35, 14 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-020-00489-z>.

ODIEKA, Anwuli Endurance; OBUZOR, Gloria Ukalina; OYEDEJI, Opeoluwa Oyehan; GONDWE, Mavuto; HOSU, Yiseyon Sunday; OYEDEJI, Adebola Omowunmi. The Medicinal Natural Products of *Cannabis sativa* Linn.: a review. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1689, 4 mar. 2022. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules27051689>.

OSAFO, Newman; YEBOAH, Oduro K.; ANTWI, Aaron O. Endocannabinoid system and its modulation of brain, gut, joint and skin inflammation. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 4, p. 3665-3680, abr. 2021. [Http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06366-1](http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06366-1).

PANDELIDES, Zacharias; THORNTON, Cammi; LOVITT, Kayla G.; FARUQUE, Anika S.; WHITEHEAD, Alyssa P.; WILLETT, Kristine L.; ASHPOLE, Nicole M.. Developmental exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) causes biphasic effects on longevity, inflammation, and reproduction in aged zebrafish (*Danio rerio*). **Geroscience**, v. 42, n. 3, p. 923-936, 30 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-020-00175-3>.

PEARSE, Anthony Guy Everson, **Histochemistry theoretical and applied**, 3 ed. Livingstone: Churchill, 214 p., 1985.

PEIXOTO, Luana dos Santos Fonseca; LIMA, Iasmin Fares Menezes de; SILVA, Carolina Pereira da; PIMENTEL, Luana Gonçalves; LIMA, Vanessa Bastos de Souza Rolim; SANTANA, Kássia Regina de; PAZ JÚNIOR, Francisco Braga da; PAZ, Eliana

Santos Lyra da. Ansiedade: o uso da *Cannabis sativa* como terapêutica alternativa frente aos benzodiazepínicos. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 7, p. 50502-50509, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n7-631>.

PEREIRA, Carolina Parga Martins; OLIVEIRA, Patricia Rosa; FURQUIM, Karim Cristina Scopim; BECHARA, Gervásio Henrique; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 124-130, dez. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.015>

PEREIRA, Melissa Carolina; ANHOLETO, Luis Adriano; KASA, Giovanna Gennari; CASTRO, Karina Neoob de Carvalho; CANUTO, Kirley Marques; SOUZA, Ana Sheila de Queiroz; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. 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, p. 1-7, jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108423>

PICOT, Stephane; BEUGNET, Frederic; LEBOUCHER, Gilles; BIENVENU, Anne-Lise. Drug resistant parasites and fungi from a one-health perspective: a global concern that needs transdisciplinary stewardship programs. **One Health**, v. 14, p. 100368, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100368>.

POLJŠAK, Nina; KREFT, Samo; KOČEVAR GLAVAČ, Nina. Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 2, p. 254–269, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.6524>>.

PUNJA, Zamir K.; HOLMES, Janesse E.. Hermaphroditism in Marijuana (*Cannabis sativa* L.) Inflorescences – Impact on Floral Morphology, Seed Formation, Progeny Sex Ratios, and Genetic Variation. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 11, p. 1-3, 25 jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00718>.

QUADROS, Danilo G.; JOHNSON, Tammi L.; WHITNEY, Travis R.; OLIVER, Jonathan D.; CHÁVEZ, Adela S. Oliva. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: pragmatism or utopia?. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 1 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11080490>.

RAMACHANDRAN, Prakash; MATCHETT, Kylie P.; DOBIE, Ross; WILSON-KANAMORI, John R.; HENDERSON, Neil C.. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 8, p. 457-472, 1 jun. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-0304-x>.

REMEDIO, Rafael Neodini; NUNES, Pablo Henrique; ANHOLETO, Luís Adriano; OLIVEIRA, Patrícia Rosa; SÁ, I.C.G.; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, v. 83, p. 19-31, abr. 2016. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004).

- ROMA, Gislaine Cristina; FURQUIM, Karim Christina Scopinho; BECHARA, Gervásio Henrique; MATHIAS, Maria Izabel Camargo. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae) fully engorged females. **Experimental And Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287-299, 20 out. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>.
- RUSSELL, L; WIEDERSBERG, S; BEGONADELGADOCHARRO, M. The determination of stratum corneum thickness An alternative approach. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 861-870, ago. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.002>.
- SALEEM, MZ; AKHTAR, R; ASLAM, Um; *et al.* Histopathological Investigation of Skin and Hides Damage of Small and Large Ruminants due to Naturally Infested Ticks. **Tropical biomedicine**, v. 36, n. 4, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33597477/>.
- SANGIOVANNI, Enrico; FUMAGALLI, Marco; PACCHETTI, Barbara; PIAZZA, Stefano; MAGNAVACCA, Andrea; KHALILPOUR, Saba; MELZI, Gloria; MARTINELLI, Giulia; DELL'AGLI, Mario. *Cannabis sativa* L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 8, p. 2083-2093, 2019. <https://doi.org/10.1002/ptr.6400>.
- SCHOEMAN, Recardia; BEUKES, Natasha; FROST, Carminita. Cannabinoid Combination Induces Cytoplasmic Vacuolation in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4682, 14 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204682>.
- SHANMUGANATHAN, Meera; SARFARAZ, Mohammad Omair; KROEZEN, Zachary; PHILBRICK, Holly; POON, Richel; DON-WAUCHOPE, Andrew; PUGLIA, Marco; WISHART, David; BRITZ-MCKIBBIN, Philip. A Cross-Platform Metabolomics Comparison Identifies Serum Metabolite Signatures of Liver Fibrosis Progression in Chronic Hepatitis C Patients. **Frontiers In Molecular Biosciences**, v. 8, p. 1-15, 3 ago. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.676349>.
- SHAO, Kimberly; STEWART, Campbell; GRANT-KELS, Jane M.. *Cannabis* and the skin. **Clinics In Dermatology**, v. 39, n. 5, p. 784-795, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.05.006>.
- SILVA, Isabela Santos; VALE, Letícia; COUTINHO, Ana Lúcia; SOUSA, Lainny Jordana Martins Pereira e; MARCHESINI, Paula; MATOS, Renata da Silva; ANHOLETO, Luís Adriano; MATHIAS, Maria Izabel Camargo; FERREIRA, Lorena Lopes; ARRUDA, Walquiria. Thymol and eugenol against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females: biological, histopathological and bioinformatic analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 319, p. 109938, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109938>.
- ŠLAPETA, Jan; CHANDRA, Shona; HALLIDAY, Bruce. The “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus*

linnaei. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 6, p. 431-436, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.001>.

