SARAH GOMES DE MENEZES BENEVENUTO

**Associação do uso recreacional da maconha durante a gestação
com desfechos gestacionais e comportamentais em camundongos**

São Paulo

2016

SARAH GOMES DE MENEZES BENEVENUTO

Associação do uso recreacional de maconha durante a gestação com desfechos gestacionais e comportamentais em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

CIRURGIA

Área de concentração:

ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS
E SILVESTRES

Orientador:

Prof. Dr. MARIANA MATERA VERAS

De acordo:

Orientadora

São Paulo

2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3337
FMVZ

Benevenuto, Sarah
Associação do uso recreacional da maconha durante a gestação com desfechos
gestacionais e comportamentais em camundongos / Sarah Benevenuto. -- 2016.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Matera Veras.

1. *Cannabis sativa*. 2. Gravidez. 3. Desenvolvimento fetal. 4. Implantação embrionária.
I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL À FUMAÇA DECORRENTE DA QUEIMA DE CANNABIS SATIVA SOBRE O DESENVOLVIMENTO CEREBRAL E COMPORTAMENTAL DA PROLE DE CAMUNDONGOS (BALBC)", protocolado sob o CEUA nº 5910070714, sob a responsabilidade de **Mariana Matera Veras e equipe; Sarah Gomes de Menezes Benevenuto; Natália de Souza Xavier Costa; Gabriel Ribeiro Júnior; Luciano Belloti; Maria Angelica Miglino; Vilma Leyton** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 17/12/2014.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECTS OF EXPOSURE TO PREGNANCY RESULTING SMOKE FROM BURNING OF CANNABIS SATIVA ON BEHAVIORAL AND BRAIN DEVELOPMENT OF OFFSPRING OF MICE (BalbC)", utilizing 30 Heterogenics mice (30 females), protocol number CEUA 5910070714, under the responsibility of **Mariana Matera Veras and team; Sarah Gomes de Menezes Benevenuto; Natália de Souza Xavier Costa; Gabriel Ribeiro Júnior; Luciano Belloti; Maria Angelica Miglino; Vilma Leyton** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 12/17/2014.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [0108201](#) a [0108201](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Procedência:

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [a](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [a](#)

Resumo: A Cannabis sativa, popularmente conhecida como maconha, é uma das drogas ilícitas mais consumidas no mundo. Segundo o INPAD (Instituto Nacional de Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas) no Brasil cerca 1,5 milhão de adolescentes e adultos usam maconha diariamente sendo entre as mulheres gestantes a droga mais consumida. Apesar do conhecimento dos efeitos adversos que o uso de drogas na gestação pode provocar sobre o desenvolvimento fetal e suas consequências mais tarde na vida adulta, o número de mulheres que consomem algum tipo de droga durante a gestação aumentou significativamente nos últimos anos. Os estudos disponíveis (experimentais e epidemiológicos) mostram que a exposição a preparados de Cannabis durante a gestação e lactação podem provocar efeitos teratogênicos e neuro-comportamentais, mas os resultados ainda são fragmentados e divergentes. Assim, propomos neste projeto um detalhado estudo experimental dos efeitos da exposição gestacional à fumaça da queima da maconha, utilizando um modelo realista que mimetiza o uso por humanos sob os aspectos de dose e meio de exposição, sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central em seus aspectos morfológicos e comportamentais em recém-natos e jovens adultos. Para tanto, camundongas grávidas serão expostas a fumaça da queima de cigarros de Cannabis sativa a partir do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia gestacional (GD). A avaliação do crescimento e bem estar fetal será realizada em dois momentos durante a gestação por métodos ultrassonográficos e dopplervolocimétricos. O comprometimento do desenvolvimento cerebral será avaliado por métodos estereológicos, e imunohistoquímicos e testes comportamentais serão aplicados em neonatos e jovens adultos para avaliar memória, aprendizado, força muscular, e ansiedade. Esperamos deste modo contribuir com evidências científicas que sirvam para fundamentar as decisões quanto ao uso, à legalização e demais deliberações referentes a esta droga.

Local do experimento:

São Paulo, 10 de maio de 2016

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BENEVENUTO, Sarah

Título: **Associação do uso recreacional da maconha durante a gestação com desfechos gestacionais e comportamentais em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Especialmente ao meu esposo, Rodolfo, pela compreensão e ajuda essencial para a conclusão deste estudo.

À todos os familiares, amigos e pesquisadores.

AGRADECIMENTOS

À minha família, próxima e distante, que tornaram condições adversas em uma experiência de segurança e otimismo. Especialmente ao meu esposo, Rodolfo, que não mediu esforços e incentivos para que fosse possível o cumprimento deste trabalho. A eles a minha admiração e amor.

À minha orientadora, Mariana, que me deu grandes oportunidades e é uma grande incentivadora profissional, além de me dar a oportunidade de desenvolver com ela, não apenas este trabalho, mas uma amizade. Sem dúvida, é um exemplo de profissional. Meu profundo, obrigada!

Aos colegas, amigos e professores do LPAE (FMUSP) e da Anatomia (FMVZ) que contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela estrutura física que ofereceu para a realização de todas as etapas deste estudo.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

*“Há muitas maneiras de ver o cérebro, como há muitas maneiras de ver o mundo.
Um modo de ver não é menos verdadeiro que o outro.”*

Roberto Lent- Cem bilhões de neurônios?

RESUMO

BENEVENUTO, S. G. M. **Associação do uso recreacional da maconha durante a gestação com desfechos gestacionais e comportamentais em camundongos.** [Association of the recreational use of marijuana during pregnancy with gestational outcomes and behavior in mice]. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A maconha é a droga ilícita mais consumida entre gestantes. Entretanto, os efeitos do uso materno sobre a gestação e o desenvolvimento fetal não são bem esclarecidos. Estudos experimentais e epidemiológicos apresentam resultados conflitantes devido à via de administração, tempo de exposição, dose e como a toxicidade da *Cannabis* é testada. Neste estudo experimental foram investigados os efeitos da inalação materna da fumaça de *Cannabis sativa*, aproximando as reais condições de uso da droga por humanos. Camundongas grávidas (n=20) foram expostas diariamente durante 5 minutos à fumaça decorrente da queima de maconha (0,2 g de Cannabis), ou ao ar filtrado, a partir do 5,5º dia gestacional (DG) ao 17,5º DG. A ingestão de alimentos e o peso materno foram registrados. Análise por ultrassom foram realizadas entre o 10,5º e o 16,5º DG. No 18,5º DG metade das fêmeas foram eutanasiadas para a avaliação dos fetos a termo, reabsorções e placentas. A duração da gestação, desfechos neonatais e comportamentais (reflexo, força muscular, ansiedade e memória) em neonatos e adultos foram avaliados na outra metade das fêmeas. A exposição diária de 5 min (dose baixa) durante a gestação resultou em redução do peso ao nascer mas o tamanho da prole não foi alterado; No entanto, o número de filhotes machos por prole foi maior. Além disso, o peso líquido da placenta foi aumentado e a proporção feto/placenta foi diminuída em machos, mostrando um efeito específico do sexo. A exposição também alterou a força muscular e reflexos em neonatos, além de causar prejuízos na memória e efeito ansiolítico na prole exposta. Em conclusão, os resultados indicam que o fumo da maconha durante a gestação, mesmo em doses baixas, pode ser embriotóxico, fetotóxico e pode alterar o comportamento em neonatos e adultos.

Palavras-chave: *Cannabis sativa*. Gravidez. Desenvolvimento fetal. Implantação embrionária.

ABSTRACT

BENEVENUTO, S. G. M. **Association of the recreational use of marijuana during pregnancy with gestational outcomes and behavior in mice.** [Associação do uso recreacional da maconha durante a gestação com desfechos gestacionais e comportamentais em camundongos]. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Marijuana is the most used illegal drug among pregnant women. However, the effects of maternal use on pregnancy and fetal development are not well understood. Experimental and epidemiological studies have shown conflicting results due to the route of administration, duration of exposure, dose, and a toxicity of Cannabis is tested. In this experimental study we investigated the effects of maternal inhalation of smoke Cannabis sativa, approaching the actual drug use conditions for humans. Pregnant mice (n=20) were exposed (only noise) daily for 5 min to smoke resulting from burning marijuana (0.2g Cannabis), or filtered air, from gestational day (GD) 5.5° to GD 17.5°. Food intake and maternal weight were recorded. Ultrasound analysis was performed on 10.5 and 16.5° GD. On 18.5° GD half the mice were euthanized for evaluation of term fetus, resorptions and placenta. The duration of pregnancy, neonatal outcomes and behavioral responses (reflex, muscle strength, anxiety and memory) were assessed in the other half of the females. The daily exposure of 5 min (low dose) during pregnancy resulted in reduced birth weight but the size of the offspring was not changed; however, the number of males per offspring pups was higher. In addition, placental weight was increased and fetus/placenta ratio was decreased in males, showing a particular effect of sex. The exposure also altered muscle strength and reflexes in newborns and caused impairment in memory and anxiolytic effects in exposed offspring. In conclusion, the results indicate that smoking marijuana during pregnancy, even in low doses, can be embryotoxic, fetotoxic and may change the behavior in neonates and adults.

Keywords: *Cannabis sativa*. Pregnancy. Fetal development. Embryo implantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do sistema de exposição à fumaça de <i>Cannabis sativa</i>	23
Figura 2 -	Ilustração esquemática do protocolo de exposição utilizado	24
Figura 3 -	Representação gráfica da ingestão diária de alimentos (g) das gestantes do grupo controle e exposto à Cannabis na primeira (do 5.5 ao 12.5 DG) e na segunda semana (do 13.5 ao 18.5 DG) de gestação	30
Figura 4 -	Exame morfológico dos fetos de camundongos do grupo Cannabis. Imagens de ultrassom dos fetos com 10.5 dpc (a-d) e 16.5 dpc (e-h) a,c) Vista sagital do feto: Comprimento crânio-caudal (CR) destacado e seta indicando o coração. b,d) Vista coronal do coronal do coração do feto: terceiro ventrículo (TV), quarto ventrículo (FV). e) seção transversal da placenta e do nível topográfico do fígado e do cordão umbilical (CU) do feto. f) seção transversal da placenta (PL) e do feto mostrando o membro superior. h) seção coronal do feto a termo.....	32
Figura 5 -	Médias de pesos (g) do rim, pulmão, cérebro, timo, coração e fígado nos grupos Cannabis e controle.....	33
Figura 6 -	Ganho de peso das proles do grupo controle e exposto ao longo da vida	52
Figura 7 -	Frequência de sucesso no endireitamento das proles controle e exposta no primeiro dia de teste (1T). O grupo exposto apresentou uma frequência de insucesso maior ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle	53
Figura 8 -	Latência ao se virar (seg) das proles dos grupos controle e exposto. O grupo exposto apresentou maior lentidão ($p < 0.02$) no primeiro dia de teste comparado ao grupo controle (1T)	53
Figura 9 -	Representação gráfica das médias $\pm$ DP do tempo (seg) gasto na reorientação das proles dos grupos controle e exposto. Nos dias 7, 9 e 10 pós-natal houve diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparadas ao grupo controle.....	54

Figura 10 -	Representação gráfica médias $\pm$ DP do número de pulls no teste 1 e 2 das proles dos grupos controle e exposto nos dias 2, 4, 6, 8, e 9 pós natal.....	55
Figura 11 -	Representação gráfica das médias $\pm$ DP do tempo (seg) de suspensão no teste 1 e 2 das proles dos grupos controle e exposto nos dias 2, 4, 6, 8, e 9 pós natal.....	55
Figura 12 -	Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos números de cada parâmetro avaliado (s) por sexo e grupo (controle e <i>Cannabis</i>), em cada idade (30DPN e 60 DPN). Os seguintes parâmetros estão representados: número de entradas nos braços abertos, número de vezes que o animal foi até o centro do aparato, número de entradas nos braços fechados no teste de LCE	56
Figura 13 -	Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos tempos de cada parâmetro avaliado (s) por sexo e grupo (controle e <i>Cannabis</i>), em cada idade (30DPN e 60 DPN). Os seguintes parâmetros estão representados: latência ao sair do centro do aparato, tempo gasto nos braços abertos, tempo gasto nos braços fechados e tempo de permanência no centro do aparato no teste de LCE	57
Figura 14 -	Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos tempos (s) em cada objeto nas sessões 1 e 2 por sexo e por grupo (controle e <i>Cannabis</i>), em cada idade (30DPN e 60 DPN). Os seguintes parâmetros estão representados: tempo de exploração no objeto A na sessão 1 e 2, tempo de exploração do objeto B na sessão 1 (30 DPN) e tempo de exploração do objeto C na sessão 2 (30 DPN) no teste LCE.....	60
Figura 15 -	Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos números de comportamentos exploratórios (s) na sessão 1, por sexo e grupo (controle e <i>Cannabis</i>), em cada idade (30DPN e 60 DPN)	60
Figura 16 -	Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos números de comportamentos exploratórios (s) na sessão treino 1, por sexo e grupo (controle e <i>Cannabis</i>), na idade de 30DPN e 60 DPN.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de média e desvio padrão (DP) e os coeficientes da variação dos resultados gestacionais	29
Tabela 2 -	Percentis do peso ao nascer de machos e fêmeas do grupo Cannabis e controle	31
Tabela 3 -	Valores de média e desvio padrão (DP) dos pesos fetais e placentários por grupos e gênero.....	31

CONTEÚDO

1	INTRODUÇÃO	16
2	IMPACTO DO USO RECREACIONAL DE MACONHA SOBRE OS DESFECHOS GESTACIONAIS E NO DESENVOLVIMENTO FETAL EM CAMUNDONGOS.....	19
2.1	INTRODUÇÃO.....	19
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.2.1	Animais	21
2.2.2	Droga	22
2.2.3	Sistema de Exposição.....	22
2.2.3.1	Cigarros de maconha	23
2.2.4	Protocolo de Exposição.....	23
2.2.5	Caracterização da exposição	24
2.2.5.1	Químicos	24
2.2.5.2	Preparação da amostra para análise GC-MS.....	25
2.2.5.3	Análise GC-MS.....	25
2.2.6	Desfechos gestacionais.....	26
2.2.7	Desenvolvimento fetal	26
2.2.7	Análise estatística	27
2.3	RESULTADOS	27
2.3.1	Caracterização da exposição	27
2.3.2	Resultados Gestacionais.....	28
2.3.3	Desenvolvimento fetal	28
2.3.3.1.	Avaliação ultrassonográfica.....	28
2.3.3.2	Peso corporal e dos órgãos fetais	30
2.3.3.3	Placenta	30
2.4	DISCUSSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	37
3	ASSOCIAÇÃO DE PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS COM O USO RECREACIONAL DE MACONHA DURANTE A GESTAÇÃO	44
3.1	INTRODUÇÃO.....	44
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46

3.2.1	Animais	46
3.2.2	Droga	47
3.2.3	Sistema de Exposição.....	47
3.2.4	Protocolo de Exposição.....	47
3.2.5	Avaliação da Prole.....	48
3.2.6	Testes de Comportamento em neonatos	48
3.2.6.1	Teste de Suspensão Traseira do Membro	48
3.2.6.2	Teste do Endireitamento sobre uma Superfície	49
3.2.6.3	Teste de Reação de Geotaxia Negativa.....	49
3.2.7	Testes Comportamentais em Jovens e Adultos	50
3.2.7.1	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	50
3.3	RESULTADOS.....	51
3.3.1	Peso da prole	51
3.3.2	Testes comportamentais	52
3.3.2.1	Testes comportamentais em neonatos.....	52
3.3.2.2	Testes comportamentais em Adultos	55
3.4	DISCUSSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	69
4	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* é uma planta da família das Canabiáceas, cultivada em várias regiões de climas temperados e tropicais do mundo e conhecida popularmente no Brasil como maconha. A Cannabis possui uma composição complexa que contém aproximadamente 480 substâncias químicas, incluindo 70 tipos de canabinóides. Os canabinóides são os constituintes ativos da maconha e entre eles está o Δ^9 - tetrahydrocannabinol (Δ^9 - THC ou somente THC), que é a principal substância psicoativa (ASHTON, 2001). A maconha pode ser utilizada de diversas formas, por via oral ou inalação da fumaça proveniente da queima. Alguns dos efeitos decorrentes do seu uso são: euforia, tranquilidade, relaxamento, percepções alteradas, aumento do apetite e intensificação de experiências sensoriais comuns (HALL; SOLOWIJ, 1998).

Nos últimos anos o consumo da *Cannabis sativa* entre as idades de 15- 64 anos foi estimado em 180,6 milhões de usuários (3,9%) no mundo (UNODC, 2009). Segundo o estudo desenvolvido pela Universidade Federal de São Paulo em 2012, cerca de 4,3% dos adolescentes e 5,8% dos adultos brasileiros usaram maconha alguma vez na vida (INPAD, 2012). Grupos vulneráveis como gestantes, principalmente adolescentes, também tem sido relatadas como usuárias de drogas ilícitas, incluindo a maconha (CRIPPA et al., 2005).

