DAIANA APARECIDA SOUZA LIMA

**Efeitos do uso de *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento do
baço e timo em prole de camundongos (BalbC) durante a
gestação**

São Paulo

2018

DAIANA APARECIDA SOUZA LIMA

**Efeitos do uso de *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento do
baço e timo em prole de camundongos (BalbC) durante a
gestação**

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 a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2018

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. 3679
FMVZ

Lima, Daiana Aparecida Souza
Efeitos do uso de *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento do baço e timo em prole de camundongos (BalbC) durante a gestação / Daiana Aparecida Souza Lima. – 2018.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Matera Veras.

1. *Cannabis sativa*. 2. Exposição gestacional. 3. Baço. 4. Timo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO USO DE CANNABIS SATIVA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO BAÇO E TIMO EM PROLE DE CAMUNDONGOS (BALBC) E DURANTE A GESTAÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 3311130716, sob a responsabilidade de **Mariana Matera Veras e equipe; Daiana Aparecida Souza Lima** - 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 **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "EFFECTS OF CANNABIS SATIVA USE ON THE DEVELOPMENT OF SPLEEN AND THYMUS IN MURINE MODEL DURING PREGNANCY PERIOD", utilizing 30 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 3311130716, under the responsibility of **Mariana Matera Veras and team; Daiana Aparecida Souza Lima** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2016** a **06/2018**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **90 a 200 dias**

N: **30**

Linhagem: **BalbC**

Peso: **20 a 25 g**

Resumo: O uso recreacional de Cannabis sativa, popularmente chamada de maconha, aumentou consideravelmente nos últimos anos, estendendo-se para mulheres gestantes. A gestação provoca grandes alterações fisiológicas na mãe e também no concepto, e o uso crônico da droga durante esse período pode comprometer negativamente o seu desenvolvimento, como já apontam estudos realizados em humanos e em modelos murinos. Porém, ainda há escassez de estudos relacionados à exposição da fumaça da maconha e os mecanismos fisiopatológicos não são bem conhecidos, o que torna necessário avaliar se esses desfechos podem estar associados a alterações no sistema imunológico materno. O estudo apresentado pretende avaliar o impacto da exposição gestacional à fumaça da queima da maconha sobre o desenvolvimento e formação do baço e timo da prole em seus aspectos morfológicos em neonatos e jovens adultos, assim como a resposta imunológica uterina a gestação, utilizando um modelo realista que mimetiza o uso por humanos (por via inalatória) sob os aspectos de dose e meio de exposição. As camundongas gestantes foram expostas à fumaça da queima de cigarros de Cannabis sativa desde o início da gestação, com início no 5º dia de gestação e término no 18º dia de gestação. Serão utilizados métodos estereológicos e morfológicos para avaliar o desenvolvimento e prováveis alterações nos tecidos linfóides de interesse. Recentemente, a descriminalização da Cannabis se tornou tema de grande embate em diversos países, destacando-se o Brasil; por isso é importante que haja discussão e consequentemente avanços nas pesquisas sobre o uso dessa droga e suas implicações a saúde pública, além de se obter resultados sobre efeitos oriundos de seu uso durante o período gestacional. Palavras-chave: Cannabis sativa, sistema imunológico, baço, timo.

Local do experimento: **LIM 05 FMUSP**

São Paulo, 14 de julho de 2017

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: LIMA, Daiana Aparecida Souza

Título: **Efeitos do uso de *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento do baço e timo em prole de camundongos (BalbC) durante a gestação**

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

Dedico este trabalho as duas pessoas que mais acreditam e torcem pelas minhas realizações: meus pais, Maria e Batista, os meus maiores exemplos de vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela saúde e pela disposição em continuar minha trajetória acadêmica, mesmo com tantas dificuldades a serem vencidas.

Aos meus pais, irmãs, sobrinhos, cunhados e amigos, por estarem ao meu lado em todos os momentos de minha vida, e principalmente pela compreensão e pelo apoio oferecido de diversas formas.

A Profa. Dra. Mariana Matera Veras, pela orientação e pela oportunidade em realizar mais um objetivo de minha vida. Além disso, por tudo que aprendi com o trabalho desenvolvido, pela compreensão, pelos momentos de descontração, amizade e pelo incentivo em fazer as coisas bem feitas.

Aos meus animais de estimação, os que estão e os que não estão mais nesse plano, por sempre me receberem com os melhores abraços, por me confortarem e me fazerem sorrir todos os dias.

Aos meus alunos, que mostram a cada dia em que leciono que a trajetória no ensino é árdua, mas que a esperança em dias melhores ainda é necessária. A educação é o alicerce na vida de qualquer indivíduo, que sempre possamos acreditar nisso.

Aos colegas, amigos e professores que conheci nesse período, pela ajuda e por todos os momentos que passamos no Departamento de Anatomia da FMVZ e no Laboratório de Poluição Atmosférica da FMUSP.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo suporte oferecido e por tornar possível a realização desta pesquisa.