ŠLAPETA, Jan; HALLIDAY, Bruce; CHANDRA, Shona; ALANAZI, Abdullah; ABDEL-SHAFY, Sobhy. *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. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>.

SODELLI, Luís Fernando; SILVA, Odaiza da; ARAÚJO, Bruna Jéssyca Nascimento; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 3, p. 1-13, 2023. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023041>.

STYRCZEWSKA, Monika; KOSTYN, Anna; KULMA, Anna; MAJKOWSKA-SKROBEK, Grazyna; AUGUSTYNIAK, Daria; PRESCHA, Anna; CZUJ, Tadeusz; SZOPA, Jan. Flax Fiber Hydrophobic Extract Inhibits Human Skin Cells Inflammation and Causes Remodeling of Extracellular Matrix and Wound Closure Activation. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/862391>.

SUNKARA, Prathyusha; CHENNURU, Sreedevi; KROVVIDI, Sudhakar; CHITICHOTI, Jyothisree. Cypermethrin and ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latrielle, 1806) collected from dogs in south India. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n. 1, p. 67-78, 18 set. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09830-2>.

TADEE, Phacharaporn; CHANSAKAOW, Sunee; TIPDUANGTA, Pramote; TADEE, Pakpoom; KHAODANG, Pakasinee; CHUKIATSIRI, Krida. Essential oil pharmaceuticals for killing ectoparasites on dogs. **Journal Of Veterinary Science**, v. 25, n. 1, 2024. XMLink. <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.23189>.

TAMBELI, Claudia Herrera; MARTINS, Guilherme Arthur; BARBOSA, Sabrina Legaspe; MACHADO, Tassia Tillemont. Integrative approach to the therapeutic use of *Cannabis* for orofacial pain. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2023. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20230013-en>.

TORABI, Atefeh; MADSEN, Frederikke Bahrt; SKOV, Anne Ladegaard. Permeation-Enhancing Strategies for Transdermal Delivery of Cannabinoids. **Cannabis And Cannabinoid Research**, v. 9, n. 2, p. 449-463, 1 abr. 2024. <Http://dx.doi.org/10.1089/can.2023.0130>.

TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen; WASSERMAN, David H.. The liver. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. 1147-1151, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.

VIEIRA, Lindicacia Soares; MARQUES, Ana Emília Formiga; SOUSA, Vagner Alexandre de. O uso de *Cannabis sativa* para fins terapêuticos no Brasil: uma revisão de literatura. **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 2, p. 901-919, 2020.

WAKSHLAG, Joseph J; CITAL, Stephen; EATON, Scott J; PRUSSIN, Reece; HUDALLA, Christopher. Cannabinoid, Terpene, and Heavy Metal Analysis of 29 Over-the-Counter Commercial Veterinary Hemp Supplements. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 11, p. 45-55, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.2147/vmrr.s248712>.

WANG, Hui; ZHANG, Xiaoli; WANG, Xiao; ZHANG, Baowen; WANG, Minjing; YANG, Xiaolong; HAN, Xuying; WANG, Rui; REN, Shuguang; HU, Yuhong. Comprehensive Analysis of the Global Protein Changes That Occur During Salivary Gland Degeneration in Female Ixodid Ticks *Haemaphysalis longicornis*. **Frontiers In Physiology**, v. 9, p. 1-16, 22 jan. 2019. [Http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01943](http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01943).

YANG, Ying; JI, Jing; DI, Liuqing; LI, Junsong; HU, Lihong; QIAO, Hongzhi; WANG, Lingchong; FENG, Yibin. Resource, chemical structure and activity of natural polysaccharides against alcoholic liver damages. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, p. 116355, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116355>.

ZHANG, Cheng; BJORNSEN, Elias; ARIF, Muhammad; TEBANI, Abdellah; LOVRIC, Alen; BENFEITAS, Rui; OZCAN, Mehmet; JUSZCZAK, Kajetan; KIM, Woonghee; KIM, Jung Tae. The acute effect of metabolic cofactor supplementation: a potential therapeutic strategy against non: alcoholic fatty liver disease. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 4, p. 1-16, abr. 2020. <https://doi.org/10.15252/msb.209495>.

ZHENG, Zhe; QI, Jianchao; HU, Liqiu; OUYANG, Dongfang; WANG, Huizhen; SUN, Qili; LIN, Lijun; YOU, Lidan; TANG, Bin. A cannabidiol-containing alginate-based hydrogel as novel multifunctional wound dressing for promoting wound healing. **Biomaterials Advances**, v. 134, p. 112560, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2021.112560>.

ŽUGIĆ, Ana; MARTINOVIĆ, Milica; TADIĆ, Vanja; RAJKOVIĆ, Miloš; RACIĆ, Gordana; NEŠIĆ, Ivana; KOREN, Anamarija. Comprehensive Insight into Cutaneous Application of Hemp. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 6, p. 748, 31 maio 2024. <Http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16060748>.