Apesar do conhecimento dos efeitos negativos na saúde fetal, o uso de algum tipo de droga ainda é bastante comum entre as gestantes adolescentes e adultas. De acordo com o Serviço Administrativo de Saúde Mental e Drogas de Abuso dos Estados Unidos (SAMHSA, 2009) os resultados de 2004 e 2005 apresentaram que 3,9% das gestantes relataram o uso de alguma droga ilícita no mês anterior a pesquisa. No trabalho realizado por Bessa et al. (2010) foram observados índices alarmantes do uso de drogas entre adolescentes gestantes na cidade de São Paulo, em que a prevalência de uso de maconha na gestação foi de 4% e de uso concomitante de maconha e cocaína 6%.

Diversos estudos experimentais e epidemiológicos mostraram que a exposição a preparados de *Cannabis* durante a gestação e lactação podem provocar efeitos teratogênicos e neurocomportamentais (FRIED et al., 2002; CAMPOLONGO

et al., 2009; BESSA et al., 2010; BATALLA et al., 2013). Entretanto, os resultados ainda são esparsos e fragmentados.

Sabe-se que o principal componente psicoativo da *Cannabis* é capaz de cruzar a barreira placentária ou ser secretado pelo leite materno (NAVARRO; RUBIO; DE FONSECA, 1995; SCHNEIDER, 2009). Estudos mostram que, os níveis séricos fetais da droga encontrados na mãe e no feto são similares, não havendo níveis seguros de uso durante a gestação (TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008).

Desde a identificação da Síndrome alcoólica fetal na década de 70 (RANDALL, 2001) houve um aumento significativo no número de estudos pré-clínicos e clínicos que avaliaram os efeitos de curto e longo prazo do uso de drogas de abuso durante a gestação sobre o desenvolvimento do conceito. Mas, os efeitos do uso de doses baixas ou moderadas destas mesmas substâncias durante a gestação e lactação são menos conhecidos.

Neste contexto, a pesquisa com *Cannabis* tem sido estimulada nos últimos anos pela descoberta de receptores específicos que reconhecem canabinóides, e por uma série de canabinóides endógenos que agem como ligantes para estes receptores (JAKUBOVIC; HATTORI; MCGEER, 1997).

O sistema endocanabinoide é um sistema de sinalização lipídica amplamente distribuído e apresenta uma função regulatória em diferentes sistemas do corpo de vertebrados. Os principais endocanabinóides são moléculas pequenas derivadas do ácido aracdônico: a anadamida e o 2-aracdonoilglicerol. Estas moléculas se ligam a dois tipos de receptores da família de receptores acoplados às proteínas-G: o CB1 e o CB2 (FONSECA et al., 2005).

O CB1 é amplamente encontrado principalmente em áreas do cérebro envolvidas no controle motor, cognição e resposta emocional (DEVANE et al., 1988) e os receptores CB2 foram encontrados inicialmente em órgãos linfóides, e depois nas células da micróglia (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Endocanabinóides são liberados sob demanda a partir de precursores lipídicos de forma dependente de receptor e servem como mensageiros retrógrados da sinalização nas sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas, bem como moduladores da transmissão pós-sináptica, interagindo com outros neurotransmissores, incluindo dopamina (ASHTON, 2001).

Além disso, o sistema endocanabinoide está presente nos estágios iniciais da ontogênese, durante a fertilização, pré-implantação embrionária e desenvolvimento

neural (FRIED, 2008), e os seus receptores canabinóides são também encontrados em diversos órgãos, incluindo, cérebro, ovários, útero e placenta (DAS et al., 1995; GALIÉGUE et al., 1995; PARK et al., 2003). Os receptores canabinóides agem inibindo a adenilil ciclase, canais de cálcio operados por voltagem (exceto CB2) e a ativação de canais de potássio (DEVANE et al., 1988).

Naturalmente os níveis de canabinóides endógenos diminuem progressivamente durante a gestação (HABAYEB et al., 2004). Esse fato suporta outras evidências de que seu baixo nível sistêmico é necessário para a progressão normal da gestação (MACCARONE et al., 2015). A presença de grandes quantidades de canabinóides no ambiente intra-uterino está associado com abortos espontâneos, perdas gestacionais e restrição do crescimento fetal em humanos e camundongos (ZUCKERMAN et al., 1989; PARIA. DAY, 2000). Outros estudos tem ainda demonstrado que o uso da maconha durante a gravidez pode ser associada com prematuridade e baixo peso ao nascer (CELLA et al., 2008; HAYATBAKHS et al., 2012).

Na literatura encontramos uma série de estudos experimentais que avaliaram os efeitos da exposição gestacional a maconha sobre o desenvolvimento fetal. Entretanto, os resultados encontrados são diferentes e em alguns casos divergentes e em sua maioria trata-se de desfechos cognitivos e comportamentais. Provavelmente, isto se deve a grande variedade de protocolos aplicados quanto ao tempo da exposição, rota de administração, composto usado e idade em que os animais foram expostos e avaliados.

Vale ressaltar que a maioria dos estudos utiliza métodos de exposição (injeções de THC) que não mimetizam a forma como a droga é utilizada por humanos (fumo), podendo diminuir os efeitos pela remoção da ação tóxica concomitante de outros compostos presentes na fumaça da queima. Além do THC, a *Cannabis* apresenta mais de 70 substâncias com potencial de contribuir para os efeitos, além do CO e de hidrocarbonetos presentes na fumaça devido à queima da biomassa.

Pesquisas sobre os efeitos adversos e benéficos do uso da maconha são de suma importância, pois podem fundamentar decisões quanto o uso medicinal e a legalização de seu uso; tendo estas decisões sérias consequências de saúde pública (MEIER et al., 2012). Debates sobre estas questões de legalização e sobre o uso medicinal estão em pauta em diversos países do mundo inclusive no Brasil.

2 IMPACTO DO USO RECREACIONAL DE MACONHA SOBRE OS DESFECHOS GESTACIONAIS E NO DESENVOLVIMENTO FETAL EM CAMUNDONGOS

2.1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, é consumida principalmente por meio do fumo por seus usuários. Segundo estimativas realizadas pela Organização das Nações Unidas sobre o consumo de drogas, a maconha é a droga mais consumida no mundo, com 140 milhões de usuários (UNODC, 2015). É também conhecido que os consumidores em sua maior parte são jovens e as exposições ocorrem durante a idade reprodutiva (SAMSHA, 2015). Além disso, entre as mulheres grávidas, a maconha aparece como a mais recorrente das drogas em questionários de auto-relato durante a gestação (ACOG, 2015; SAMSHA, 2010).

Evidências epidemiológicas têm mostrado que a maconha prejudica a trajetória de crescimento do feto resultando em baixo peso ao nascer, retardamento do crescimento intra-uterino (RCIU) e malformação congênita (GIBSON et al., 1983; FRIED et al., 1984; ZUCKERMAN et al., 1989; SHERWOOD et al., 1999; HURD et al., 2005; EL MARROUN et al., 2009). A saúde materna também é afetada negativamente; mães que consomem maconha apresentam maior prevalência de trabalho de parto disfuncional e precipitado, bem como líquido amniótico meconial (ALHARBI; EL-GUEBALY, 2014). Entretanto, os demais efeitos potencialmente adversos da inalação da fumaça da maconha durante a gravidez ainda são menos conhecidos.

A maior parte do conhecimento toxicológico sobre os efeitos da *Cannabis sativa* no trato reprodutivo e desenvolvimento fetal vem de estudos com animais. Nestes estudos, as exposições são feitas principalmente por gavagem do extrato da maconha ou Δ^9 -THC i.p (ABEL, 1975). Independentemente da via de administração (inalação, i.p., p.o. e i.v), os resultados destes estudos demonstram aumento da taxa de reabsorção e redução do peso fetal em camundongos e ratos (ROSENKRANTZ et al., 1978; PERSAUD; ELLINGTON, 1967; HARBISON E MANTILLA-PLATA, 1972; JONEJA, 1976; KOSTELLOW et al., 1978; FLEISCHMAN et al., 1980). Nenhum dos

estudos reportou malformações fetais. Abel et al. (1981) relataram que ratas gestantes expostas a diferentes doses de extrato de *Cannabis* (20, 200 mg / kg) ao longo da gestação apresentaram reduções no ganho de peso e no consumo de alimentos. O peso ao nascer foi reduzido apenas nos grupos expostos durante a terceira semana ou durante toda a gestação.

Charlebois e Fried (1980) avaliaram os efeitos da exposição ao fumo da maconha nos períodos gestacionais e pré-gestacionais de ratos alimentados com dieta de baixa, normal ou alta proteína. Eles observaram que a exposição a esta droga alongou o período de gestação e aumentou a ocorrência de natimortos e destruição da ninhada pela mãe. Quando a exposição foi combinada com uma dieta rica em proteínas, estes efeitos foram atenuados. Além disso, a avaliação dos resultados dos grupos expostos antes e durante a gestação sugere certo grau de tolerância aos efeitos da droga.

O THC e os seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira da placenta e atingir o feto (JAKUBOVIC et al., 1973; HUTCHINGS et al., 1989). O sistema endocanabinóide (SEC) tem um papel importante na reprodução, desde os primeiros estágios de desenvolvimento ontogênico para o parto, incluindo a fertilização, implantação do embrião, e placentação (SUN; DEY, 2012). O sistema endocanabinóide está presente em diferentes órgãos que desempenham várias funções fisiológicas. Ele é composto dos receptores de canabinóides (CB), CB1r e CB2r, que são receptores acoplados à proteína G, que estão diferencialmente distribuídos nos órgãos (DAS et al., 1995; GALIEGUE et al., 1995; PARK et al., 2003) e nas moléculas endógenas (endocanabinóides) derivadas de ácido araquidônico: anandamida (etanolamina N-aracdonil - ENA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). O Δ^9 -THC da maconha pode também ligar-se a receptores CB e ativar múltiplos caminhos de transdução de sinais intracelulares.

Estudos em humanos apresentam muitos fatores de confusão (estilo de vida, nível socioeconômico, status nutricional, idade e uso de tabaco) que tornam difícil para interpretação e estabelecimento de uma relação causal entre o uso da maconha e os resultados gestacionais prejudicados. Além disso, os estudos toxicológicos realizados em animais usam injeções intraperitoneais ou gavagem oral de Δ^9 -THC para realizar as exposições, o que exclui a interação com compostos presentes na fumaça que também poderiam contribuir para distúrbios de gravidez. Além disso, as doses utilizadas em tais estudos estão muito além das doses

comumente experimentadas por seres humanos (ABEL, 1975). A maioria dos estudos reconhece que há várias incertezas sobre os efeitos do uso materno da maconha e seus resultados gestacionais e fetais (VOLKOW et al., 2014). Nesse contexto, é também notória a significativa falta de informações sobre alterações nas funções da placenta, alterações no equilíbrio hormonal, efeitos específicos de sexo, efeitos sobre a organogênese (rim, pulmões, baço, e timo) e, finalmente, nos mecanismos biológicos, com perturbações do desenvolvimento fetal que ocorrem indiretamente (transmitido por via materna), diretamente, ou como uma combinação de ambos.

Estes aspectos e a propagação da legalização do uso recreativo da maconha salientam a necessidade urgente de novos estudos toxicológicos para reconhecer melhor os efeitos e elucidar os mecanismos envolvidos nessa associação do uso da maconha durante a gravidez. No presente estudo, foi desenvolvido um modelo experimental em murinos para estudar os efeitos do uso recreativo da maconha durante a gravidez, mimetizando as exposições humanas em termos de dose, e para avaliar os efeitos sobre os resultados gestacionais e fetais.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº. 5910070714). Realizamos experimentos de acordo com as Diretrizes Nacionais e Institucionais para o Bem-Estar Animal. Todos os animais foram tratados com humanidade, com a devida consideração para o alívio do sofrimento e desconforto.

Dois grupos de camundongos Balb/C foram utilizados neste estudo: 20 fêmeas com idades entre 60 dias e 3 machos com idades de 80 dias, com fertilidade comprovada. Os animais foram mantidos em um sistema de gaiolas ventiladas com

comida e água *ad libitum*. Temperatura (21 ± 2 ° C) e luz (12/12-h luz / ciclo escuro) foram controladas.

2.2.2 Droga

A maconha (contendo 0,3% de Δ^9 -THC) utilizada neste estudo foi doada para fins científicos pelo Núcleo de Perícias Médico Legal - Instituto de Criminalística de Marília, legalmente autorizado pela 3ª Vara Criminal da Comarca de Marília, São Paulo, Brasil. A droga vem de uma apreensão de drogas realizada pela polícia local.

2.2.3 Sistema de Exposição

O sistema de exposição (Figura1) é composto de uma bomba que sopra ar através de um filtro HEPA em um amortecedor de pulso. O fluxo de ar é dividido em duas direções que passam através das válvulas que controlam o fluxo. Um fluxo vai para a câmara de fumaça e o outro vai diretamente para a câmara de mistura. A câmara de fumaça é uma caixa vedada de 1 litro de volume com uma abertura para o fluxo de ar, criando uma pressão positiva que obriga o fluxo de ar a passar através do cigarro, e, conseqüentemente, a fumaça flui para a câmara de mistura. A câmara de mistura é outro compartimento vedado de 1 L de volume com um anteparo para promover o processo de mistura. O fluxo da fumaça foi controlado a 1,2 L/min. A mistura de ar com fumaça foi conduzido para a câmara onde as fêmeas estavam dispostas em suportes tubulares individuais (n = 8). O cigarro preparado de maconha tem a duração de 5 minutos de exposição neste sistema. Um sistema idêntico foi construído para realizar exposições com o grupo controle.

Figura 1- Representação esquemática do sistema de exposição à fumaça de *Cannabis sativa*

Fonte: Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE), Faculdade de Medicina da USP.

2.2.3.1 Cigarros de maconha

Os cigarros foram preparados com 200mg de maconha. Tal conteúdo foi manualmente inserido dentro dos invólucros (tubos) de cigarros brancos disponíveis comercialmente. Isto permitiu-nos preparar cigarros padronizados.

2.2.4 Protocolo de Exposição

Vinte fêmeas (BalbC) saudáveis foram distribuídas aleatoriamente no grupo de *Cannabis* ou controle ($n = 10$ camundongos por grupo). Durante 7 dias consecutivos, todas as fêmeas foram treinadas para familiarização com os procedimentos experimentais e com os pesquisadores.

Após o período de treino, as fêmeas foram alojadas com machos (2: 1) e a presença de um *plug* vaginal ou esperma no lavado vaginal foi considerado como evidência de acasalamento. Assim, foi determinado 0,5° dia de gestação (DG). As fêmeas grávidas foram expostas durante 5 minutos à fumaça da maconha ou ao ar filtrado do DG 5,5 até 17,5 (Figura2). O tempo de exposição foi semelhante ao descrito por Lichtman. et al. (2001), com algumas modificações (Figura 2).

2.2.5.2 Preparação da amostra para análise CG-EM

As análises foram realizadas usando a técnica de Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa (CG- EM). As amostras de urina (200 μ l) foram hidrolisadas com NaOH. Após o passo de hidrólise, a solução foi acidificada e, em seguida, extraiu-se por mistura de hexano/acetato de etilo (9/1). A camada orgânica foi recolhida e seca sob corrente de azoto. O extrato foi derivado com a adição de 50 μ L de BSTFA com 1% TMCS e incubou-se a 80 ° C durante 30 min. Um microlitro da solução final foi, em seguida, injetado na coluna de cromatografia de gás. Como um padrão interno, foi utilizado 50 μ l de D3 THC (1 μ g/ml).

2.2.5.3 Análise CG-EM

As análises foram realizadas em um sistema 7890A 5975C-GC-MS (Agilent Technologies) com um HP-5 MS equipado com uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e usando uma injeção splitless. A temperatura de injeção foi de 280 ° C. O gás transportador, hélio, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min e o volume de injeção de 1 μ l. A temperatura da coluna foi mantida a 170 ° C durante 0,5 min e, em seguida, aumentada para 200°C a uma velocidade de 35°C/min. A temperatura foi subsequentemente elevada para 290°C a uma velocidade de 20°C, a cada 2 min. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C. As temperaturas da fonte de íons e quadripolos foram mantidas a 280°C e 200°C, respectivamente. Modo de monitoração iônica seletiva (SIM) foi usado com um tempo de pausa de 50 ms. Os tempos de retenção foram 5,90 e 6,66 minutos para THC-D3 e THC-COOH, respectivamente. Os seguintes íons qualitativos (m/z) foram analisados: THC-d3, 306, 374, 389; THC, 303, 315, 371, 386; e THC-COOH, 371, 372, 473, 488.

2.2.6 Desfechos gestacionais

As fêmeas grávidas foram pesadas diariamente durante o período de exposição, e sua ingestão de alimentos foi registrada. No 18,5 DG metade das fêmeas foram eutanasiadas por injeção i.p. de pentobarbital de sódio (200 mg/kg de peso corporal). A parede abdominal foi aberta imediatamente, e o útero foi examinado com cuidado. Os fetos e placentas foram removidos, pesados e verificados quanto às malformações. À outra metade das fêmeas grávidas foi permitido darem a luz, naturalmente. Tais fêmeas e suas proles foram monitoradas continuamente, a fim de verificar se os descendentes nascidos foram mortos ou vivos.