A Capes e CNPq pelo suporte financeiro.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

RESUMO

LIMA, DAS. **Efeitos do uso de *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento do baço e timo em prole de camundongos (BalbC) durante a gestação. [Effects of *Cannabis sativa* on the development of spleen and thymus in offspring mice (BalbC) during pregnancy]**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Cannabis sativa (maconha) é a droga ilícita mais conhecida e utilizada em todo o mundo. Recentemente, o uso recreativo da droga por jovens aumentou muito, especialmente entre as gestantes. Estudos indicam que seu uso na gestação causa efeitos fetotóxicos adversos, no entanto, poucos estudos avaliam esses efeitos durante este período crítico sobre o desenvolvimento do sistema imunológico. Neste estudo, avaliamos o impacto da exposição gestacional à fumaça de maconha resultante da queima de cigarros sobre o desenvolvimento do baço e do timo de proles de camundongos BalbC. Utilizamos um modelo que se aproxima das reais condições de uso humano (inalação) sob os aspectos de dose e média exposição. Camundongos fêmeas gestantes (n = 20) foram expostas ao fumo da maconha ou ao ar filtrado (grupo controle) do 5,5º ao 17,5º dia gestacional (DG) por 5 minutos diariamente. Para isso, foi utilizado um aparelho para inalação da fumaça desenvolvido em nosso laboratório, onde os cigarros de maconha (200mg de *Cannabis sativa*) foram queimados e a fumaça conduzida para a câmara de exposição dos animais (exposição somente inalatória). Os baços e timos das proles foram coletados no 18,5º dia gestacional (DG), 20º e 60º dias pós-natais (DPN) para a realização das análises histológica e histoquímica. Avaliações morfológicas e quantitativas dos órgãos foram realizadas utilizando-se métodos estereológicos e por meio da semi quantificação de fibras do sistema colágeno. Os resultados indicam um aumento no peso corporal dos animais com 60 DPN cujas mães foram expostas ao fumo de *Cannabis sativa* durante a gravidez. Os machos com 60 DPN expostos apresentaram redução no volume total do timo, assim como em seus principais compartimentos, medula e córtex, onde também foi observado um aumento de fibras do sistema colágeno, quando comparados aos animais controles. Além disso, o baço desses animais também apresentou redução significativa em seu

volume, porém não houve redução significativa no volume total da polpa vermelha. Machos e fêmeas com 60 DPN do grupo exposto apresentaram redução no volume total da polpa branca e aumento de fibras do sistema colágeno na região das trabéculas do parênquima do baço. Em suma, a exposição gestacional à maconha causa efeitos fetotóxicos que podem ser observados por alteração no baço e no timo da prole (sendo os efeitos distintos para machos e fêmeas) e estas alterações se tornam mais marcantes com o avanço da idade do animal, com potencial comprometimento da resposta imune nesses indivíduos.

Palavras-chaves: *Cannabis sativa*. Exposição gestacional. Baço. Timo.

ABSTRACT

LIMA, DAS. **Effects of *Cannabis sativa* on the development of spleen and thymus in offspring mice (BalbC) during pregnancy.** 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Cannabis sativa (marijuana) is one of the most well-known and used illicit drugs worldwide. Recently, recreational use of that drug among young people has increased greatly, especially among pregnant women. Studies indicate that its use in pregnancy causes adverse fetotoxic effects, however there are few studies evaluating the effects of marijuana use during this critical period on the developing immune system. In this study, we evaluated the impact of gestational exposure to smoke marijuana resulting from burning cigarettes on the spleen and thymus development of BalbC mice offspring. We have used a model that approximates the real conditions of human use (inhalation) under the dose and medium exposure aspects. Pregnant mice (n=20), were exposed to marijuana smoke or filtered air (control group) from 5.5° to 17.5° gestational day (GD) for 5 minutes daily. Thus, we used a smoke inhalation apparatus developed in our laboratory where the marijuana cigarettes (200mg of *Cannabis sativa*) were burned and conducted to exposure chamber reaching the animals (nose-only exposure). Spleen and thymus of the offspring were collected on the 18.5° gestational day (GD), 20° and 60° postnatal day (PND) for the histological and histochemical analysis. Morphological and quantitative evaluations of these organs were performed using stereological methods and semi quantification of collagen fibers. The results indicate an increase in the mice body weight at PND 60 whose mothers were exposed to *Cannabis sativa* smoke during pregnancy. The PND 60 males from exposed group showed lower thymus total volume, as well as its main compartments such as medulla and cortex, where collagen fibers was also observed, when compared with males from the control group. Also, the spleen of these animals also presented a significant reduction, however no significant reduction was showed in the total volume of the red pulp. In addition, males and females from the exposed group at PND 60 presented reduction in total volume in the white pulp and increased of collagen fibers in the trabeculae region of the spleen. In summary, gestational exposure to marijuana causes

fetotoxic effects that can be observed due to alteration in the spleen and thymus of the offspring (the effects being different for males and females), and these changes being marked with the advancement of the age, with potential impairment of the immune response in these individuals.