O exame do útero gravídico permitiu-nos contar o número de locais de implantação e identificar reabsorções. Para isso, os fetos e placentas foram cuidadosamente dissecados e pesados. O sexo dos fetos foi registrado e o número de corpos lúteos nos ovários foi contado por meio de um microscópio estereoscópico. Metade desse material foi fixado em paraformaldeído a 4% em PBS e a outra metade foi congelada (-80°C) para análises posteriores. Além disso, os seguintes parâmetros foram calculados (US EPA, 1996):

- ✓ índice de perda pré-implantacional = $[(NCL - Nis) / Ncl] \times 100$
- ✓ índice de perdas pós-implantacional = $[(Nis - Nftp) / Nis] \times 100$
- ✓ Índice de Implantação = $[Nimp / NCL] \times 100$

Onde NCL representa o número de corpo lúteo, Nis é o número de sítios de implantação, Nftp representa o número de filhotes a termo e Nimp, representa o número de implantações.

2.2.7 Desenvolvimento fetal

O desenvolvimento fetal foi avaliado durante a gravidez usando biomicroscopia ultrassônica (MU; ADAMSON, 2006). No 10,5 e 16,5 DG foram realizados avaliações morfológicas de todas as fêmeas gestantes, com dois fetos

por fêmea. Foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento craniocaudal (CRL), diâmetro biparietal, diâmetro anteroposterior abdominal, diâmetro transversal abdominal, diâmetro da placenta e espessura da placenta. As análises foram realizadas com o auxílio de um sistema de imagem de ultrassom de alta frequência (Vevo 2100, Sonics Visuais, Toronto, Canadá) com um transdutor de 40 MHz por MMV. O tempo limite de duração do exame e da sedação por isoflurano por animal foi fixado em 30 min. Além disso, uma amostra aleatória de fetos fixados de cada grupo foi selecionada e os seus órgãos foram dissecados e pesados para verificar o desenvolvimento fetal. A razão de peso feto-placenta foi calculada como um indicador de disfunção feto-placentária.

2.2.7 Análise estatística

O software *Statistical Package for Sciences® Social (SPSS)* versão 17.0 foi utilizado para todas as análises estatísticas. Os dados são apresentados como médias e desvios-padrão. Para a comparação dos parâmetros reprodutivos entre os grupos, foi utilizado o teste t de *Student* ou o teste de *Mann-Whitney* para amostras independentes. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar os índices reprodutivos entre os grupos. Para alguns parâmetros, a fim de controlar a variabilidade dentro de um grupo, o coeficiente de variação para cada uma das variáveis foi calculado ($CV = \text{desvio padrão} / \text{média}$). O valor de $p < 0,05$ foi atribuído para significância estatística.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Marcador da exposição

Foi possível identificar e confirmar a presença de THC-COOH, o principal biomarcador de exposição à *Cannabis*, em todas as 20 amostras de urina. A

detecção e identificação foram realizadas por confirmação de m/z de THC-d3, 306, 374, 389; THC, 303, 315, 371 e 386 - COOH THC, 371, 372, 473, 488, além das intensidades dos picos.

2.3.2 Resultados Gestacionais

A Tabela 1 mostra os resultados de efeitos gestacionais. Não houve diferença no número de filhotes por ninhada e feto mortos entre os grupos. O grupo exposto à *Cannabis* apresentou mais filhotes do sexo masculino quando comparado ao grupo controle ($p = 0,04$). Não foi observada nenhuma diferença significativa no índice de perda de implantação e índices de perdas pré e pós-implantacionais entre os grupos. No entanto, o índice de perda pós-implantacional foi quase duas vezes maior no grupo exposto à *Cannabis*.

O ganho de peso total do corpo materno durante a gravidez não foi diferente entre os grupos. No entanto, quando o peso do útero gravídico e o peso materno inicial foram excluídos, houve uma diferença significativa que é conhecida como o ganho de peso líquido materno ($p = 0,03$). Na primeira semana de exposição (5,5 ao 12,5 DG), as fêmeas grávidas do grupo *Cannabis* apresentaram uma pequena redução no consumo de alimentos (ingestão semanal ou diária de alimentos), em comparação ao grupo controle, mas essa diferença não alcançou significância estatística. Na segunda semana (13 ao 18,5 DG), este cenário foi revertido. As grávidas do grupo exposto à *Cannabis* consumiram, semanalmente ou diariamente, mais alimentos em comparação com as fêmeas do grupo controle, mas, novamente, as diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 3).

2.3.3 Desenvolvimento fetal

2.3.3.1. Avaliação ultrassonográfica

Não houve diferença no desenvolvimento intra-uterino e crescimento da placenta fetal no período entre 10,5 e 16,5 DG quando avaliados por

ultrassonografia. Malformações ósseas ou viscerais não foram encontradas na prole de ambos os grupos durante o exame (Figura 4).

Tabela 1 - Valores de média e desvio padrão (DP) e os coeficientes da variação dos resultados gestacionais

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	CV	p
Peso inicial materno (g)	<i>Cannabis</i>	10	22.5	1.5	7%	ns
	Controle	10	21.2	1.4	7%	
Peso final materno (g)	<i>Cannabis</i>	10	36.3	3.3	9%	ns
	Controle	10	38.3	3.9	10%	
Ganho de peso líquido materno(g)	<i>Cannabis</i>	5	3.9	1.8	46%	0.03
	Controle	5	8.1	1.3	17%	
Peso uterino (g)	<i>Cannabis</i>	5	10.8	1.4	13%	ns
	Controle	5	11.7	3.0	25%	
Número de filhotes por ninhada	<i>Cannabis</i>	10	7.5	1.3	17%	ns
	Controle	10	7.3	3.0	41%	
Número de machos por ninhada	<i>Cannabis</i>	10	4.2	1.7	41%	0.04
	Controle	10	2.7	1.3	50%	
Número de fêmeas por ninhada	<i>Cannabis</i>	10	2.7	1.0	38%	ns
	Controle	10	3.3	1.7	52%	
Número de fetos mortos	<i>Cannabis</i>	10	0.7	1.6	234%	ns
	Controle	10	0.1	0.3	316%	
Índice implantacional	<i>Cannabis</i>	5	79.9	16.8	21%	ns
	Controle	5	80.9	12.1	15%	
Número total de reabsorção	<i>Cannabis</i>	5	2.0	1.0	50%	ns
	Controle	5	1.2	0.8	70%	
Número de reabsorção tardia	<i>Cannabis</i>	5	0.2	0.4	224%	ns
	Controle	5	0.0	0.0		
Índice de perda pré-implantacional	<i>Cannabis</i>	5	20.1	16.8	84%	ns
	Controle	5	19.1	12.1	63%	
Índice de perda pós-implantacional	<i>Cannabis</i>	5	27.4	15.8	58%	ns
	Controle	5	14.8	9.2	62%	
Número de Corpos lúteos	<i>Cannabis</i>	5	11.6	2.7	23%	ns
	Controle	5	12.0	1.4	12%	

Figura 3 - Representação gráfica da ingestão diária de alimentos (g) das gestantes do grupo controle e exposto à *Cannabis* na primeira (do 5.5 ao 12.5 DG) e na segunda semana (do 13.5 ao 18.5 DG) de gestação

2.3.3.2 Peso corporal e dos órgãos fetais

O peso fetal foi significativamente menor nos filhotes nascidos a partir de grávidas expostas à fumaça da *Cannabis* quando comparado ao grupo controle ($p = 0,02$). Observou-se uma redução média de 9,9% no peso ao nascer. Quando analisados por prole, o peso médio fetal foi significativamente diferente ($p = 0,03$).

Quando analisados por sexo, os machos do grupo *Cannabis* pesavam 14,3% a menos (0,15 g) do que filhotes machos do grupo controle ($p = 0,001$). Em relação às fêmeas, não foram observadas diferenças no peso ao nascer (Tabela 3). Percentis do peso fetal masculino e feminino estão representados na Tabela 2. Avaliação do peso dos órgãos fetais revelaram decréscimos significativos nos pesos dos pulmões ($p = 0,001$), cérebro ($p = 0,002$), timo ($p = 0,033$) e do fígado ($p = 0,008$) de neonatos do grupo exposto à maconha (Figura 5).

2.3.3.3 Placenta

A exposição à fumaça da *Cannabis* durante a gravidez afetou o peso da placenta (Tabela 3). Quando todos os filhotes foram analisados em conjunto, houve

um aumento significativo no peso da placenta ($p = 0,04$). A razão empesofeto-placenta (F/P) foi significativamente reduzida ($p = 0,009$). Quando analisados por diferenças de gênero entre os grupos, peso da placenta e F/P foram significativos apenas para filhotes machos.

Tabela 2 - Percentis do peso ao nascer de machos e fêmeas do grupo Cannabis e controle

	Grupo	Percentis						
		5	10	25	50	75	90	95
Peso corporal dos MACHOS (g)	Controle	0.82	0.82	0.94	1.03	1.15	1.24	.
	Cannabis	0.68	0.72	0.84	0.92	0.96	1.03	1.07
Peso corporal das FÊMEAS (g)	Controle	0.67	0.69	0.91	0.96	1.00	1.17	.
	Cannabis	0.83	0.83	0.90	0.95	0.99	1.00	.

Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão (DP) dos pesos fetais e placentários por grupos e gênero

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	CV	p
Peso ao nascer por prole (g)	Controle	5	1.02	0.16	16%	ns
	<i>Cannabis</i>	5	0.9	0.018	2%	
Peso ao nascer (g)	Controle	37	1.01	0.15	15%	0.02
	<i>Cannabis</i>	36	0.91	0.09	10%	
Peso da prole(g)	Controle	5	7.44	2.2	30%	ns
	<i>Cannabis</i>	5	6.54	1.3	20%	
Peso da placenta (g)	Controle	37	0.10	0.03	30%	0.04
	<i>Cannabis</i>	36	0.15	0.04	27%	
Razão de peso feto/placenta	Controle	37	11.03	2.39	22%	0.009
	<i>Cannabis</i>	36	6.59	1.48	22%	
FILHOTES MACHOS						
Peso corporal (g)	Controle	18	1.04	0.15	14%	0.001
	<i>Cannabis</i>	24	0.89	0.11	12%	
Peso da placenta (g)	Controle	18	0.10	0.02	20%	0.03
	<i>Cannabis</i>	24	0.15	0.04	27%	
Razão de peso feto/placenta	Controle	18	10.90	2.47	23%	0.004
	<i>Cannabis</i>	24	6.33	1.76	28%	
FILHOTES FÊMEAS						
Peso corporal (g)	Controle	19	0.96	0.15	16%	ns
	<i>Cannabis</i>	12	0.94	0.06	6%	
Peso da placenta (g)	Controle	19	0.10	0.04	40%	ns
	<i>Cannabis</i>	12	0.14	0.02	14%	
Razão de peso feto/placenta	Controle	19	11.29	2.72	24%	ns
	<i>Cannabis</i>	12	7.10	0.68	10%	

Figura 4 - Exame morfológico dos fetos de camundongos do grupo *Cannabis*. Imagens de ultrassom dos fetos com 10.5 dpc (a-d) e 16.5 dpc (e-h) a,c) Vista sagital do feto: Comprimento crânio-caudal (CR) destacado e seta indicando o coração. b,d) Vista coronal do cérebro do feto: terceiro ventrículo (TV), quarto ventrículo (FV). e) seção transversal da placenta e do nível topográfico do fígado e do cordão umbilical (CU) do feto. f) seção transversal da placenta (PL) e do feto mostrando o membro superior. h) seção coronal do feto a termo

Fonte: Imagens realizadas por MMM e SGM

2.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, a inalação da fumaça da maconha afetou negativamente os resultados gestacionais e fetais no modelo de exposição camundongos Balb/C. Cinco minutos de exposição diária (dose baixa) durante a gravidez resultou em redução do peso ao nascer, porém o tamanho da prole não foi alterado; no entanto, o número de filhotes machos por ninhada foi maior. Além disso, o peso líquido da placenta foi aumentado e a razão entre o peso do feto e da placenta foi diminuída em fetos do sexo masculino, mostrando um efeito específico do sexo. Embora não seja significativa, a diferença no índice de perdas pós-implantacionais foi duas vezes maior nos camundongos do sexo feminino do grupo *Cannabis*. Os procedimentos de exposição e de manipulação dos animais não afetaram o consumo materno de alimentos em ambos os grupos. No final da gestação, apesar de um discreto aumento na ingestão diária de alimentos do grupo exposto em comparação ao grupo controle, as fêmeas do grupo exposto apresentaram ganho de peso líquido materno reduzido em comparação com as fêmeas do grupo controle.

Figura 5 - Médias de pesos (g) do rim, pulmão, cérebro, timo, coração e fígado nos grupos Cannabis e controle

A maior parte dos estudos experimentais disponíveis utiliza injeções intraperitoneais ou gavagem oral de Δ^9 -THC para efetuar exposições e investigar os efeitos tóxicos da maconha na gravidez e nos efeitos fetais. A ideia do nosso modelo foi representar o mais próximo possível as condições "reais" do uso de maconha por humanos. Isto significa que no presente estudo os animais foram expostos, não só para Δ^9 -THC, mas a toda fumaça produzida pela pirólise da maconha. Para isso, foi desenvolvida uma câmara de exposição de baixo custo, eficiente e reprodutível para conduzir exposições controladas à fumaça desta droga.

Exposições de animais experimentais utilizando inalação de fumaça são raramente realizadas na pesquisa devido às muitas dificuldades para controlar e padronizar o processo de exposição (HO et al., 1970; LICHTMAN et al., 2001; MOIR et al., 2008). Essa exposição foi realizada com base no trabalho Lichtman et al. (2001). No seu estudo camundongos foram expostos, por via de inalação, a queima do cigarro maconha (200 mg) durante 5 minutos num fluxo de fumaça controlado. O nosso modelo de exposição tem sido bem sucedido, uma vez que foi confirmada a presença de THC-COOH na urina dos animais. Além disso, este método também mostrou-se seguro e não estressante, sem causar mortes durante o processo de exposição e sem causar mudanças no comportamento alimentar dos animais.

Revisões recentes destacam a importância do sistema endocanabinóide para implantação e placentação e, embora os mecanismos não sejam completamente compreendidos, os dados sugerem que a concentração controlada de endocanabinóides é essencial para o desenvolvimento bem sucedido do embrião

(CHAN et al., 2013; MELFORD; TAYLOR; KONJE et al., 2014). Uma vez que o Δ^9 -THC pode ligar-se aos mesmos receptores que a anandamida (AEA), que é um canabinóide endógeno que participa no controle de muitas funções reprodutoras, tais como a implantação e desenvolvimento fetal (MACCARONE et al., 2015), o THC pode agir sobre o equilíbrio do sistema ou no seu controle, afetando o desenvolvimento do embrião e a placentação. Os níveis de canabinóides endógenos reduzem durante a evolução da gestação (HABAYEB et al., 2004); níveis sistêmicos baixos são necessários para uma progressão saudável da gravidez (MACCARONE et al., 2015) e qualquer aumento nos níveis de anandamida impactam a gestação, aumentando o risco de aborto, perda da gravidez, e a restrição de crescimento em humanos e camundongos (ZUCKERMAN et al., 1989; PARIA; DEY, 2000). Além disso, a AEA aumenta a atividade de NOS (síntese de óxido nítrico), a qual atua como um local de vaso-relaxante potente que é importante para a manutenção da resistência do fluxo vascular na circulação fetoplacentária (ABAN et al., 2013).

Dependendo da via de administração, dose, tempo de exposição, tipo de animal e como a toxicidade *Cannabis* é testada (extratos preparados, componentes específicos, ou por pirólise), os resultados dos estudos podem variar. Harbison e Mantilla-Plata (1972); Mantilla-Plata, Clewe e Harbison (1975) e Joneja (1976) observaram que, dependendo do período de gestação de exposição a Δ^9 -THC, os resultados são diferentes. Exposições durante as fases iniciais estão associados com o aumento da reabsorção fetal e perda da gravidez, dependendo da dose, e exposições no meio da gestação podem levar ao retardo do crescimento fetal. Estudos revisados por Abel (1985) usaram sonda gástrica para administrar a droga e isso pode ter causado algum desconforto (lesão da mucosa gástrica) e, portanto, poderia ter influenciado na ingestão de alimentos. Trezza et al. (2008) e Campolongo et al. (2011) utilizaram a gavagem para tratar camundongas grávidas (2.5- 5mg / kg THC) a partir do 15 DG até o fim da gravidez, e nenhuma diferença no ganho de peso materno e do feto foi observada. Em contraste com Abel (1985), que apontou que a administração de canabinóides reduz o consumo de comida e água (e isso também pode influenciar no peso materno e fetal), a ingestão de alimentos não foi alterada em nosso estudo.

No entanto, os efeitos observados em nosso estudo devem ser interpretados e atribuídos à inalação da fumaça produzida pela pirólise da *Cannabis sativa* e não a quaisquer componentes específicos (por exemplo, THC). Existem várias substâncias

químicas nocivas presentes na fumaça de maconha, NO, NOx, CO, cianeto de hidrogênio, aminas aromáticas, amônia, tolueno, benzeno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (MOIR et al., 2008), com potenciais efeitos sobre a saúde materna e fetal (HUDAK; UNGVARY, 1978; LONGO, 1997; SLADEK; MAGNESS; CONRAD, 1997; CHOI et al., 2008; FARHI et al., 2014).

A observação de taxas mais altas de perdas pós-implantação e aumento do número de filhotes machos por ninhada no grupo *Cannabis* permitiu-nos sugerir uma outra conclusão: no início da gravidez embriões do sexo feminino são mais suscetíveis (período de implantação) aos efeitos do fumo. Embriões machos e fêmeas apresentam diferenças não só em cromossomos sexuais, mas em seu metabolismo devido às diferenças de sexo e genes de expressão autossômicas relacionados e pode, conseqüentemente, determinar a susceptibilidade de gênero (KOBAYASHI et al., 2006; GARDNER, LARMN; THOUAS et al., 2010; DONJACOUR et al., 2014). Além do mais, estudos têm apresentado que canabinóides exógenos podem interferir com sistemas endógenos (MATO et al., 2004; HOFFMAN, 2007). Outra investigação utilizando modelos experimentais demonstrou que a maconha e seu componente ativo, Δ^9 -THC, agem em alguns sistemas hormonais que incluem gônadas, adrenais, prolactina e regulação hormonal da tireóide (BROWN; ADRIAN, 2002).

Outro fator relacionado a efeitos sexo-específico é a ação do sistema HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal) que é ativado sob estresse pré-natal e que tem ação direta sobre o sistema nervoso, causando alterações na modulação de neurotransmissores e hormônios sexuais (SANDI; HALLER, 2015). A exposição perinatal aos canabinóides alteram o desenvolvimento normal dos neurônios serotoninérgicos e essas mudanças pode ser estar relacionadas a alterações específicas no sexo. A última semana de vida pré-natal e as três primeiras semanas de vida pós-natal em ratos são o período de maior vulnerabilidade de neurotransmissores a ação da droga (MOLINA- HOLGADO, 1996).

Quanto às diferenças no peso da placenta, os nossos dados indicam que a inalação de fumaça da *Cannabis* durante a gravidez comprometeu a eficiência placentária. Placentas do grupo *Cannabis* tiveram um peso maior, embora o peso fetal tenha sido reduzido, em relação ao grupo controle. Isto implica que mais gramas de tecido fetal por grama de placenta foram necessários para apoiar o desenvolvimento. Este efeito foi observado no sexo masculino, mas com uma

significância limítrofe no sexo feminino; os mecanismos envolvidos necessitam ser investigados, embora hipóxia e alterações metabólicas maternas possam estar envolvidas (WILSON; FORD, 2001; FOWDEN et al., 2009).

Muitos mecanismos poderiam reforçar o comprometimento do desenvolvimento fetal observado em nosso estudo. A redução do peso ao nascer e crescimento intra-uterino restrito são efeitos comumente associados com a exposição a *Cannabis* sativa durante a gravidez (MANTILLA-PLATA et al., 1975; MURTHY et al., 1986, ZUCKERMAN et al., 1989; HAYATBAKHSH et al., 2012); No entanto, nenhum estudo anterior relatou aumento da susceptibilidade de fetos do sexo masculino para o efeito. Dois estudos encontraram resultados semelhantes de aumento do número de filhotes machos por ninhada de grávidas expostas (FRIED; CHARLEBOIS, 1979; HUTCHINGS et al., 1987).

Houve algumas limitações neste estudo. A avaliação da presença de THC-COOH na urina dos camundongos é um indicador de exposição, mas não de dose. O pequeno volume de urina que foi possível coletar após as exposições, bem como a exposição de baixa dose que adotamos neste estudo, foram algumas das dificuldades para se determinar as quantidades nesta matriz biológica. No estudo de Lichtman et al. (2001), camundongos foram expostos por via inalatória à fumaça produzida pela queima de 50, 100 e 200 mg de maconha, contendo 3,4% de Δ^9 -THC durante 5 min. As doses estimadas de Δ^9 -THC foram de 2,0, 3,5, e 5,6 mg/kg, respectivamente. A exposição foi realizada de um modo muito semelhante. Foram queimamos 200 mg de maconha, durante 5 minutos, no entanto esta amostra apresentou 10 vezes menor quantidade de Δ^9 -THC (0,3%), o que nos permite sugerir uma dose de exposição equivalente a 0,5 mg / kg.

REFERÊNCIAS

- ABAN, C.; LEGUIZAMÓN, G.F.; CELLA, M.; DAMIANO, A.; FRANCHI, A.M.; FARINA, M.G. Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: Effects on nitric oxide synthesis. **Placenta**, v. 34, n. 1, p. 67-74, Nov, 2013.
- ABEL, E.L. Cannabis: Effects on hunger and thirst. **Behavioral Biology**, v.15, n.3, p. 225-81, Nov, 1975.
- ABEL, E.L.; BUSH, R.; DINTCHEFF, B.; ERNST, C.A. Critical periods for marihuana-induced intrauterine growth retardation in the rat. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v. 3, n. 3, p. 351-354, 1981.
- ALHARBI, F.; EL-GUEBALY, N. Exploring the management of cannabis use among women and during pregnancy. **Addictive Disorders & Their Treatment**, v. 13, n.2, p. 93–100, Jun, 2014.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG). Marijuana use during pregnancy and lactation. Committee Opinion. **Obstetric Gynecology**, v. 126, n. 637, p. 234–238, Jul, 2015.
- BROWN, T.T.; DOBS, A. S. Endocrine effects of marijuana, **Journal Clinic Pharmacology**, v.42, p. 90S-96S, Nov, 2002.
- CAMPOLONGO, P.; TREZZA, V.; RATANO, P.; PALMERY, M.; CUOMO, V. Developmental consequences of perinatal cannabis exposure: behavioral and neuroendocrine effects in adult rodents. **Psychopharmacology**, v. 214, n.1, p. 5–15, Mar, 2011.
- CHAN, H.W.; MCKIRDY, N.C.; PEIRIS, H.N.; RICE, G.E.; MITCHELL, M.D. The role of endocannabinoids in pregnancy. **Reproduction**, v. 146, n. 3, p. 101-109, Jul, 2013.
- CHARLEBOIS, A.T.; FRIED, P.A. Interactive effects of nutrition and cannabis upon rat perinatal development. **Developmental Psychobiology**, v.13, n.6, p. 591-605, Nov, 1980.

CHOI, H.; RAUH, V.; GARFINKEL, R.; TU, Y.; PERERA, F.P. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. **Environmental Health Perspect**, v. 116, n. 5, p. 658-65, Jan, 2008.

DAS, S.K.; PARIA, B.C.; CHAKRABORTY, I.; DEY, S.K. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, n.10, p. 4332-433, May, 1995.

DONJACOUR, A.; LIU, X.; LIN, W.; SIMBULAN, R.; RINAUDO, P.F. In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. **Biology and Reproduction**, v. 90, n. 4, p. 80, Apr, 2014.

EL MARROUN, H.; HUDZIAK, J.J.; TIEMEIER, H.; CREEMERS, H.; STEEGERS, E.A.; JADDOE, V.W.; HOFMAN, A.; VERHULST, F.C.; VAN DEN BRINK, W.; HUIZINK, A.C. Intrauterine cannabis exposure leads to more aggressive behavior and attention problems in 18-month-old girls. **Drug Alcohol Dependency**, v.118 n.2-3, p. 470-474, Nov, 2011.

FARHI, A.; BOYKO, V.; ALMAGOR, J.; BENENSON, I.; SEGRE, E.; RUDICH, Y.; STERN, E.; LERNER-GEVA, L. The possible association between exposure to air pollution and the risk for congenital malformations. **Environmental Research**, v.135, p. 173-180, Nov, 2014.

FLEISCHMAN, R.W.; NAQUI, R.H.; ROSENKRANTZ, H.; HAYDEN, D.W. The embryotoxic effects of cannabinoids in rats and mice. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 1471-1482, Aug, 1980.

FOWDEN, A.L.; SFERRUZZI-PERRI, A.N.; COAN, P.M.; CONSTANCIA, M.; BURTON, G.J. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **Journal Physiology**, v. 587, n.14, p. 3459-3472, Jul, 2009.

FRIED, P.A.; WATKINSON, B.; WILLAN, A. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.150, n.1, p. 23-27, Sep, 1984.

GARDNER, D. K.; LARMAN, M.G.; THOUAS, G.A. Sex-related physiology of the preimplantation embryo. **Molecular Human Reproduction**, v.16, n. 8, p. 539-47, Aug, 2010.

GIBSON, G.T.; BAGHURST, P.A.; COLLEY, D.P. Maternal alcohol, tobacco and cannabis consumption and the outcome of pregnancy. **The Australian and New**

Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 23, n.1, p. 15-9, Feb, 1983.

HABAYEB, O.M.; TAYLOR, A.H.; EVANS, M.D.; COOKE, M.S.; TAYLOR, D.J.; BELL, S. C.; KONJE, J.C. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 89, n.11, p. 5482-7, Nov, 2004.

HARBISON, R.D.; MANTILLA-PLATA, B. Prenatal toxicity, maternal distribution and placental transfer of tetrahydrocannabinol. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.180, n.2, p. 446-453, Feb, 1972.

HAYATBAKSH, M.R.; FLENADY, V.J.; GIBBONS, K.S.; KINGSBURY, A.M.; HURRION, E.; MAMUN, A.A.; NAJMAN, J.M. Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy. **Pediatrics Research**, v.71, n 2, p. 215-9, Dec, 2012.

HO, B.T.; FRITCHIE, G.E.; KRALIK, P.M.; ENGLERT, L.F.; MCISAAC, W.M.; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J. Distribution of tritiated-1 delta- 9 tetrahydrocannabinol in rat tissues after inhalation. **Journal of Pharmacology and Pharmacol**, v.22, n. 7, p. 538-539, Jan, 1970.

HOFFMAN, A.F.; OZ, M.; YANG, R.; LICHTMAN, A.H.; LUPICA, C.R. Opposing actions of chronic delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabinoid antagonists on hippocampal long-term potentiation. **Learning and Memory**, v.14, n. 1-2, p. 63–74, Jan, 2007.

HUDAK, A.; UNGVÁRY, G. Embryotoxic effects of benzene and its methyl derivatives: toluene, xylene. **Toxicology**, v.11, n.1, p. 55-63, Sep, 1978.

HURD, Y.L.; ANDERSON, V.; BECK, O.; MINKOFF, H.; DOW-EDWARDS, D. Marijuana impairs growth in mid-gestation fetuses. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, n.2, p. 221-229, Mar, 2005.

HUTCHINGS, D.E.; MARTIN, B.R.; GAMAGARIS, Z.; MILLER, N.; FICO, T. Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. **Life Sciences**, v.44, n.11, p. 697–701, 1989.

HUTCHINGS, D.E.; MORGAN, B.; BRAKE, S.C.; SHI, T.; LASALLE, E. Delta-9-tetrahydrocannabinol during pregnancy in the rat: I. Differential effects on maternal

nutrition, embryotoxicity, and growth in the offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v.9, n.1, p. 39-43, Jan, 1987.

JAKUBOVIC, A.; HATTORI, T.; MCGEER, P. L. Radiactivity in suckled rats after giving ¹⁴C tetrahydrocannabinol to the mother. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, n.2, p. 221–223, May, 1973.

JONEJA, M.G. A study of teratological effects of intravenous, subcutaneous, and intragastric administration of delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 36, n.1, p. 151-162, Apr, 1976.

KHOSHO, F.K.; KAUFMANN, R.C.; AMANKWASH, K.S. A simple and efficient method for obtaining urine samples from rats. **Laboratory Animals Sciences**, v. 35, n. 5, p. 513-514, Oct, 1985.

KOBAYASHI, S.; ISOTANI, A.; MISE, N.; YAMAMOTO, M.; FUJIHARA, Y.; KASEDA, NAKANISHI, T.; IKAWA, M.; HAMADA, H.; ABE, K.; OKABE, M. Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. **Current Biology**, v. 16, n. 2, p. 166-72, Jan, 2006

KOSTELLOW, A.B.; BLOCH, E.; MORRILL, G.A.; FUJIMOTO, G.I. Effects of cannabinoids on estrus cycle, reproductive capacity, and fetal development in A/J mice. **Pharmacology**, v.21, n.1, p. 68-75, Oct, 1980.

LICHTMAN, A.H.; POKLIS, J.L.; POKLIS, A.; WILSON, D.M.; MARTIN, B.R. The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. **Drug and Alcohol Dependency**, v. 63, n. 2, p. 107-116, Jul, 2001.

LONGO, L.D. The biological effects of carbon monoxide on the pregnant woman, fetus, and newborn infant. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v.129, n.1, p. 69-103, Sep, 1997.

MACCARRONE, M.; BAB, I.; BIRO, T.; CABRAL G.A.; DEY, K. S.; DI MARZO, V.; KONJE, J.C.; KUNOS, G.; MECHOULAM, R.; PACHER, P.; SHARKEY, K.A.; ZIMMER, A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p.277-296, Mar, 2015.

MANTILLA-PLATA, B.; CLEWE, G.L.; HARBISON, R.D. Delta9-Tetrahydrocannabinol-induced changes in prenatal growth and development of mice. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 333-40, Aug, 1975.

MATO, S.; CHEVALEYRE, V.; ROBBE, D.; PAZOS, A.; CASTILLO, P.E.; MANZONI, O.J. A single in-vivo exposure to delta-9-THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 585–586, May, 2004.

MELFORD, S.E.; TAYLOR, A.H.; KONJE, J.C. Of mice and (wo) men: factors influencing successful implantation including endocannabinoids. **Humans and Reproduction Update**, v. 20, n. 3, p. 415-28, Dec, 2014.

MOIR, D.; RICKERT, W.S.; LEVASSEUR, G.; LAROSE, Y.; MAERTENS, R.; WHITE, P.; DESJARDINS, S. A comparison of mainstream and sidestream marijuana and tobacco cigarette smoke produced under two machine smoking conditions. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 494-502, Dec, 2008.

MOLINA- HOLGADO, F.; GONZALEZ, A.A.M.I.; ALVAREZ, F.J.; LERET, M.L. Effects of maternal delta-9- tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, p. 39-42, Nov, 1996.

MU, J.; ADAMSON, S.L. Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero and umbilicoplacental, and vitelline circulations in mouse throughout gestation. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, v. 291, n. 3, p. 1421-8, Apr, 2006.

MURTHY, N.V.; VASSELL, M.; MELVILLE, G.N.; WRAY, S.R.; RAM, N.V.; HARAN, N. V. Reproductive toxicity of marijuana smoke. A three-generation study in female Wistar rats. **West Indian Medical Journal**, v. 35, n. 2, p. 130-4, Jun, 1986.

PARIA, B.C.; DEY, S.K. Ligand- receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 108, p. 211-220, Nov, 2000.

PARK, B.; GIBBONS, H.M.; MITCHELL, M.D.; GLASS, M. Identification of the CB1 Cannabinoid receptor and fatty acid amine hydrolase (FAAH) in the human placenta. **Placenta**, v. 24, n. 5, p. 990-995, Nov, 2003.

PERSAUD, T.V.N; ELLINGTON, A.C. Cannabis in early pregnancy. **Lancet**, v. 2, p. 1306, Jun, 1967.

ROSENKRANTZ, H.; FLEISCHMAN, R.W.; BARKER, J.R. Embryotoxicity of

marihuana by inhalation. **Fundamental Applied Toxicology**, v.37, p. 737, Aug, 1978.

SANDI, C.; HALLER, J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. **Nature Reviews**, v. 16, p. 290, May, 2015.

SHERWOOD, R.A.; KEATING, J.; KAVVADIA, V.; GREENOUGH, A.; PETERS, T.J. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcomes. **European Journal Pediatrics**, v.158, n.6, p. 488-92, Jun, 1999.

SLADEK, S.M.; MAGNESS, R.R.; CONRAD, K.P. Nitric oxide and pregnancy. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 441-463, Feb, 1977.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA). **Behavioral health trends in the United States: results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health**. 2015. Disponível em: <<http://www.samhsa.gov/data/>> Acesso em: 10 de Jun. 2015.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA). **Results from the 2009 national survey on drug use and health: summary of national findings**. Rockville: Publication. 2010.

SUN, X; DEY, S.K. Endocannabinoid signaling in female reproduction. **Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 349-55, May, 2012.