Keywords: *Cannabis sativa*. Gestational exposure. Spleen. Thymus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do desenho experimental.....	33
Figura 2: Representação esquemática do sistema de geração e exposição dos animais experimentais à fumaça da queima da <i>Cannabis sativa</i>	35
Figura 3: Fotomicrografia de corte histológico de baço em pequeno aumento com sistema de teste de pontos sobreposto utilizada para a análise do volume total e dos compartimentos.	40
Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico de timo em pequeno aumento com sistema de teste de pontos sobreposto utilizada para a análise do volume total e dos compartimentos.	40
Figura 5: Fotomicrografias do timo em pequeno aumento.	41
Figura 6: Fotomicrografias do timo em maior aumento.	41
Figura 7: Fotomicrografias do baço em pequeno aumento..	42
Figura 8: Fotomicrografias do baço em maior aumento.	42
Figura 9: Ilustração da avaliação de colágeno nos timos dos animais não expostos e expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação em menor aumento.....	44
Figura 10: Ilustração da avaliação de colágeno nos timos dos animais expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação em maior aumento.	44
Figura 11: Ilustração da avaliação de colágeno nos baços dos animais expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação em menor aumento.	45
Figura 12: Ilustração da avaliação de colágeno nos baços dos animais não expostos e expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação em maior aumento.....	45
Figura 13: Representação gráfica do peso médio dos timos dos fetos a termo, avaliados de acordo com a exposição gestacional à <i>Cannabis sativa</i> e exposição gestacional e sexo.....	50
Figura 14: Representação gráfica do peso médio dos baços dos fetos a termo, avaliados de acordo com a exposição gestacional à <i>Cannabis sativa</i> e exposição gestacional e sexo.....	50
Figura 15: Representação gráfica do peso corporal médio nos animais estudados de acordo com a idade, exposição à <i>Cannabis sativa</i> e sexo e gráficos de interação mostrando o efeito da exposição e da idade sobre o peso médio corporal dos machos e fêmeas expostos gestacionalmente à <i>Cannabis sativa</i> ...	

.....	51
Figura 16: Representação gráfica do volume total médio do timo (mm ³) dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos e fêmeas sobre o volume total do timo.	52
Figura 17: Representação gráfica do volume total médio da medula (mm ³) dos timos dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos e fêmeas sobre o volume total da medula do timo.....	53
Figura 18: Representação gráfica do volume total médio do córtex (mm ³) dos timos dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos e fêmeas sobre o volume total do córtex do timo.....	54
Figura 19: Representação gráfica do volume fracional médio da medula (%) dos timos dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional da medula do timo de machos e fêmeas.....	55
Figura 20: Representação gráfica do volume fracional médio do córtex (%) dos timos dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional do córtex do timo de machos e fêmeas.....	56
Figura 21: Representação gráfica do volume total médio do baço (mm ³) dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume total do baço em machos e fêmeas..	57
Figura 22: Representação gráfica do volume total médio da polpa branca (mm ³) dos baços dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos e fêmeas sobre o volume total da polpa branca do baço.	58

Figura 23: Representação gráfica do volume total médio da polpa vermelha (mm ³) dos baços dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume total da polpa vermelha do baço em machos e fêmeas.....	59
Figura 24: Representação gráfica do volume fracional médio da polpa branca (%) dos baços dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional da polpa branca do baço em machos e fêmeas.....	60
Figura 25: Representação gráfica do volume fracional médio da polpa vermelha (%) dos baços dos animais expostos à <i>Cannabis sativa</i> e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional da polpa vermelha do baço em machos e fêmeas.....	61
Figura 26: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno no córtex tímico dos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação....	63
Figura 27: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno no córtex tímico dos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	63
Figura 28: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na medula tímica dos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	64
Figura 29: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na medula tímica dos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	64
Figura 30: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos tímicos maiores nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	65
Figura 31: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos tímicos maiores nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	65

Figura 32: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos tímicos menores nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	65
Figura 33: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos tímicos menores nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	65
Figura 34: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos corpúsculos tímicos na região de epitélio da medula tímica nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	66
Figura 35: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos corpúsculos tímicos na região de epitélio da medula tímica nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	66
Figura 36: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa branca do baço nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	67
Figura 37: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa branca do baço nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação... ..	67
Figura 38: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa vermelha do baço nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.... ..	67
Figura 39: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa vermelha do baço nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	67
Figura 40: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos grandes (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	68
Figura 41: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos grandes (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	68

Figura 42: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos pequenos (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	69
Figura 43: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos pequenos (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	69
Figura 44: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nas trabéculas do estroma esplênico dos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	69
Figura 45: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nas trabéculas do estroma esplênico dos animais com 60 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	69
Figura 46: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na bainha periarteriolar (PALS) nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	70
Figura 47: Representação gráfica de distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na bainha periarteriolar (PALS) nos animais com 20 PND, expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i> na gestação.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos para avaliação do peso médio dos timos e baços dos neonatos.....	37
Tabela 2: Divisão dos grupos para avaliação estereológica e histoquímica...	37
Tabela 3: Análise de fibras do sistema colágeno por área dos compartimentos tímicos e esplênicos..	43
Tabela 4: Valores da Concentração de HPAs na fumaça de <i>Cannabis sativa</i> por cigarro queimado.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	<i>Cannabis sativa</i> (histórico).....	23
2.2	<i>Cannabis sativa</i> durante a gestação	24
2.3	Δ^9 -THC, canabinoides e sistema endocanabinoide	24
2.4	Desenvolvimento do sistema imunológico	26
2.5	Desenvolvimento do timo	27
2.6	Desenvolvimento do baço	29
3	JUSTIFICATIVA.....	31
4	OBJETIVO GERAL.....	31
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
6	MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1	Animais (grupos experimentais)	32
6.2	Delineamento experimental.....	32
6.3	Droga (substância teste)	33
6.4	Aparato para inalação da fumaça	34
6.5	Protocolo de exposição	34
6.6	Caracterização da exposição - HPAs na fumaça de <i>Cannabis sativa</i>	35
6.7	Coleta	36
6.8	Avaliação dos parâmetros reprodutivos	36
6.9	Avaliação estereológica.....	37
6.9.1	Volume e densidade de volume do baço e timo e seus respectivos compartimentos	38
6.9.2	Avaliação estereológica da medula e córtex tímicos e das polpas branca e vermelha esplênicas	41
6.10	Avaliação das fibras do sistema colágeno.....	43
6.10.1	Avaliação histoquímica para quantificação de fibras do sistema colágeno nos timos e baços	44
6.11	Protocolos – Técnicas histoquímicas	45
6.11.1	Hematoxilina-Eosina	45
6.11.2	Picrossírius Red	46

7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
8	RESULTADOS.....	48
8.1	Avaliação do nível de $\Delta 9$ -THC na amostra de <i>Cannabis sativa</i>	48
8.2	Caracterização da exposição	48
8.3	Avaliação dos níveis de hidrocarbonetos presentes na fumaça	48
8.4	Desfechos nas proles	49
8.4.1	Pesos dos timos e baços - Neonatos	50
8.4.2	Peso corporal dos jovens e adultos.....	51
8.4.3	Volume total do timo (mm^3)	52
8.4.4	Volumes totais da medula e do córtex do timo (mm^3)	53
8.4.5	Fração de volume da medula e do córtex do timo (%)	55
8.4.6	Volume total do baço (mm^3)	57
8.4.7	Volumes totais das polpas branca e vermelha do baço (mm^3) ..	58
8.4.8	Fração de volume das polpas branca e vermelha do baço (%)...60	
8.5	Análise de fibras do sistema colágeno	62
8.5.1	Zona cortical tímica	63
8.5.2	Zona medular tímica	63
8.5.3	Vasos grandes – Tecido perivascular e septos interlobulares do timo	64
8.5.4	Vasos pequenos – tecido perivascular e septos interlobulares do timo	65
8.5.5	Corpúsculos tímicos ou de Hassal – Região medular	66
8.5.6	Polpa branca esplênica	66
8.5.7	Polpa vermelha esplênica	67
8.5.8	Vasos grandes – cordões e sinusoides esplênicos	68
8.5.9	Vasos pequenos – cordões e sinusoides esplênicos	68
8.5.10	Trabéculas – estroma esplênico	69
8.5.11	Bainha linfocitária perivascular (PALS)	70
9	DISCUSSÃO	71
10	CONCLUSÃO	79
11	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* (maconha) é uma das drogas ilícitas mais conhecidas e utilizadas mundialmente e seu uso passou por diversas etapas ao longo dos séculos. Nos últimos anos, foi estimado o número de mais de 180 milhões de usuários (UNODC, 2015). A partir de novembro de 2017, a droga passou a ser legalizada em 29 estados nos Estados Unidos e no Distrito de Colúmbia, tanto para uso medicinal, quanto para o uso recreativo, e isso vem se repetindo em várias partes do mundo (GOVERNING, 2018).

Conhecida como maconha, a droga é considerada por muitos usuários inofensiva à saúde e seu uso no Brasil também apresenta grandes proporções. Em 2012, um estudo desenvolvido pela Universidade Federal de São Paulo, mostrou que cerca de 4,3% dos adolescentes e 5,8% de adultos do país usaram maconha pelo menos uma vez na vida. Nesse mesmo levantamento foi relatado que cerca de 1,5 milhão de adolescentes e adultos fazem uso da droga diariamente (LARANJEIRA et al., 2014).

Geralmente, o uso da maconha se inicia na juventude, período em que os usuários estão em idade reprodutiva (SAMSHA, 2015). Com isso, as gestantes acabam sendo incluídas no grupo de usuários vulneráveis, além do uso concomitante de outras drogas ilícitas (SALAS-WRIGHT et al., 2015) mesmo sendo bem conhecidos e discutidos os efeitos negativos dessa ação durante o período gestacional.

A proporção de usuárias de maconha no período gestacional é significativa: cerca de 3% a 4% das gestantes usam a droga em países ocidentais (EBRAHIM et al., 2003; EL MARROUN et al., 2008; HUIZINK et al., 2014). Um levantamento nos EUA apontou que 4% das mulheres gestantes usaram maconha naquele ano (KO et al., 2015); em São Paulo, um estudo realizado por BESSA et al. (2010), também mostra um número bem alto de uso da droga por gestantes: 6% das gestantes no terceiro trimestre da gestação fizeram uso em associação com cocaína.

Um levantamento mais recente apontou que 4,2% e 6,8% gestantes na relataram o uso da droga no pré-natal e pós-natal, respectivamente, inclusive prorrogando o uso durante a amamentação (KO et al., 2018).

A gestação é um período em que ocorrem alterações fisiológicas consideráveis na mãe, além da formação da placenta e o desenvolvimento do feto, e com isso, os processos de absorção, distribuição e eliminação de drogas utilizadas pode ser muito variável e comprometer o desenvolvimento normal do concepto (LOEBSTEIN et al., 1997; KOREN et al., 2001).

O que torna a utilização da maconha mais perigosa nesse período, é que o seu componente psicoativo, $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC) é uma substância lipossolúvel e pode atravessar a barreira placentária, afetando o desenvolvimento fetal (EL MARROUN et al., 2010; CONNER et al., 2015; METZ et al., 2015; CHABARRIA et al., 2016) e ocasionando efeitos adversos na gestação.

Alterações negativas no sistema imunológico estão incluídas dentre as implicações do uso da maconha sobre a saúde. O uso na gestação pode tornar a gestante suscetível a infecções e, por conseguinte prejudicar o feto direta ou indiretamente (NAHAS et al., 1974; MUNSON et al., 1976; BACZYNSKY et al., 1983; CORRIGAN et al., 2008). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos da maconha sobre o sistema imunológico e são necessários mais estudos que avaliem seus efeitos no desenvolvimento do sistema imunológico durante o período pré-natal e pós-natal.