TREZZA, V.; CAMPOLONGO, P.; CASSANO, T.; MACHEDA, T.; DIPASQUALE, P.; CARRATÙ, M.R.; GAETANI, S.; CUOMO, V. Effects of perinatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on the emotional reactivity of the offspring: a longitudinal behavioral study in Wistar rats. **Psychopharmacology**, v.198, n. 4, p. 529-37, Jun, 2008.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). World drug report 2015. 2015. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf> Acesso em: 10 de Jun. 2015.

VOLKOW, N.D.; BALER, R.D.; COMPTON, W.M.; WEISS, S.R.B. Adverse health effects of marijuana use. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n.23, p. 2219-2227, Jun, 2014.

WILSON, M.E.; FORD, S.P. Comparative aspects of placental

efficiency. **Reproduction Supplement**, v. 58, p. 223–332, 2001.

ZUCKERMAN, B.; FRANK, D.A.; HINGSON, R.; AMARO, H.; LEVENSON, S.M.; KAYNE, H.; PARKER, S.; VINCI, R.; ABOYAGE, K.; FRIED L.E.; CABRAL, H.; TIMPERI, R.; BAUCHNER, H. Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 2, p. 762-768, Mar, 1989.

3 ASSOCIAÇÃO DE PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS COM O USO RECREACIONAL DE MACONHA DURANTE A GESTAÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis* sativa é a droga ilícita mais consumida por gestantes no mundo. Os efeitos da exposição intrauterina sobre o feto não são bem esclarecidos e levantam vários questionamentos.

Estudos em humanos e modelos animais têm demonstrado que a exposição pré-natal a *Cannabis* é capaz de provocar o desenvolvimento anormal do cérebro durante a vida fetal e contribuir para a etiologia de uma série de desordens neurológicas que irão se manifestar mais cedo ou mais tarde ao longo da vida. A hipótese da programação fetal foi descrita por Barker et al. (1989) e sugere que um ambiente intrauterino durante um período crítico da organogênese e desenvolvimento tecidual podem alterar permanentemente a estrutura do órgão e sua função.

A *Cannabis* possui mais de 60 compostos canabinóides (CB), dentre os quais se destaca o Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), que é o principal componente psicoativo da droga. Sabe-se que o THC atinge o feto durante a gestação, pois cruza a barreira placentária (HUTCHINGS et al., 1989) ou pode ser também secretado pelo leite materno (JAKUBOVIC; HATTORI; MCGEER, 1977). As descrições do sistema endocanabinóide (SEC) e as localizações dos receptores de canabinóides tem facilitado a compreensão dos mecanismos celulares pelos quais os canabinóides exercem suas funções (DEVANE et al., 1988; MATSUDA et al., 1990).

O SEC é amplamente expresso no Sistema Nervoso Central (SNC) e o receptor canabinóide 1 (CB1r) é expresso em locais pré- sinápticos, onde sofre ativação de agonistas ou canabinóides exógenos, regulando tanto a neurotransmissão inibitória quanto excitatória (PUIGHERMANAL et al., 2009), contrastando com o receptor de canabinóide 2 (CB2), característico de órgãos e células imunes, incluindo a micróglia (MARTIN- MORENO et al., 2012).

Os ligantes endógenos para os receptores de canabinóides principais são a anandamida e o 2- aracdonoilglicerol (2- AG). Eles são sintetizados sob demanda e

liberados pelos neurônios pós- sinápticos (TREZZA et al., 2012). Após serem liberados na fenda sináptica, os novos endocanabinóides retornam e se ligam aos receptores canabinóides nos terminais pré- sinápticos. Essa ligação regula a ativação dos canais de cálcio e a liberação de neurotransmissores.

Atualmente, os endocanabinóides (ECBs) são conhecidos por estarem presentes nos estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro, estando envolvidos com efeitos celulares sobre a plasticidade sináptica, proliferação e migração neuronal (WISON AND NICOLL, 2002; GAFFURI; HARKANY et al., 2007; LADARRE; LENKEI, 2012).

O SEC é altamente representado em diversas regiões do cérebro envolvidas no processamento de informações emocionais e comportamento, bem como aprendizagem e memória, tais como hipocampo, córtex, amígdala e gânglios basais (TERZIAN et al., 2011). Os canabinóides ligantes ao CB1 são reportados por impactar uma variedade de comportamentos associados com prejuízos na atenção, cognição e ansiedade em humanos (PATTIJ, WISKERKE; SCHOFFELMEER, 2008; CREAN, CRANE; MASON, 2011; CATHEL et al., 2014).

Além disso, estudos experimentais indicam que a exposição a canabinóides durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral, tanto no período pré-natal quanto pós-natal (durante a maturação cerebral) podem afetar o desenvolvimento de diferentes sistemas de neurotransmissores catecolaminérgicos (GARCIA-GIL et al., 1997), serotoninérgicos (MOLINA-HOLGADO et al., 1996), GABAérgico (GARCIA-GIL et al., 1999), e glutamatérgico (SUAREZ et al., 2004).

Estudos têm avaliado os desfechos comportamentais sobre o SNC relacionado à exposição gestacional a *Cannabis* em humanos e animais. Mereu et al. (2003) e Navarro, Rubio e Rodrigues de Fonseca (1995) mostraram, utilizando ratos como modelo, que há um aumento na atividade locomotora na infância e adolescência após a exposição gestacional e durante a lactação, que desaparecem na vida adulta.

Estudos clínicos mostram que o uso da *Cannabis* durante a gestação induz efeitos deletérios sobre a atenção e memória dos filhos, tanto na infância quanto na adolescência (DAY et al., 1994; FRIED; WATKINSON, 2000; FRIED; SMITH, 2001; FRIED, 2002). Em humanos, estudos clínicos indicam que a exposição prenatal a *Cannabis* durante o 1º e 3º trimestre da gestação provoca sintomas de ansiedade e

depressão em crianças (10 anos de idade) frutos desta gestação (GOLDSCHMIDT et al., 2004; GRAY et al., 2005).

Estudos em humanos que investiguem os efeitos da exposição a maconha *in utero* no comportamento a longo prazo nos filhos são difíceis de serem conduzidos devido aos fatores de confundimento e por proverem limitadas informações a respeito das consequências celulares e moléculas específicas (TREZZA et al., 2012). Neste cenário, modelos animais podem ser uma ferramenta útil para examinar o potencial desses efeitos (TREZZA et al., 2008).

Embora a forma mais comum de uso da maconha seja a fumada (inalação), a grande parte dos estudos que utilizam animais usam injeções de THC ou gavagem para investigar os efeitos da maconha. Entretanto, é importante ressaltar que os efeitos da administração de compostos canabinóides isolados (THC, canabidiol, canabinol, etc) não são equivalentes aos observados com os preparados da droga (haxixe, extratos de maconha) (NAVARRO; RUBIO; RODRIGUES DE FONSECA, 1995). A presença de diversos compostos químicos podem mediar alguns efeitos observados na prole (MECHOULAM, 1970).

Assim, neste estudo foi investigado como a exposição (via inalação) pré-natal a uma baixa dose de maconha influencia o desenvolvimento pós natal em camundongos, utilizando testes comportamentais.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Este estudo tem a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 5910070714). Os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes Nacionais e Institucionais para Experimentação Animal. Todos os animais foram tratados com respeito, com a devida consideração para o alívio do sofrimento e desconforto. Dois grupos de camundongos Balb/C (estirpe consanguínea) foram

utilizados neste estudo provenientes das nossas instalações de animais da universidade: 20 fêmeas com idades aproximadas de 60 dias e 3 machos com idades de 80 dias, com fertilidade comprovada. Os animais foram mantidos em um ventilado sistema de 14 caixas com comida e água disponíveis. Temperatura (21 ± 2 °C) e luz (12/12-h ciclo luz/ escuro) foram controlados.

3.2.2 Droga

Um lote lacrado contendo 1 kg de maconha (contendo 0,3% de Δ^9 - THC) foi obtido para fins científicos por meio de doação do Núcleo de Perícias Médicas Legais- Instituto de Criminalística de Marília, legalmente autorizado pela 3° Vara Criminal da Comarca de Marília, São Paulo, Brasil. A droga é resultado de uma operação de apreensão realizada pela polícia local. Os cigarros de maconha foram preparados em no próprio laboratório preenchendo manualmente as embalagens de cigarro disponíveis comercialmente. Todos os cigarros continham aproximadamente 200 mg de *Cannabis sativa*.

3.2.3 Sistema de Exposição

A inalação das fêmeas gestantes à fumaça da queima de maconha foi realizada de acordo com o sistema descrito por Benevenuto et al. (2016). Os cigarros da droga continham material suficiente para a queima de 5 minutos de exposição. O grupo controle foi exposto ao ar filtrado em um sistema idêntico.

3.2.4 Protocolo de Exposição

Dez fêmeas foram randomicamente distribuídas em grupo *Cannabis* e grupo controle (n= 5 fêmeas por grupo). Antes do início das exposições, as fêmeas foram treinadas durante sete dias para a familiarização do sistema e do pesquisador. Após este período as fêmeas foram colocadas para acasalar (2:1) com machos de fertilidade comprovada e o primeiro dia gestacional (DG) foi considerado a partir da

visualização do *plug* vaginal ou presença de espermatozóides em lavado vaginal, sendo marcado como o 0.5 DG. Cada fêmea grávida foi colocada em uma caixa separada e pesada diariamente durante o período de exposição.

As gestantes foram expostas diariamente por 5 minutos à fumaça de *Cannabis* ou ao ar filtrado a partir do 5,5° DG até o 17,5° DG. O marcador da exposição foi realizada por meio da detecção dos metabólitos do Δ^9 – THC (THC-COOH) em amostras de urina, como descrito por Benevenuto et al. (2016).

3.2.5 Avaliação da Prole

Após o nascimento das proles, os filhotes foram pesados duas vezes por semana a partir do 1° DPN até o 60° DPN. Observações a respeito de malformação ao nascer e durante o desenvolvimento da prole foram realizadas. Ao atingirem o 2° DPN 4 animais de cada prole (n total = 20 filhotes por grupo) selecionados aleatoriamente e proporcionalmente (machos e fêmeas) foram submetidos aos testes comportamentais para neonatos.

Ao atingirem a idade para o desmame (21 dias) os filhotes foram separados de suas mães e grupos de machos e fêmeas foram formados. Ao atingirem o 30° dia de vida foram iniciados os testes comportamentais dos jovens. A partir dos 60 dias de vida, os animais adultos foram reavaliados. Os testes ocorreram entre 9h e 17h e foram filmados para possibilitar as análises posteriores.

3.2.6 Testes de Comportamento em neonatos

3.2.6.1 Teste de Suspensão Traseira do Membro

Conforme o protocolo de El Khodor et al. (2008), o neonato será avaliado quanto à força muscular, fadiga e fraqueza. Para tanto serão colocados suspensos pelos membros pélvicos em um tubo de ensaio de 50 ml e o tempo de sustentação,

a tração e a suspensão do membro posterior, será mensurado. Foi utilizada uma almofada de aquecimento com temperatura em torno de 37° para a manutenção da temperatura dos neonatos. Os testes ocorreram no 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia de vida pós-natal.

3.2.6.2 Teste do Endireitamento sobre uma Superfície

Foram avaliados o reflexo e o desenvolvimento das funções motoras. Para tanto os camundongos foram colocados manualmente com o dorso apoiado sobre uma superfície (decúbito dorsal). O tempo que o animal levou para voltar à posição normal (decúbito ventral), em até 2 minutos, foi medido, quando finalmente os membros posteriores viram e, com os quatro membros no chão, fornecem o apoio coordenado. Os testes ocorreram durante os dias 4, 5 e 6 dias pós-natal, seguindo o protocolo de Colomina et al. (2005). A escala foi utilizada de acordo com a classificação proposta por Ronca e Alberts (2000) para quantificar o sucesso do endireitamento.

3.2.6.3 Teste de Reação de Geotaxia Negativa

Foram avaliados os reflexos e a coordenação motora do animal. Assim, o camundongo foi colocado com os quatro membros sobre um plano inclinado (30°) com a face apontada para baixo, em direção ao solo. O reflexo é considerado formado se o animal virar seu corpo 180°, se reorientando em até 1 minuto. O teste foi aplicado entre os dias 7 - 11 após o nascimento. O protocolo seguiu Crozier e Pincus (1926), com adaptações.

3.2.7 Testes Comportamentais em Jovens e Adultos

3.2.7.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Neste teste foi avaliado o natural conflito entre a tendência de camundongos explorarem um novo ambiente e a aversão a ambientes abertos, sendo empregado para avaliar a ansiedade do animal (CHENG et al., 2014). O protocolo seguido foi adaptado de Lister et al. (1987), no qual o labirinto consiste em uma cruz com dois braços abertos entreposto por um centro de onde cruzam os dois braços fechados cercados por paredes. Cada animal foi submetido a uma única sessão de 5 minutos. Os testes foram realizados no 33º e no 63º dia de vida. Ao término do teste foram contabilizados: número de entradas e tempo gasto nos braços abertos (atividade locomotora), tempo gasto no centro do aparato, número total de entradas nos braços abertos e fechados, número e tempo gasto de *head-dips* (orientar a cabeça sobre a borda do braço aberto) nos braços abertos, número e tempo de *rearing* (atividade exploratória de apoiar-se nos membros inferiores e erguer o tronco). O software PlusMZ foi utilizado para as análises.

3.2.7.2 Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos

Este teste objetiva descrever a memória de curto e longo prazo em camundongos, baseando-se na exploração diferencial de um objeto familiar e desconhecido de acordo com Ennaceur e Delacour (1988), uma vez que roedores tem preferência por objetos novos.

Após 15 minutos, os experimentos foram realizados na mesma caixa usada no teste campo aberto incluindo o uso de diferentes objetos. No treino, utilizamos dois objetos idênticos que foram aqui denominados por A1 e A2. Na sessão I, foram colocados dois objetos diferentes, permanecendo um objeto do treino (A). O segundo objeto para esta avaliação foi denominado B. E, por conseguinte, na sessão II, o objeto (A) permaneceu e um novo objeto-estímulo (C) substituiu o objeto (B).

Os animais foram submetidos ao teste no 31º, 32º, 60º e 61º dias pós- natais. Os seguintes parâmetros foram avaliados: (i) o tempo total gasto pelo animal ao

explorar os objetos nas sessões (treino, I e II); (ii) a exploração do objeto que foi definida da seguinte forma: dirigir o nariz a uma distância menor que 2 cm para o objeto e/ou tocá-lo com o nariz; (iii) o tempo gasto ao explorar o objeto B durante a sessão I e o objeto C na sessão II; (iv) Número de atividade exploratória. Os treinos e sessões tiveram duração de 5 minutos.

Todos os testes foram iniciados pelo menos estressante para o que exigia mais esforço do animal, com o intuito de reduzir a possibilidade de que a experiência anterior pudesse ter influência nos dados comportamentais.

Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo Statistical Package for Social Sciences® (SPSS) versão 17.0. Modelos lineares mistos foram utilizados para todas as medidas comportamentais dependentes, com fator fixo idade. As proles constituíram uma variável aleatória. A variância residual foi estimada separadamente, quando necessária. A presença de interação de três vias (Anova *Three-way*) foi testada para cada modelo. Os modelos residuais foram inspecionados para *outliers* e as variáveis foram transformadas para reduzir a inclinação, quando necessário. Quando interações significantes foram encontradas, o teste Anova *Two-way* foi utilizado. O valor de ($p \leq 0,05$) foi assumido para significância estatística.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Peso da prole

No total o peso de 58 animais (grupo controle= 25; grupo *Cannabis*= 33) foram acompanhados semanalmente a partir do 3DPN até o 60DPN. Utilizando o teste de *Mann-Whitney* foram encontradas diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$). O grupo controle apresentou um ganho de peso maior comparado ao grupo *Cannabis*. Quando avaliados apenas por gênero os machos apresentaram maior ganho em relação às fêmeas a partir da quarta semana de vida ($p < 0,05$) (dados não apresentados).

Figura 6 - Ganho de peso das proles do grupo controle e exposto ao longo da vida

3.3.2 Testes comportamentais

Um total de 35 animais foram utilizados para o teste de comportamento em neonatos e adultos (n = 16-18 /grupo).

3.3.2.1 Testes comportamentais em neonatos

Endireitamento sobre uma superfície

Os resultados deste estudo demonstram que as proles do grupo controle foram mais rápidas ao se virarem no primeiro dia de teste (4pn) mantendo um intervalo de endireitamento maior nos dias seguintes, porém, não alcançou significância estatística. Logo, as proles do grupo *Cannabis* apresentaram um endireitamento significativo ($p < 0.02$) mais lento no primeiro dia do teste comparado ao grupo controle (Figura 8). Não foram encontradas diferenças significativas nos

dias 5 e 6 pós- natal. Observou-se também que o grupo *Cannabis* teve uma frequência de insucesso significativamente maior ($p < 0.05$) ao tentar se virar no primeiro dia de teste (1T) (Figura 7). Este perfil, acompanhado de momentos de imobilidade e tentativas de se virar, também foram observados nos dias seguintes de testes, mas não foram significativos.