A forma mais comum de uso da maconha é o fumo da planta seca, portanto quando tratamos do impacto da exposição gestacional à maconha devemos considerar não só os efeitos do $\Delta 9$ -THC, mas também dos demais componentes presentes na fumaça, entre eles: CO, amônia, SO_x, NO, NO_x e cianeto de hidrogênio (MOIR et al., 2007).

A descriminalização da *Cannabis sativa* e o seu uso medicinal passou a ser discutido mundialmente, sendo em muitos países liberado o seu uso inclusive para fins recreativos. Entretanto, ainda sabemos muito pouco sobre as reais consequências dos efeitos sobre o desenvolvimento fetal e seus desdobramentos na saúde na vida adulta. Maior enfoque foi dado pelos estudos ao sistema nervoso central e os demais sistemas, tais como o imunológico, pouco foram estudados.

Assim, este estudo visa avaliar experimentalmente os efeitos do uso da maconha durante a gestação sobre o desenvolvimento de órgãos do sistema

imunológico de forma a contribuir com as discussões sobre a legalização e liberação do uso recreativo da droga.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Cannabis sativa* (histórico)

Diferentes espécies de plantas do gênero *Cannabis* são cultivadas principalmente em países de regiões tropicais, como Brasil, Chile, Peru e Uruguai, sendo umas das plantas mais cultivadas no mundo. *Cannabis sativa* *linneu* (maconha) pertence à família das Canabiáceas e de seus mais de 480 compostos químicos isolados, os mais conhecidos são os canabinoides (TURNER et al.,1980; NAHAS et al.,1992) como o Δ 9-tetrahidrocanabinol (Δ 9-THC) (GAONI et al.,1964; STOLKER et al., 2004).

O consumo de maconha por jovens através do fumo é muito comum, e a dependência desta droga pode aumentar o risco de utilização de outras drogas ilícitas (MECHOULAM et al., 2005; HALL et al., 2006; MALHOTRA et al., 2006).

A composição química da fumaça decorrente da queima da maconha foi comparada a do tabaco, em estudo realizado por MOIR e seus colaboradores, em 2007. Eles encontraram níveis 20x maiores de amônia na maconha. Cianeto de hidrogênio, NO, NOx e algumas aminas aromáticas também foram encontradas em concentrações 3 a 5 vezes maiores que na fumaça do tabaco. Já hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram encontrados em concentrações inferiores.

Além de problemas psicóticos (BRECHER et al.,1972; NAHAS et al.,1992; GROTENHERMEN et al., 2007), a maconha pode provocar doenças respiratórias e cardiovasculares, afetar o metabolismo ósseo e está associada ao surgimento de câncer (TAYLOR et al., 2003; TASHKIN 2005; KORANTZOPOULOS et al., 2008; REECE, 2009). O uso crônico da maconha pode também influenciar no tamanho do baço e fígado em humanos (esplenomegalia e hepatomegalia) (BORINI et al., 2004).

2.2 *Cannabis sativa* durante a gestação

A literatura mostra que fumar maconha durante a gestação produz efeitos negativos tais como: baixo peso, prematuridade, restrição de crescimento intrauterino (SHERWOOD et al., 1999; HURD et al., 2005, EL MARROUN et al., 2009). Em roedores os achados são similares, porém a forma de exposição mais empregada nos estudos é a injeção intraperitoneal de Δ^9 -THC ou ingestão por gavagem (METZ et al., 2015). Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos associados a estas alterações ainda não são bem conhecidos. Por tratar-se de uma droga psicoativa, a maioria dos estudos focou nos efeitos que o consumo desta droga durante a gestação poderia acarretar no desenvolvimento neurocomportamental e cognitivo dos conceptos (HARBISON et al., 1972; CAMPOLONGO et al., 2011). Poucos são os estudos em humanos e animais que avaliam desfechos não associados ao sistema nervoso apesar da importância do sistema endocanabinoide para diversas funções no nosso organismo, incluindo o sistema imunológico.

São escassos os estudos sobre os efeitos do uso da Cannabis sativa no sistema imunológico durante a gestação e no desenvolvimento e na formação dos órgãos linfóides do concepto.

2.3 Δ^9 -THC, canabinoides e o sistema endocanabinoide (SEC)

A *Cannabis sativa* é composta por mais de 100 tipos diferentes de canabinoides. Dentre eles, o Δ^9 -THC é o componente psicoativo (TURNER et al., 1980; DEWEY et al., 1986), e foi isolado pela primeira vez há aproximadamente 50 anos (GAONI et al., 1964). Outros canabinoides também são conhecidos, como canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN). O CBD é muito utilizado medicinalmente e em estudos terapêuticos por não apresentar toxicidade (CARLINI et al., 1973; IZQUIERDO et al., 1973). Esses compostos atingem a corrente sanguínea e os níveis de absorção, através da fumaça oriunda da queima do cigarro de maconha, variam de 10% a 50% para Δ^9 -THC, 31% para CDB e 38% para CBN (GROTENHERMEN et al., 2003; CORRIGAN et al., 2008; RØDNER SZNITMAN et al., 2008).