Figura 7 - Frequência de sucesso no endireitamento das proles controle e exposta no primeiro dia de teste (1T). O grupo exposto apresentou uma frequência de insucesso maior ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle

Figura 8 - Latência ao se virar (seg) das proles dos grupos controle e exposto. O grupo exposto apresentou maior lentidão ($p < 0.02$) no primeiro dia de teste comparado ao grupo controle (1T)

Geotaxia Negativa

Os resultados do teste de geotaxia negativa mostram que as proles cujas mães pertenciam ao grupo *Cannabis* gastaram menos tempo para conseguir se reorientar no plano inclinado, quando comparadas com o grupo controle (Figura 9). Apesar da maior rapidez de reorientação do grupo exposto os sucessos de reorientação foram menores (dados não apresentados).

Teste de suspensão traseira do membro inferior

Os resultados preliminares deste teste sugerem que tanto a idade do neonato quanto a exposição materna a *Cannabis* afetam negativamente os desfechos avaliados, porém não há uma interação entre as duas variáveis. O tempo de sustentação, o número de *pulls*, assim como os *scores* da suspensão traseira dos membros posteriores (HLS) apontam que neonatos de mães fumantes tem menos força muscular e apresentam fadiga muscular mais rapidamente quando comparados com o grupo não exposto (Figura 10 e Figura 11).

Figura 9 - Representação gráfica das médias $\pm$ DP do tempo (seg) gasto na reorientação das proles dos grupos controle e exposto. Nos dias 7, 9 e 10 pós-natal houve diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparadas ao grupo controle

Os scores que indicam menor força muscular foram mais frequentes no grupo exposto (dados não apresentados).

Figura 11 - Representação gráfica das médias $\pm$ DP do tempo (seg) de suspensão no teste 1 e 2 das proles dos grupos controle e exposto nos dias 2, 4, 6, 8, e 9 pós natal

Figura 10 - Representação gráfica médias $\pm$ DP do número de pulls no teste 1 e 2 das proles dos grupos controle e exposto nos dias 2, 4, 6, 8, e 9 pós natal

3.3.2.2 Testes comportamentais em Adultos

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Tempo gasto e número de entrada nos braços abertos

Houve uma interação significativa entre grupo e sexo ($p=0,036$) quando avaliado o tempo gasto nos braços abertos. Os animais do grupo *Cannabis* de 60DPN tiveram mais entradas ($p=0,042$) nos braços abertos quando comparados com os animais controle de 60DPN. Foi encontrada uma diferença significativa ($p=0,028$) entre machos e fêmeas de 60DPN. Os machos de 60DPN apresentaram mais entradas nos braços abertos que as fêmeas de 60DPN. Estes resultados estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos números de cada parâmetro avaliado (s) por sexo e grupo (controle e *Cannabis*), em cada idade (30DPN e 60 DPN). Os seguintes parâmetros estão representados: número de entradas nos braços abertos, número de vezes que o animal foi até o centro do aparato, número de entradas nos braços fechados no teste de LCE

Tempo gasto e número de vezes no centro do aparato

A diferença entre sexos no tempo gasto no centro do aparato foi significativa para ambas as idades ($p_{30_DPN}=0,044$; $p_{60_DPN}=0,001$). Nas duas idades (30 e 60 DPN) os machos gastaram mais tempo no centro do aparato do que as fêmeas (Figura 13). Em relação ao número de vezes no centro do aparato, a média dos animais com 60DPN foi maior do que a média dos animais com 30DPN ($p=0,02$) (Figura 12). Além disso, a média geral dos machos foi maior ($p=0,0001$) do que a média geral das fêmeas. Houve também uma interação entre essas duas variáveis ($p=0,033$). Por meio da análise Anova *Two-way* foi encontrada diferença significativa entre os sexos apenas na idade de 60DPN ($p=0,001$). O número de vezes que os machos de 60DPN estiveram no centro foi maior do que as fêmeas de 60DPN (Figura 12).

Figura 13 - Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos tempos de cada parâmetro avaliado (s) por sexo e grupo (controle e *Cannabis*), em cada idade (30DPN e 60 DPN). Os seguintes parâmetros estão representados: latência ao sair do centro do aparato, tempo gasto nos braços abertos, tempo gasto nos braços fechados e tempo de permanência no centro do aparato no teste de LCE

Tempo gasto e número de entradas nos braços fechados

A diferença entre grupos no tempo de permanência nos braços fechados foi significativa para animais com idade de 60DPN ($p=0,033$). O grupo controle permaneceu mais tempo nos braços fechados que o grupo exposto à *Cannabis*. Houve também diferença significativa entre sexos para animais de 30 DPN ($p=0,032$) e 60DPN ($p=0,001$). Em ambas as idades as fêmeas gastaram mais tempo do que os machos nos braços fechados (Figura 13). Estes resultados estão apresentados na Figura 12. Por fim, observou-se também uma interação significativa ($p=0,017$) entre o grupo*sexo para animais de idade de 60 DPN. Já em relação ao número de entradas nos braços fechados, quando este parâmetro foi avaliado pelo Anova Three-way para medidas repetidas apresentou diferença entre idades ($p=0,0001$) e entre sexos ($p=0,001$). Os animais com 60DPN apresentaram uma média maior do que os com 30 DPN. Os machos apresentaram mais entradas nos braços fechados ($p=0,002$) do que as fêmeas em ambas as idades (Figura 12).

Latência para sair do centro do aparato

O teste Anova Three-way para medidas repetidas apresentou uma interação significativa entre grupo*sexo para este parâmetro ($p=0,02$). Já no teste Anova Two-

way foi encontrado interação significativa entre grupo*sexo apenas para os animais com 30DPN.

Tempo e número de rearing

O tempo de *rearing* apresentou diferença significativa entre as idades ($p=0,002$) e entre sexos ($p=0,027$) (dados não apresentados). Além disso, foi encontrada uma interação significativa entre tais variáveis idade*sexo ($p=0,039$). Quando avaliado com mais precisão foi encontrada diferença significativa apenas entre sexos para animais com 60DPN ($p=0,022$). Os machos apresentaram mais números de *rearing* comparado às fêmeas (dados não apresentados).

Tempo e número de head-dipps

A análise estatística revelou uma diferença significativa entre as idades ($p=0,008$) e uma interação significativa entre grupo*sexo ($p=0,042$). Quando avaliado separadamente por idades, foi encontrada uma interação significativa apenas para a idade de 30DPN ($p=0,042$).

Tempo e número de grooming

Não foram constatadas diferenças significativas nesses parâmetros (dados não apresentados).

Reconhecimento de Objetos

A análise de testes multivariada apontou diferenças significativas quando avaliados os parâmetros apenas por sexo ($p=0,022$) e apenas por grupo ($p=0,030$).

Tempo de exploração do objeto A nas sessões 1 e 2

Os animais expostos com 30 DPN ($p=0,042$) permaneceram mais tempo explorando o objeto A nessa sessão do que os animais controle nessa mesma idade (Figura 14). Diferença significativa ($p=0,011$) na exploração do objeto A na sessão 2 foi encontrada entre os sexos. Os machos com 30 DPN exploraram mais o objeto A do que as fêmeas com 30 DPN. Estes resultados estão apresentados na Figura 14.

Tempo de exploração do objeto B na sessão 1

Foi encontrada diferença significativa ($p= 0,039$) no tempo de exploração do objeto B na sessão 1 entre sexos. Os machos com 30 DPN gastaram mais tempo do que as fêmeas com 30 DPN (Figura 14).

Tempo de exploração do objeto C na sessão 2

Os animais controles com 60 DPN gastaram mais tempo ($p= 0,017$) do que os expostos na mesma idade na sessão 2. Quando avaliados por sexo houve diferença significativa para este mesmo parâmetro entre machos e fêmeas com 60 DPN. Os machos exploraram o objeto por mais tempo comparado com as fêmeas. Estes resultados estão apresentados na Figura 14.

Número de comportamento exploratório nas sessões treino, 1 e 2

Houve diferença significativa quando os animais foram avaliados por sexo na sessão 1 nas idades de 30 DPN e 60 DPN. Os machos apresentaram mais comportamentos exploratórios do que as fêmeas nas duas idades ($p_{30_DPN}= 0,048$; $p_{60_DPN}= 0,025$) (Figura 15). Na sessão 2 os machos com 30 DPN também apresentaram maior número de comportamentos exploratórios ($p= 0,049$) do que as fêmeas na mesma idade (Figura 16). Na sessão treino não foram encontradas diferenças significativas (dados não apresentados).

Figura 14 - Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos tempos (s) em cada objeto nas sessões 1 e 2 por sexo e por grupo (controle e *Cannabis*), em cada idade (30DPN e 60 DPN). Os seguintes parâmetros estão representados: tempo de exploração no objeto A na sessão 1 e 2, tempo de exploração do objeto B na sessão 1 (30 DPN) e tempo de exploração do objeto C na sessão 2 (30 DPN) no teste LCE

Figura 15 - Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos números de comportamentos exploratórios (s) na sessão 1, por sexo e grupo (controle e *Cannabis*), em cada idade (30DPN e 60 DPN)

Figura 16 - Representações gráficas das médias $\pm$ DP dos números de comportamentos exploratórios (s) na sessão treino 1, por sexo e grupo (controle e *Cannabis*), na idade de 30DPN e 60 DPN.

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a inalação materna da fumaça da maconha pode contribuir com diferentes respostas comportamentais na prole de camundongos e que podem se estender à vida adulta. Uma baixa dose da droga em condições reais de uso (inalação) durante a gestação resultou em alterações motoras em neonatos do grupo exposto. Na fase adulta foram reconhecidas alterações na memória e efeitos sobre a ansiedade nestes animais.

Modelos animais constituem uma ferramenta valiosa para a investigação de períodos críticos do desenvolvimento do cérebro humano (MARCO; MACRI; LAVIOLA, 2011). Neste contexto, testes comportamentais com animais podem complementar os estudos em humanos, uma vez que já foram encontrados paralelos nas janelas de suscetibilidade a estresse ambiental ou materno.

O SEC é responsável por eventos específicos nos estágios iniciais do desenvolvimento (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2000). Em roedores e humanos, os níveis de receptores CB1 em idades fetais são substancialmente mais elevados do que os observados no cérebro adulto (BERRENDERO et al., 1999; MATO; OLMO; PAZZOS, 2003). A sinalização dos endocanabinóides através do receptor CB1 no cérebro implica na proliferação neuronal, migração, morfogênese e sinaptogênese (BERGHUIS et al., 2005, 2007; MULDER et al., 2008). Os endocanabinóides também exercem um papel crucial no controle da modulação dos estados emocionais (WITKIN; TZAVARA; NOMIKOS, 2005) e seus receptores estão expressos em regiões do cérebro envolvidas na modulação da cognição, locomoção, atenção e ansiedade (WITKIN; TZAVARA; NOMIKOS, 2005; DI MARZO, 2008), além de agirem pré-sinápticamente modulando a liberação de vários neurotransmissores e neuropeptídeos que desempenham um papel chave no processos neurobiológicos (GAFFURI; LADERRE; LENKEI, 2012).

Neste estudo os neonatos foram submetidos a uma bateria de testes para o reconhecimento de distúrbios no desenvolvimento motor, sendo suscetíveis aos efeitos da exposição materna. Os núcleos da base, núcleo vestibular e o cerebelo têm sido reconhecidos como prováveis sítios de ação para os déficits motores, como reflexos de endireitamento, induzidos por canabinóides (PELLIS, 1996; PATEL; HILLARD, 2001; SMITH et al., 2006).

Embora nossos resultados tenham apresentado prejuízos motores nas proles que tiveram a mãe exposta a *Cannabis*, dados consistentes em outros estudos encontraram um efeito diferente. No estudo conduzido por Hutchings, et al (1991), ratas foram oralmente administradas com doses de THC durante a gestação e não foram observadas alterações na resposta auditiva na descendência na idade adulta. Borbalato et al. (2006), mostraram que a exposição pré-natal a canabinóides não alterou a reação de gatilhos sensoriais, como sobressalto, na prole avaliada quando adultos. Por outro lado, Borgen e Davis (1973) encontraram atrasos no desenvolvimento do reflexo na prole de ratas que foram injetadas subcutaneamente com 10 mg/kg de THC no 10º e 12º dia de gestação. Os resultados dos estudos apresentados, no entanto, não utilizam a mesma dose e meio de exposição que o nosso.

A reorientação do animal nos teste de Geotaxia negativa e endireitamento sobre uma superfície é um mecanismo de correção da postura. Quando colocado

em uma posição adversa ou diferente da quadrúpede, são feitos movimentos para que o animal se ajuste para recuperar a posição normal. A imobilidade e as respostas a estes testes podem ser entendidos como um comportamento aliado a reflexos complexos (IAN; HAUN; KOLB, 1999), mediados por respostas táteis, proprioceptivas, vestibulares e reflexos visuais.

O receptor CB1 é expresso particularmente por neurônios GABAérgicos, no corpo estriado do núcleos da base. Estes neurônios desempenham um papel fundamental no controle dos movimentos do corpo e membros, sendo também diretamente responsáveis pela regulação no tônus muscular (WATANABE et al., 2002; IVERSEN, 2003). Os canabinóides podem, portanto, inibir a liberação de GABA no corpo estriado e liberação de GABA e glutamato nos outros núcleos da base, resultando na inibição do movimento (IVERSEN, 2003). Embora o complexo do núcleo vestibular apresente baixa densidade de receptores canabinóides eles podem potencialmente contribuir com alguns dos efeitos comportamentais da *Cannabis* sobre o equilíbrio e postura (MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993). Apesar do número de receptores serem baixo na região do tronco cerebral, é importante reconhecer que tais receptores podem ter mais afinidade de ligação e eficiência.

Um estudo conduzido por Breivogel, Sim e Childers (1997) indicou que os CB1r no tronco cerebral podem ser acoplados à proteína G com mais eficiência, produzindo mais efeitos intracelulares, em comparação com o cerebelo e hipocampo. No cerebelo, os canabinóides produzem déficits cerebelares por um mecanismo de inativação normal das células de Purkinje, via inibição da liberação de GABA nas sinapses célula- célula de Purkinje, e subsequente inibição do núcleo cerebelar profundo, e, portanto, a interrupção da postura normal e movimento (TAKASHAHI; LINDEN, 2000; PATEL; HILLARD, 2001). Embora os efeitos principais de postura e equilíbrio sejam mediados no cerebelo, os efeitos dos CB sobre a função motora ainda é incerto.

Em relação aos testes realizados com animais jovens e adultos, o LCE tem sido amplamente utilizado para investigar compostos ansiolíticos e ansiogênicos, e para esclarecer a neurobiologia da ansiedade (PELLOW et al., 1985). Normalmente um camundongo ou rato explora tanto os braços fechados quanto abertos do aparato. Entretanto, as medidas dos braços abertos e fechados (tempo de

exploração e entradas) são tomadas como indicadores de ansiedade. Mais tempo de exploração dos braços fechados implica em maior ansiedade (PELLOW et al., 1985).

Nossos resultados no testes LCE indicam que há um efeito ansiolítico no grupo *Cannabis*, uma vez que este grupo com 60 DPN explorou mais vezes os braços abertos em relação ao grupo controle com a mesma idade, não apresentando diferenças na idade de 30 DPN. Essa hipótese se confirma com o aumento significativo do tempo de exploração do grupo controle nos braços fechados em relação ao grupo *Cannabis*. Além disso, observamos também que os camundongos mais velhos foram mais vulneráveis a mudanças comportamentais. Ou seja, os efeitos são observados principalmente em animais com 60 DPN.

O SEC tem sido extensivamente estudado no contexto da ansiedade (RUBINO; ZAMBERLETTI; PAROLARO, 2015), pois desempenha um papel importante na modulação de respostas de ansiedade, particularmente sob contexto de ambientes aversivos em regiões como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. Estudos epidemiológicos mostraram efeitos ansiogênicos em crianças cujas mães foram usuárias de maconha durante a gestação (GOLDSCHMIDT et al., 2004; GRAY et al., 2005). Por outro lado, estudos experimentais em animais apresentam divergências nos resultados, sendo o efeito dose-dependente. Em geral, doses baixas de agonistas CB1 estão associadas a um efeito ansiolítico e doses elevadas estão relacionadas a ausência ou efeitos ansiogênicos (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005; RUBINO; ZAMBERLETTI; PAROLARO, 2015).

Como os canabinóides modulam a liberação de vários neurotransmissores que implicam no controle da emotividade, como a serotonina e dopamina (KATONA et al., 2001; HERMANN; MARSICANO; LUTZ, 2002) é razoável supor que a exposição materna a *Cannabis* pode induzir a mudanças de longo prazo na reatividade emocional da prole, uma vez que essa modulação pode influenciar em alterações de outros neurotransmissores envolvidos na emotividade.