Sítios de ligação “sensíveis a canabinoides”, identificados primeiramente no cérebro (MELVIN et al., 1987; DEVANE et al., 1988), foram denominados como receptores de canabinoides. Existem dois tipos de receptores de canabinoides: tipo 1 (CB1) (MATSUDA et al., 1990) localizado principalmente no sistema nervoso e tipo 2 (CB2) situado nos tecidos linfoides periféricos e centrais (medula óssea, timo, baço), amídalas, tonsilas, pâncreas e na retina (GRIFFIN et al., 1997; HOWLETT et al., 2002; HOWLETT et al., 2004; RODRIGUEZ DE FONSECA et al., 2004).

A identificação do mecanismo de ação do Δ^9 -THC ajudou na descoberta dos ligantes endógenos chamados endocanabinoides. O SEC (sistema endocanabinoide) é um sistema de sinalização lipídica, formado por moléculas oriundas de ácido aracídico anandamida (AEA) e 2-aracidoilglicerol (GRIFFIN et al., 1992; TANDA et al., 2003).

Estudos avaliaram que os canabinoides exógenos agem sobre os receptores agonistas desse sistema, alterando e suprimindo as funções de linfócitos (células T), e outras células imunes, como macrófagos e mastócitos (ROTH et al., 2002; PARK et al., 2003; PARK et al., 2004; CORRIGAN et al., 2008) que apresentam os receptores. O CB2, que se expressa fortemente em linfócitos B e NKs (células natural killer) foi clonado do baço por MUNRO et al. em 1993, onde foi expresso em macrófagos.

Na gestação complicações podem ser decorrentes, pois o CB1 é encontrado na placenta, e pode impedir a implantação embrionária. Há muitos outros estudos experimentais que mostram que os endocanabinoides são imunossupressores, inibem a proliferação de leucócitos, induzem a apoptose de células T e macrófagos e reduzem a secreção de citocinas (KLEIN et al., 1998; NAGARKATTI et al., 2009; KOZELA et al., 2013) .

Se por um lado os resultados de seus efeitos em alguns estudos (que avaliam os efeitos no sistema imunológico já formado e com canabinoides exógenos isolados) sejam vistos como uma contribuição para o uso medicinal dos canabinoides presentes na droga, por outro ficam dúvidas sobre os desfechos no desenvolvimento da imunidade na gestação e consequências nas células de defesa e na organogênese dos órgãos linfoides.

2.4 Desenvolvimento do sistema imunológico

O sistema imunológico desenvolve-se a partir de uma população de células tronco (ou hematopoiéticas pluripotentes) que surgem pela primeira vez no desenvolvimento da esplancnopleura (no 8º dia gestacional em camundongos). Essas células dão origem a todas as linhagens de células sanguíneas circulantes (das respostas imunológicas inatas e adaptativas). As células primitivas (precursoras) do saco vitelino migram para o fígado e medula óssea (células-tronco), que possui um compartimento permitindo a circulação dessas células no sangue e linfa, porém as mesmas são imunocompetentes (WEISSMAN et al.,2000).

Os órgãos linfoides, responsáveis pela diferenciação dessas células (entre eles, timo e baço), se desenvolvem no pré-natal a partir da interação entre células indutoras de tecido linfóide e as células estromais (VAN DE PAVERT et al., 2010). As células-tronco linfoides migram da medula óssea para o timo (órgão primário) onde sofrem diferenciação e maturação antes de migrarem para o sangue, linfa e secundariamente para os órgãos linfoides periféricos (secundários), e são chamados de linfócitos T (auxiliares ou helper, citotóxicos e supressores). As células-tronco precursoras da medula que não migram para o timo também se diferenciam e se multiplicam - linfócitos B, e caem na circulação. O início da resposta imunológica através da ativação dos linfócitos B ocorre no tecido linfóide do aparelho digestivo, nos linfonodos, no baço (em mamíferos). Os linfócitos B passam a habitar os órgãos linfoides periféricos, sangue e linfa e em conjunto com outras células imunes como macrófagos (que também se originam da medula óssea), células dendríticas, neutrófilos, e outras células, passam a produzir a resposta imunológica (LIMA et al., 1973; CUMANO et al., 2001).

O início da maturação das células-tronco em linfócitos é regulado por hormônios como corticosteroides e citocinas, tais como fatores estimuladores de colônias de células, e pode haver alguma modulação por conta da ação de drogas (HOLLADAY et al.,2000) como os canabinoides.

2.5 Desenvolvimento do timo

O timo é um órgão composto por uma rede de células epiteliais e células linfoides associadas e funciona como o centro de desenvolvimento de células T. Localizado na porção dorsal do tórax e na porção anterior da cavidade torácica em camundongos, sua estrutura anatômica é similar em camundongos e humanos. Envolvido por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, possui dois lobos, interligados pelo istmo e vários lóbulos divididos em duas áreas primárias, o córtex e medula (espaço epitelial tímico) (HOLSAPPLE et al., 2003; TREUTING et al., 2011).

O córtex é a região periférica, onde há linfócitos imaturos em proliferação, células epiteliais (com maior núcleo e cromatina) e também macrófagos. A medula contém células epiteliais (em sua maioria), dendríticas e linfoides maduras e podem-se encontrar também formas de estruturas queratinizadas chamadas de corpúsculos tímicos ou de Hassal, que são exclusivas desse órgão (HOLSAPPLE et al., 2003). A morfologia dessas estruturas em camundongos se difere de outras espécies e as áreas de hiperplasia medular podem aparecer após seis meses de idade. O espaço perivascular possui gordura e células linfoides maduras (mas não desenvolvem células T) e aumenta de tamanho com a idade ou outras reações (TREUTING et al., 2011).

O timo também produz fatores de desenvolvimento e proliferação de linfócitos T, como a timosina alfa, timopoetina, timulina e o fator tímico humoral, que agem no próprio timo (hormônios parácrinos) ou nos tecidos secundários (hormônios endócrinos), onde estimulam a maturação completa dos linfócitos (LANDRETH et al., 2002; TREUTING et al., 2011).

Em camundongos, o timo se desenvolve a partir das 3^o e 4^o bolsas faríngeas no 10^o dia de gestação e é colonizada por imigrar células estaminais hematopoiéticas no 11^o dia de gestação. A organogênese do timo em vertebrados depende das interações entre células da camada germinativa embrionária: epitélio derivado do endoderma, mesênquima da crista neural derivada da neuroectoderma e células hematopoiéticas e endoteliais de vasos sanguíneos derivadas do mesoderma. A fase precoce da organogênese (do 9.5^o ao 11^o dia embrionário) engloba posicionamento, indução e suplantação do

primórdio do timo, e é caracterizado pelas interações epiteliais-mesenchimatosas na ausência de timócitos (MANLEY et al., 2000).

A organogênese tardia (do 11.5º ao 15º dia embrionário) é principalmente relacionada com padronização e diferenciação do epitélio inicial e requer interações entre os três tipos de células que resultam na geração das diferentes regiões do primórdio do timo (cortical e medular) e o início da diferenciação epitelial. A fase tardia de desenvolvimento fetal (do 15.5º dia até o nascimento) é caracterizada pela rápida acumulação de timócitos CD4+ e CD8+ e o início da seleção positiva e negativa. Nesta fase, que também pode incluir a primeira semana pós-natal em camundongos, as células epiteliais tímicas adquirem funcionalidade competente completa, levando ao desenvolvimento do ambiente tímico (MANLEY et al., 2000).

As células estaminais hematopoiéticas pluripotentes ainda são encontradas no timo ao longo da gestação, porém, a maioria das células se diferencia no microambiente no timo para formar timócitos linfoides que expressam o complexo TCR (receptor de células T) e as proteínas da superfície celular específicas de TCR, CD3, CD4, CD8. Após a maturidade sexual, a produção de timócitos diminui, não existindo mais em indivíduos a partir de um ano de vida (SHORTMAN et al., 1998).

O timo, em camundongos, pode atingir um tamanho máximo (4-8% do peso corporal) em 3 a 6 semanas e sofrer gradualmente a atrofia relacionada à idade, embora diferenças entre machos e fêmeas sejam encontradas. Essa involução é caracterizada pelo esgotamento de linfócitos maduros no córtex, com aumento de alguns tipos de células medulares. A diminuição do peso tímico com a idade é relativamente sutil e a porcentagem de volume ocupada pelo espaço epitelial tímico é substituída por células adiposas e linfoides não tímicas que enchem o espaço perivascular do órgão (TREUTING et al., 2011).

2.6 Desenvolvimento do baço

Localizado no quadrante superior esquerdo do abdômen adjacente, abaixo do diafragma e na curvatura do estômago, o baço funciona como um grande filtro de sangue, mediando a resposta imunológica através da recirculação dos linfócitos (e migração dos linfócitos B da medula óssea através da circulação) e em camundongos serve como um sítio de hematopoese por toda a vida, respondendo a vários estímulos (agentes infecciosos, tumores, perda de sangue, entre outros). É um órgão revestido por matriz extracelular fibrilar (tecido conjuntivo), onde trabéculas suportam a vascularização maior e os ramos menores são formados por tecido linfoide (polpa branca) (CESTA et al., 2006; TREUTING et al., 2011)

A polpa branca e polpa vermelha são as áreas primárias desse órgão, sendo a polpa vermelha a região de filtração do sangue, com o auxílio dos cordões (onde são encontrados macrófagos) e sinusoides esplênicos. As ramificações de vasos arteriais do baço permitem que o sangue coletado nessa área seja transportado para a veia eferente, removendo plaquetas e eritrócitos envelhecidos da circulação (hemocaterese). Em roedores, alguns ramos arteriais terminam no seio marginal (entre polpa branca e zona marginal), enquanto outros formam o sistema venoso da polpa vermelha (MEBIUS et al., 2005; CESTA et al., 2006; TREUTING et al., 2011).

A artéria esplênica aferente se ramifica para as arteríolas centrais. Essas áreas (da polpa branca) consistem na zona dos linfócitos T (predominantemente CD4+), conhecida como bainha linfocitária periarteriolar (PALS), arteríolas e folículos de linfócitos B, segregados anatomicamente pela ação de citocinas (quimiocinas). As arteríolas terminam em cordões na polpa vermelha, de onde o sangue corre em seios venosos, que se acumulam na veia esplênica eferente. As artérias e veias maiores correm juntas em trabéculas do tecido conjuntivo, que são contínuas com a cápsula que envolve o baço (TREUTING et al., 2011).

Em camundongos, durante a embriogênese, é formada a placa esplênica (derivada da mesoderme) no 12º dia embrionário, que é o centro organizador para a formação do baço. Quando sua formação é defeituosa e não há proliferação de células, como pode ocorrer em camundongos (devido à deficiência de genes homeóticos), não há formação ou desenvolvimento do

baço. Fatores de transcrição gênicos, que já estão expressos no baço no 12º dia embrionário, são indispensáveis para sua formação (HOLSAPPLE et al., 2003).