Estudos genéticos revelaram que a localização dos receptores CB1 em subtipos neuronais específicos é um dos fatores mais importantes no efeito duplo do SEC na ansiedade. Camundongos mutantes demonstraram que CB1r localizados em neurônios glutamatérgicos são críticos para os efeitos ansiolíticos de baixas doses de agonistas exógenos do CB1r, enquanto CB1r expresso em neurônios GABAérgicos são necessários para os efeitos ansiogênicos induzidos por doses altas de agonistas desse receptor (REY et al., 2012).

Em humanos, estudos clínicos (GOLDSCHMIDT et al., 2004; GRAY et al., 2005) apresentaram sintomas de ansiedade em crianças que foram expostas no período pré-natal a *Cannabis*, mas o efeito desta droga na vida adulta ainda não está bem esclarecido (CAMPOLONGO et al., 2011).

Ao contrário dos nossos resultados, no estudo de Trezza et al. (2008), ratas gestantes receberam oralmente uma dose diária de THC (2.5–5mg kg) do 15º DG até o 9º dia pós natal e suas proles foram avaliadas no LCE quando adultas (80 DPN). Os autores encontram um aumento da ansiedade nos ratos expostos ao THC na gestação em relação ao controle. Esse resultado foi demonstrado no aumento do tempo nos braços fechados, menor número de *head-dipping* e maior número de *rearing*.

O teste de RO é muito utilizado para demonstrar a habilidade de um animal distinguir entre um objeto familiar e um desconhecido (novo), já que roedores tem preferência pela novidade, enquanto uma tendência reduzida pelo objeto novo mais que o familiar é um indicativo de uma disfunção no trabalho de memória (O'SHEA; MCGREGOR; MALLET, 2006). A memória é base inicial de todo o comportamento que vem a ser executado, no qual esta controla o comportamento futuro pela experiência (KLINKE e SILBERNAGL, 2006). É a aquisição e conservação de informações, também chamada de aprendizagem, uma consequência do que foi aprendido (IZQUIERDO, 2002; ZARDO, 2006).

Os resultados do teste RO mostraram que o reconhecimento de objetos foi prejudicado pela exposição materna a maconha. O grupo controle com 60 DPN gastou mais tempo explorando o objeto C na sessão 2 em relação ao grupo *Cannabis*, indicando um déficit na memória de longa duração nos animais deste grupo. Na sessão 1, realizada 90 minutos após o treino não foram encontradas diferenças entre os grupos, indicando que a exposição não teve influência na memória de curta duração, apesar do grupo exposto com 30 DPN ter explorado mais o objeto A na sessão treino comparado ao controle da mesma idade.

No hipocampo a ativação de CB1r prejudica a formação e consolidação da memória. Estes receptores estão localizados principalmente em terminais GABAérgicos em células que liberam GABA, sugerindo que uma das principais funções dos endocanabinóides no hipocampo é regular a liberação de GABA (WILSON; NICOLL, 2002). Apesar dos CB1r estarem localizados em menor quantidade em terminais glutamatérgicos, onde desempenham um papel crítico na

neuroproteção através da modulação da liberação de glutamato (PUIGHERMANAL, 2009), prejuízos no teste de reconhecimento de objetos estão associados também a desregulações no sistema glutamatérgico (NILSSON et al., 2007).

Dentre os diferentes mecanismos envolvidos nos efeitos dos canabinóides no desenvolvimento, destaca-se as alterações mediadas nos sistemas monoaminérgicos (LAUDER; KREBS, 1984; MIRMIRAN; SWAAB, 1987; FERNANDEZ-RUIZ et al., 1992). Os neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos estão entre os primeiros a surgir e desempenham um papel importante na diferenciação e maturação das suas áreas-alvo, tais como gânglios e camadas corticais basais e hipocampo (LAUDER; KREBS 1984; BERGER et al., 1985; MIRMIRAN; SWAAB, 1987).

A exposição pré- natal a doses moderadas de um agonista do CB1r, o WIN55212-2, induziu prejuízos na memória na prole de ratos (40 DPN e 80 DPN) na tarefa de esquiiva inibitória (MEREU et al., 2003). Neste estudo, o comprometimento da memória foi associado a diminuição e liberação de glutamato no hipocampo. Outro trabalho conduzido por Amal et al. (2010) foi capaz de apresentar um baixo desempenho do grupo exposto em relação ao grupo controle no teste de reconhecimento de objeto. Ratos (8-12 semanas de vida), foram injetados (i.p) com uma única dose ultra- baixa (0.002 mg/kg) de THC e avaliados quanto à memória após 3-7 semanas da injeção. Os animais foram avaliados durante 5 minutos, 24 horas após a sessão treino. Este efeito foi persistente pelos cinco meses seguintes.

Finalmente, efeitos específicos no sexo e idade foram observados tanto no LCE quanto no RO. No LCE, os machos com 60 DPN apresentaram mais entradas nos braços abertos que fêmeas com 60 DPN. Por outro lado, fêmeas exploraram por mais tempo os braços fechados nas duas idades avaliadas, apresentando-se mais ansiosas do que os machos. Em outros parâmetros os machos novamente apresentaram-se menos ansiosos do que as fêmeas. Foi observado um aumento no tempo de exploração (30 DPN e 60 DPN) e entradas (30 DPN) no centro do aparato em relação às fêmeas.

Quando avaliados apenas por sexo efeitos maiores foram observados nos animais adultos com 60 DPN. Nesta idade, os animais apresentaram-se mais ansiosos (mais entradas nos braços fechados) e com um nível maior de comportamento excitatório, avaliado pelo aumento do tempo de *rearing* (IZQUIERDO, 1989) em relação aos animais de 30 DPN.

No RO, os machos com 30 DPN exploraram mais o objeto A na sessão treino, o objeto B na sessão 1 e o objeto C na sessão 2, a partir desses resultados podemos inferir que as fêmeas foram mais prejudicadas em relação ao trabalho de memória de curta e longa duração comparadas aos machos. Além disso, os machos também apresentaram maior média de comportamentos exploratórios nas duas idades avaliadas em relação às fêmeas.

Interações entre grupo*sexo pelo Three-way Anova também foram identificadas no tempo de exploração dos braços abertos, tempo de exploração nos braços fechados, latência para sair do centro do aparato e número de *head-dipping*. Atualmente, o estresse pré-natal e a exposição a canabinóides têm sido associado a efeitos sexo-específico em animais (RUBINO; PAROLARO, 2011; WILEY; BURSTON, 2014; RUBINO; PAROLARO, 2015).

Os canabinóides modulam a atividade do eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal) (COTA, 2008; HILL; MCEWEN, 2010), através da neuromodulação dos sistemas de neurotransmissores. Evidências experimentais sugerem que o eixo HPA e os endocanabinóides podem estar diretamente envolvidos na regulamentação do desenvolvimento da reatividade emocional a longo prazo e que pode comandar tanto adaptações fisiológicas quanto patológicas (MACRI et al., 2012; MACRI; LAVIOLA, 2004).

Quando uma resposta ao estresse é acionado há um aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticóides, o que resulta na ativação do eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal), (SANDI, 2015). A natureza lipofílica dos glicocorticóides permite o seu acesso ao cérebro, onde exercem alterações moleculares e estruturais (DE KLOET; KARSTS; JOELS, 2008). Dados apontam que a exposição materna a baixas doses de canabinóides induzem a alterações duradouras na função do eixo HPA que, por sua vez, pode resultar em uma diminuição na resposta comportamental e neuroendócrina na prole adulta (DEL ARCO et al., 2000).

Sendo assim, alguns efeitos do desenvolvimento neurológico observados em machos e fêmeas podem ter sido induzido por exposição à *Cannabis* na gestação, já que este evento pode alterar o papel epigenético de hormônios (CAMPOLONGO et al., 2011). Dados de estudos com animais apoiam esta hipótese. Tem sido relatado que ratas adultas expostas a THC durante a gravidez e lactação exibiram níveis mais elevados de corticotrofina no hipotálamo e corticosterona no plasma, enquanto os machos expostos ao THC apresentaram níveis mais baixos de ambos os

parâmetros endócrinos (NAVARRO; RUBIO; RODRIGUES DE FONSECA, 1995; RUBIO et al., 1995).

REFERÊNCIAS

AMAL, H.; ROZEVICH, L.F.; SENN, R.; STRELNIKOV, A.; MIKHAL GAFNI, ORA KEREN.; SARNE, Y. Long-term consequences of a single treatment of mice with an ultra-low dose of 9-tetrahydrocannabinol (THC) . **Behavioural Brain Research**, v. 206, p. 245–253, Sep, 2010.

BARKER, D. J. P.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M. E. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **British Medical Journal**, v. 298, p.564-567, Mar, 1989.

BENEVENUTO, S.G.; DOMENICO, M.D.; MARTINS, M.A.; COSTA, N.S.; DE SOUZA, A.R.; COSTA, .JL.; TAVARES, M.F.; DOLHNIKOFF, M.; VERAS, M.M. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: An experimental study in mice. **Toxicology** (In Press), May, 2016.

BERGER, B.; VERNEY, C.; FEBVRET, A.; VIGNY, A.; KAREN, B. HELLE. Postnatal ontogenesis of the dopaminergic innervation in the rat anterior cingulate cortex (Area 24). Immunocytochemical and catecholamine fluorescence histochemical analysis. **Developmental Brain Research**, v. 21, n.1, p.31–47, Jul, 1985.

BERGHUIS, P.; DOBSZAY, M.B.; WANG, X.; SPANO, S.; LEDDA, F.; SOUSA, K.M. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 102, p.19115–19120, Dec, 2005.

BERGHUIS, P.; RAJNICEK, .A.M.; MOROZOV, Y.M.; ROSS, R.A.; MULDER, J.; URBAN, G.M. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. **Science**, v. 316, p.1212–1216, May, 2007.

BERRENDERO, F.; SEPE, N.; RAMOS, J.A.; DI MARZO, V.; FERNANDEZ-RUIZ, J.J. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. **Synapse**, v. 33, p. 181–191, Sep, 1999.

BORGEN, L.A; DAVIS, W.M. Vehicle and route of administration as parameters affecting operant behavior effects of 9-Tetrahydrocannabinol. **Journal of Phamaceutical Sciences**, v. 62, p. 479-480, Sep, 1973.

BORTOLATO, M.; FRAU, R.; ORRU, M.; CASTI, A.; ARU, G.N.; FA, M.; MANUNTA, M.; USAI, A.; MEREU, G.; GESSA, G.L. Prenatal exposure to a cannabinoid receptor agonist does not affect sensorimotor gating in rats. **European Journal Pharmacology**, v.531, p.166–170, Feb, 2006.

BREIVOGEL, C.S.; SIM, L.J.; CHILDERS, S.R. Regional differences in cannabinoid receptor/G-protein coupling in rat brain. **Journal of Pharmacology Experimental Therapies**, v.282, n.3, p.1632-42, Sep, 1997.

CATHEL, A.M.; REYES, B.A.S.; WANG, Q.; PALMA, J.; MACKIE, K., ELISABETH BOCKSTAELE, J.V.; KIRBY, L.G. Cannabinoid modulation of alpha2 adrenergic receptor function in rodent medial prefrontal cortex. **European Journal Neuroscience**, v.40, n.8, p. 3202–3214, Oct, 2014.

CHENG, D.; LOW, K.J.; LOGGE, W.; GARNER, B.; KARL, T. Chronic cannabidiol treatment improves social and object recognition in double transgenic APPswe/PS1ΔE9 mice. **Psychopharmacology**, v.231, p. 3009–3017, Mar, 2014.

COLOMINA, M.T.; ROIG, J.L.; TORRENTE, M.; VICENS, P.; DOMINGO, J.L. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: Effects postnatal development and behavior of the offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 565- 574, Jul, 2005.

COTA, D. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n.1, p.35–38, Nov, 2008.

CREAN, R.D.; CRANE, N.A.; MASON, B.J. An evidence based review of acute and long-term effects of cannabis use on executive cognitive functions. **Journal of Addiction Medicine**, v. 5, p. 1–8, Mar, 2011.

CROZIER, W.J.; PINCUS, G. The geotropic conduct of Young rats. **The Journal of General Physiology**, p. 257- 269, Nov, 1926.

DAY, N.L.; RICHARDSON, G.A.; GOLDSCHMIDT, L.; ROBLES, N.; TAYLOR, P.M.; STOFFER, D.S.; CORNELIUS, M.D.; GEVA, D. Effect of prenatal marijuana exposure on the cognitive development of offspring at age three. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 16, p. 169–175, Mar, 1994.

DE KLOET, E.R.; KARST, H.; JOELS, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. **Frontiers Neuroendocrinology**, v.29, p.268–272, May, 2008.

DEL ARCO, I.; MUNOZ, R.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F.; ESCUDERO, L.; MARTIN- CALDERON, J.L.; NAVARRO, M.; VILLANUA, M.A. Maternal exposure to the synthetic cannabinoid HU-210: effects on the endocrine and immune systems of the adult male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, p.16–26, 2000.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.; JOHNSON, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, p. 605, Nov, 1988.

DI MARZO, V. Targeting the endo-cannabinoid system: to enhance or reduce? **Nature Review Drug Discovery**, v. 7, p. 438–455, May, 2008.

EL- KHODOR, B.F.; EDGAR, N.; CHEN, A.; WINBERG, M.L.; JOYCE, C.; BRUNNER, D. Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMN7 neonate model of spinal muscular atrophy. **Experimental Neurology**, v. 212, p. 29-43, Jul, 2008.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavior and Brain Research**, v.31, n.1, p. 47-59, Nov, 1988.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNANDEZ, M.L.; RAMOS, J.A. The endogenous cannabinoid system and brain development. **Trends Neuroscience**, v. 23, p. 14–20, Jan, 2000.

FERNANDEZ-RUIZ, J.J.; RODRIGUES DE FONSECA, F.; NAVARRO, M.; RAMOS, J.A. Maternal cannabinoid exposure and brain development: changes in the ontogeny of dopaminergic neurons. 1. ed. **Neurobiology and neurophysiology of cannabinoids, biochemistry and physiology of substance abuse**. Boca Raton, v.4, p. 119-164, 1997.

FRIED, P.A, SMITH, A.M. A literature review of the consequences of prenatal marihuana exposure—an emerging theme of a deficiency in aspects of executive functions. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 1–11, Jan, 2001.

FRIED, P.A. Conceptual issues in behavioral teratology and their application in determining long-term sequelae of prenatal marihuana exposure. **Journal Child Psychology Psychiatry**, v. 43, p. 81–102, Jan, 2002.

FRIED, P.A.; WATKINSON, B. Visuoperceptual functioning differs in 9- to 12-year olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 11–20, Jan, 2000.

GAFFURI, A.; LADARRE, D.; LENKEI, Z. Type-1 Cannabinoid Receptor Signaling in Neuronal Development. **Pharmacology**, v. 90, p.19-39, Jul, 2012.

GARCIA-GIL, L.; MIGUEL, R.L.; ROMERO, J.; PEREZ, A.; RAMOS, J.A. ; FERNANDEZ- RUIZ, J.J. Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA (B), but not GABA (A), receptor agonists in adult rats. **Neurotoxicology**, v. 21, n.3, p. 277-83, May, 1999.

GARCÍA-GIL, L.; DEMIGUEL, R.; MUÑOZ, R.M.; CEBEIRA, M.; VILLANUA, M.A.; RAMOS, J.A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.J. Perinatal delta (9)-tetrahydrocannabinol exposure alters the responsiveness of hypothalamic dopaminergic neurons to dopamine-acting drugs in adult rats. **Neurotoxicology Teratology**, v.19, n.6, p. 477-487, Nov, 1997.

GOLDSCHMIDT, L.; RICHARDSON, G.A.; CORNELIUS, M.D.; DAY, N.L. Prenatal marijuana and alcohol exposure and academic achievement at age 10. **Neurotoxicology and Teratology**, v.26, p. 521–532, May, 2004.

GRAY, K.A.; DAY, N.L.; LEECH, S.; RICHARDSON, G.A. Prenatal marijuana exposure: effect on child depressive symptoms at ten years of age. **Neurotoxicology and Teratology**, v.27, p. 439–448, May, 2005.

HARKANY, T.; GUZMAN, M.; GALVE-ROPERH, I.; BERGHUIS, P.; DEVI, L.A.; MACKIE, K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. **Trends of Pharmacology Science**, v.28, p. 83–92, Jan, 2007.

HERMANN, H.; MARSICANO, G.; LUTZ, B. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. **Neuroscience**, v.109, p.451–460, Jan, 2002.

HILL, M.N.; MCEWEN, B.S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biology Psychiatry**, v.34,n. 5, p.791-7, Jun, 2010.

HUTCHINGS, D.E.; BRAKE, S.C.; BANKS, A.N.; NERO, T.J.; DICK, L.S.; ZMITROVICH, A.C. Prenatal delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat: effects on auditory startle in adulthood. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 13, p. 413–416, Jul, 1991.

HUTCHINGS, D.E.; MARTIN, B.R.; GAMAGARIS, Z.; MILLER, N.; FICO, T. Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. **Life Sciences**, v. 44, p. 697–701, 1989.

IAN, Q.W; HAUN, F; KOLB, B. Analysis of Behavior in Laboratory Rodents. **Modern Techniques in Neuroscience Research**. Springer. Chapter 44, p.1243-1275, 1999.

IVERSEN, L. Cannabis and Brain. **Brain**, v.126, p. 1252- 1270, Jun, 2003.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Art Med, 2002.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 3, n. 6, p. 89-112, 1989.

JAKUBOVIC, A.; HATTORI, T.; MCGEER, P.L. Radiactivity in suckled rats after giving ¹⁴C-tetrahydrocannabinol to the mother. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 221–223, May, 1977.

KATONA, I.; RANCZ, E.A.; ACSADY, L.; LEDENT, C.; MACKIE, K.; HAJOS, N.; FREUND, T.F. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. **Journal of Neuroscience**, v.21, p.9506–9518, Dec, 2001.

KLINKE, R.; SILBERNAGL, S. Tratado de fisiologia. 4.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.765, 2006.

LAUDER, J.M; KREBS, H. Neurotransmitters and development as possible substrates for drugs of the use and abuse. 1.ed. **Neurobehavioral Teratology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. p.289-314.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, p. 180–185, Jun, 1987.

MACRI, S.; CECI, C.; CANESE, R.; LAVIOLA, G. Prenatal Stress and Peripubertal Stimulation of the Endocannabinoid System Differentially Regulate Emotional Responses and Brain Metabolism in Mice. **Plos One**, v. 7, e41821, Jul, 2012.

MACRI, S.; LAVIOLA, G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. **Behaviour Brain Research**, v.154, p. 231–238, Sep, 2004.

MARCO, E.M.; MACRI, S.; LAVIOLA, G. Critical Age Windows for Neurodevelopmental Psychiatric Disorders: Evidence from Animal Models. **Neurotoxicology Reserch**, v.19, p. 286–307, Jul, 2011.

MARTÍN-MORENO, A.M.; BRERA, B.; SPUCH, C.; CARRO, E.; GARCÍA-GARCÍA, L.; DELGADO, M.; POZO, M.A.; INNAMORATO, N.G.; CUADRADO, A.; CEBALLOS, M.L. Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers b-amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. **Journal of Inflammation**, v.9, n.8, p. 2-15, jan, 2012.

MATO, S.; DEL OLMO, E.; PAZOS, A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionally in the human brain. **European Journal of neuroscience**, v.17, p. 1747- 1754, May, 2003.

MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWNSTEIN M.J.; YOUNG A.C.; BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, Aug, 1990.

MATSUDA, L.A.; BONNER, T.I.; LOLAIT, S.J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. **Journal Comp Neurology**, v. 327, n.4, p. 535-50, Jan, 1993.

MECHOULAM, R. Marijuana Chemistry. **Science**, v.168, p. 1159-1163, Nov, 1970.

MEREU, G.; FA, M.; FERRARO, L.; CAGIANO, R.; ANTONELLI, T.; TATTOLI, M. Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. **Proceedings National Academy Science United States America**, v.100, n .8, p. 4915–4920, Apr, 2003.

MIRMIRAM, M.; SWAAB, D.F. Influence of drugs on brain neurotransmission and behavioral stages during development. **Development Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, p. 377-384, Oct, 1987.

MOLINA- HOLGADO, F.; GONZALEZ, A.A.M.I.; ALVAREZ, F.J.; LERET, M.L. Effects of maternal delta-9- tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, p. 39-42, Nov, 1996.

MULDER, J.; AGUADO, T.; KEIMPEMA, E.; BARABAS, K.; BALLESTER, R.C.J.; Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 105, p. 8760–8765, Jun, 2008.

NGUYEN, L. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 105, p. 8760–8765, Jun, 2008.

Navarro, M.; Rubio, P.; de Fonseca, F.R. Behavioural consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 1–14, Oct, 1995.

NILSSON, M.; HANSSON, S.; CARLSSON, A.; CARLSSON, M.L. Differential effects of the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice. **Neuroscience**, v.149, p.123–30, Jul, 2007.

O'SHEA, M.; MCGREGOR, I.S.; MALLET, P.E. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar long-lasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. **Journal of Psychopharmacology**, 20, 5, 611-21, Sep, 2006.

PATEL, S.; HILLARD, C. Cannabinoid CB1 receptor agonist produce cerebellar dysfunction in mice. **Journal Pharmacol Experimental Therapies**, v. 297, n.2, p. 629- 637, May, 2001.

PATEL, S.; HILLARD, C.; Cannabinoid CB1 receptor agonist produce cerebellar dysfunction in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapies**, v.297, n.2, p.629- 637, May, 2001.

PATTIJ, T.; WISKERKE, J.; SCHOFFELMEER, A.N. Cannabinoid modulation of executive functions. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 458–463, May, 2008.

PELLIS, S.M. Righting and the modular organization of motor programs. In K-P Ossenkopp, Measuring movement and locomotion: From invertebrates to humans. **Behavioural Brain Research**, p. 115–133, 1996.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. v.14, n.3, p.149-67, Aug, 1985.

PUIGHERMANAL, E.; MARSICANO, G.; BUSQUETS-GARCIA, A.; MALDONADO, B.L.R.; OZAITA, A. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 6, p.1152- 1161, Aug, 2009.

REY, A.A, PURRIO, M.; VIVEROS, M.P.; LUTZ, B. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. **Neuropsychopharmacology**, v.37, n.12, p. 2624-34, Nov, 2012.

RONCA, A.E.; ALBERTS, J.R. Effects of prenatal spaceflight on vestibular responses in neonatal rats. **Journal of Applied Physiology**, v.89, n. 6, p. 2318-24, Dec, 2000.

RUBINO, T.; PAROLARO, D. Sexually dimorphic effects of cannabinoid compounds on emotion and cognition. **Frontiers Behavior Neuroscience**, v.5, p. 64, Sep, 2011.

RUBINO, T.; PAROLARO, D. The Impact of Exposure to Cannabinoids in Adolescence: Insights from Animal Models. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 578-85, Apr, 2015.

RUBINO, T.; ZAMBERLETTI, E.; PAROLARO, D. Endocannabinoids and Mental Disorders. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, v.231, p.261-263, 2015.

SANDI, C; HALLER, J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. **Nature**, v. 290, p.16, May, 2015.

SMITH, A.M.; FRIED, P.A.; HOGAN, M.J.; CAMERON, I. Effects of prenatal marijuana on visuospatial working memory: an fMRI study in young adults. **Neurotoxicology and Teratology**, v.28, p. 286–295, Feb, 2006.

SUAREZ, I.; BODEGA, G.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; RAMOS, J.A.; RUBIO, M.; FERNANDEZ, B. Down-regulation of the AMPA glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 in the rat cerebellum following pre- and perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure. **Cerebellum**, v.3, p. 66–74, 2004.

TAKASHAHI, K.; LINDEN, D. Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. **The American Physiological Society**, p.1167- 1180, Mar, 2000.

TERZIAN, A.L.; DRAGO, F.; WOTJAK, C.T.; MICALE, V. The dopamine and cannabinoid interaction in the modulation of emotions and cognition: assessing the role of cannabinoid CB1 receptor in neurons expressing dopamine D1 receptors. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.5, n. 49, p.1-10, Aug, 2011.

TREZZA, V.; CAMPOLONGO, P.; CASSANO, T.; MACHEDA, T.; DIPASQUALE, P.; CARRATU, M.R.; GAETANI, S.; CUOMO, V. Effects of perinatal exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol on the emotional reactivity of the offspring: a longitudinal behavioral study in Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 198, p. 529–537, Jul, 2008.

TREZZA, V.; DAMSTEEG, R.; MANDUCA, A.; PETROSINO, S.; LINDA, W.M.; KERKHOF, V.; PASTERKAMP, J.; ZHOU, Y.; CAMPOLONGO, P.; CUOMO, V.; MARZO, V.; VANDERSCHUREN L.M.J. Endocannabinoids in amygdala and nucleus accumbens mediate social play reward in adolescent rats. **Neuroscience**, Oct, v. 32, n. 43, p.14899–14908, Apr, 2012.

VIVEROS, M.P.; MARCO, E.M.; FILE, S.E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacology Biochemical Behaviour**, v.81, p. 331–342, Jun, 2005.

WATANABE, M.; MAEMURA, K.; KANBARA, K.; TAMAYAMA, T.; HAYASAKI, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International Review Cytology**, v. 213, p.1-47, Jan, 2002.

WILEY, J.L.; BURSTON J.J. Sex differences in Δ (9)-tetrahydrocannabinol metabolism and in vivo pharmacology following acute and repeated dosing in adolescent rats. **Neuroscience Letters**, v. 576, p. 51–55, Jun, 2014.

WILSON R.I.; NICOLL, R.A. Endocannabinoid Signaling in the Brain. **Sciences**, v.296, Apr , 2002.

WITKIN, J.M.; TZAVARA, E.T.; NOMIKOS, G.G.A. Role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. **Behaviour of the Pharmacology**, v.16, p. 315–331, Sep, 2005.

ZARDO, D.S. Memória e os aspectos neurológicos da aprendizagem. **Revista de Educação do Ideau**, Rio Grande do Sul: Getúlio Vargas, v. 2, n. 3, p. 121-130, 2006.

4 CONCLUSÕES

Em resumo, os nossos resultados indicam que fumar maconha durante a gravidez, mesmo em doses baixas pode ser embriotóxico e fetotóxico, aumentando as falhas de implantação e comprometendo o desenvolvimento fetal. Além do mais, nossa exposição resultou em resultados negativos na avaliação psicomotora e de força muscular em neonatos e alterações na emotividade e memória de camundongos adultos expostos pré-natalmente. O ambiente intra-uterino é um fator determinante para o desenvolvimento fetal e qualquer perturbação que ocorra durante este período crítico da vida pode predispor indivíduos a doenças posteriores (GLUCKMANN et al., 2005).

As controvérsias nos resultados clínicos e experimentais podem ser explicadas pelo uso de diferentes protocolos. Tempo de exposição, via de administração, composto utilizado, idade de avaliação e a falta de padronização dos testes comportamentais influenciam os diferentes resultados e torna difícil conclusões acerca dos efeitos a curto e longo prazo da exposição materna a *Cannabis*.

Portanto, mais estudos são necessários para reconhecer e melhor compreender os impactos do uso da maconha durante a gravidez e seus impactos na saúde futura. Estes aspectos e a propagação da legalização do uso recreativo dessa droga merecem uma avaliação crítica.

REFERÊNCIAS

ASHTON, C.H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, n. 2, p. 101-106, Fev, 2001.

BATALLA, A.; BHATTACHARYYA, S.; YÜCEL, M.; FUSAR-POLI, P.; CRIPPA, J.A.; NOGUÉ, S.; TORRENS, M. Structural and functional imaging studies in chronic Cannabis users: a systematic review of adolescent and adult findings. **PLoSOne**, v. 8, n.2, p.55821, Fev, 2013.

BESSA M.A.; MITSUHIRO, S.S.; CHALEM, E.; BARROS, M.M.; GUINSBURG, R.; LARANJEIRA, R. Underreporting of use of cocaine and marijuana during the third trimester of gestation among pregnant adolescents. **Addictive Behaviors**, v. 35, p. 266–269, Oct, 2010.

CAMPOLONGO, P.; TREZZA, V.; PALMERY, M.; TRABACE, L.; CUOMO, V. Developmental exposure to cannabinoids causes subtle and enduring neurofunctional alterations. **International Review of Neurobiology**, v. 85, p.117–33, Jul, 2009.

CELLA, M.; LEGUIZAMON, G.F.; SORDELLI, M.S.; CERVINI, M.; GUADAGNOLI, T.; RIBEIRO, M.L.; FRANCHI, A.M.; FARINA, M.G. Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. **Placenta**, v. 29, p. 699- 707, Aug, 2008.

CRIPPA, J.A.; LACERDA, A. L.T; AMARO, E.; FILHO, G.B.; ZUARDI, A.W, BRESSAN, R.A. Efeitos cerebrais da maconha – resultados dos estudos de neuroimagem. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, n. 1, p. 70-78, Mar, 2005.

DAS, S.K.; PARIA, B.C.; CHAKRABORTY, I.; DEY, S.K. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. **Proceedings of the National Academy for Sciences**, USA, v. 92, p. 4332- 4336, May, 1995.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n.5, p. 605-613, Nov, 1988.

FRIED E. Multiple Roles for the Endocannabinoid System During the Earliest Stages of Life: Pre-and Postnatal Development. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, n.1, p. 75-81, May, 2008.

FRIED, P.A. Conceptual issues in behavioral teratology and their application in determining long-term sequelae of prenatal marijuana exposure. **Journal Child Psychology and Psychiatry**, v. 43 n. 1, p. 81–102, Jan, 2002.

GALIÉGUE, S.; MARY, S.; MARCHAND, J.; DUSSOSSOY, D.; CARRIERE, D.; CARAYON, P.; BOUABOULA, M.; SHIRE, D.; LE FUR, G.; CASELLA, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, p. 54-61, Aug, 1995.

HABAYEB, M.O.; TAYLOR, A.H.; EVANS, M.D.; COOKE, M.S.; DAVID, J.T.; STEPHEN, C.B.; KONJE, J.C. Plasma Levels of the Endocannabinoid Anandamide in Women—A Potential Role in Pregnancy Maintenance and Labor? **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5482- 5487, Nov, 2004.

HALL, W.; SOLOWIJ, N. Adverse effects of cannabis. **Lancet**, v. 352, n. 9140, p. 1611-1616, Nov, 1998.

HAYATBAKHSH, M.; FLENADY, V.; GIBBONS, K.; KINGSBURY, A.; HURRION, E.; MAMUM, A.; NAJMAN, J. Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy. **Clinical Investigation**, v. 71, p. 215- 219, Dec, 2012.

INPAD/UNIAD da UNIFESP-II LENAD-**Levantamento Nacional de Álcool e Drogas: O Uso de Maconha no Brasil**. Disponível em: <[http://www.inpad.org.br/images/stories/ LENAD/lenad_maconha-1%20copia.pdf](http://www.inpad.org.br/images/stories/LENAD/lenad_maconha-1%20copia.pdf)>. Acesso em 24 Fev. 2016.

JAKUBOVIC, A.; HATTORI, T.; MCGEER, P.L. Radioactivity in suckled rats after giving ¹⁴C-tetrahydrocannabinol to the mother. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 221–223, May, 1977.

MACCARRONE M.; BAB, I.; BIRO, T.; CABRAL, G.A.; DEY, S.K.; DI MARZO, V.; KONJE, J.C.; KUNOS, G.; MECHOULAM, R.; PACHER, P.; SHARKEY, K.; ZIMMER, A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 3, n.5, p. 277- 296, May, 2015.

MEIER, M.H.; CASPI, A.; AMBLER, A.; HARRINGTON, H.; HOUTS, R.; KEEFE, R.S.; MCDONALD, K.; WARD, A.; POULTON, R.; MOFFITT, T.E. Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n.40, p. 2657-2664, Oct, 2012.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, p. 61-65, Sep, 1993.

NAVARRO, M.; RUBIO, P.; DE FONSECA, F.R. Behavioural consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p.1–14, Oct, 1995.

PARIA, B.C.; DEY, S.K. Ligand- receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.108, p. 211-220, Nov, 2000.

PARK, B.; GIBBONS, H.M.; MITCHELL, M.D.; GLASS, M. Identification of the CB1 Cannabinoid receptor and fatty acid amine hydrolase (FAAH) in the human placenta. **Placenta**, p. 990-995, Nov, 2003.

RANDALL, C.L. Alcohol and pregnancy: highlights from three decades of research. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v.62, p. 554–561, Sep, 2001.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; DEL ARCO, I.; BERMUDEZ-SILVA, F.J.; BILBAO, A.; CIPPITELLI, A.; NAVARRO, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol and Alcohol**, v. 40, n.1, p. 2-14, Jan, 2005.

SCHNEIDER M. Cannabis use in pregnancy and early life and its consequences: animal models. **European Archives Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 259, n.7, p. 383–393, Oct, 2009.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA). **Results from the 2009 National Survey on Drug Use and Health Mental Health Findings**. Disponível em: <[www.oas.samhsa.gov/NSDUH/2k9NSDUH/MH/2k9MH Results.htm](http://www.oas.samhsa.gov/NSDUH/2k9NSDUH/MH/2k9MH%20Results.htm). 2009>. Acesso em 15 de Abr. 2016.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L.J. Cannabinoid and opioid modulation of social play behavior in adolescent rats: differential behavioral mechanisms. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18 n. 7, p. 519–530, Jul, 2008.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **Annual Report 2009**. Disponível em: <http://www.unodc.org/documents/about-unodc/AR09_LORES.pdf>. 2009. Acesso em 13 Fev. 2016.

ZUCKERMAN, B.; FRANK, D.; HINGSON, R.; AMARO, H.; LEVENSON, S.; KAYNE, H.; PARKER, S.; VINCI, R.; ABOYAGE, K.; FRIED, L. Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p.762- 768, Mar, 1989.