No dia 13.5º embrionário, as células indutoras de tecido linfoide, que são identificadas fenotipicamente como células CD4+, CD3-, CD45+, já estão presentes e fornecem o sinal indutivo para o desenvolvimento de outros tecidos linfoides. As primeiras células que colonizam são progenitores das linhagens eritroide e mieloide. Sequencialmente, no 14.5º dia embrionário, as primeiras células estaminais hematopoiéticas mantêm-se no baço (LANDRETH et al., 2002; HOLSAPPLE et al., 2003).

O baço é o órgão responsável pela resposta aos antígenos de disseminação hematogênica (a partir dos linfócitos B que originam plasmócitos para secreção de anticorpos e células B de memória, estimulados pelos linfócitos T helper) e continua tendo reservas limitadas de células hematopoiéticas em toda gestação e na vida pós-natal, para apoiar o desenvolvimento das células mieloide e eritroide, caso a medula óssea seja danificada (MEBIUS et al., 2005; TREUTING et al. 2011).

3 JUSTIFICATIVA

O uso medicinal e recreativo da *Cannabis sativa* está em discussão em diversos países nos últimos anos, sendo que em alguns já há a descriminalização do uso recreativo e legalização do uso medicinal. Contudo, ainda não há dados suficientes que excluam todos os possíveis efeitos nocivos da droga quanto ao uso durante a gestação e suas consequências no desenvolvimento pós-natal. Soma-se a isso, o aumento significativo no número de mulheres gestantes usuárias de drogas ilícitas, incluindo a maconha e o limitado número de estudos que avaliam os efeitos desta droga sobre o desenvolvimento e função do sistema imunológico. Portanto, este estudo avalia as possíveis implicações do uso recreativo da maconha na gestação sobre o desenvolvimento de órgãos linfoides.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos da exposição gestacional à fumaça da queima da maconha sobre o desenvolvimento fetal e pós-natal, com ênfase no desenvolvimento do baço e timo da prole (neonatos e jovens adultos), utilizando um modelo realista que se aproxima das reais condições de uso desta droga por humanos (por via inalatória) sob os aspectos de dose e meio de exposição.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar por métodos estereológicos o desenvolvimento dos órgãos linfoides, baço e timo da prole após exposição gestacional à fumaça da maconha.
- Investigar por métodos histoquímicos potenciais mecanismos envolvidos nos efeitos da exposição à droga sobre os órgãos linfoides.
- Avaliar potenciais mecanismos fisiopatológicos e efeitos fetotóxicos nos timos e baços da prole.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais (Grupos experimentais)

Este estudo integra um projeto maior 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” (CEUA FMUSP n° 374/13) coordenado pela Dra. Mariana M. Veras. Os animais utilizados nos estudos são os mesmos, sendo os órgãos alvo do projeto diferentes. Parte dos resultados do projeto maior já estão publicados em BENEVENUTO et al. (2017) e também fundamentam este estudo.

6.2 Delineamento experimental

Neste estudo, utilizamos 20 camundongos fêmeas gestantes – CEUA FMVZ USP n°. 3311130716, que foram divididas em dois grupos (n= 10 fêmeas por grupo) as quais foram expostas durante o período gestacional à fumaça da queima da maconha ou ao ar filtrado (grupo controle). As exposições foram iniciadas no 5.5° dia de gestação (dpc ou DG) e terminada no 17.5° dpc^{1*}. As exposições foram iniciadas no 5.5° dpc, pois neste dia a implantação embrionária já está concluída e exposições anteriores a este período poderiam acarretar em índices elevados de perdas gestacionais.

No 18.5° dpc, metade das fêmeas de cada grupo, selecionadas aleatoriamente, foram eutanasiadas para coleta dos tecidos e órgãos dos fetos a termo. As demais foram mantidas em suas caixas para parir e cuidar de suas proles até o desmame. Após o desmame, os filhotes foram separados de acordo com o sexo e acompanhados até completarem 20 e 60 dias de vida (DPN) quando foram eutanasiados para coleta dos órgãos.

Durante todo o estudo, exceto nos períodos de exposição, os animais foram mantidos em estantes ventiladas (ar HEPA), com controle de temperatura, umidade e ciclo de luz claro e escuro de 12hs por 12hs. Comida e água foram fornecidos *ad libitum* e material para construção de ninho (algodão) e enriquecimento ambiental (rolinhos de papel e lenços de papel) foram

disponibilizados para todos os animais. Um esquema simplificado do estudo está apresentado na figura 1.

Figura 1: Representação esquemática do desenho experimental.

6.3 Droga (Substância teste)

A droga utilizada neste estudo foi doada pelo Delegado Seccional de Marília, autorizado pela 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais – Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília-SP, para fins de pesquisa. Trata-se de um único lote lacrado (Lacre nº 448187/08) pelo Núcleo de Perícias Médicas Legais do instituto de Criminalística de Marília- São Paulo, contendo 1,0 Kg da droga “*in natura*”. Foi realizada análise do material teste para identificar a porcentagem de Δ^9 -THC presente no mesmo. Essa análise foi realizada pelo Laboratório de Toxicologia Analítica da Universidade de Campinas em colaboração com o Prof. Dr. José Luis da Costa.

^{1*} O tempo de gestação em camundongos é de 19 a 21 dias dependendo da linhagem utilizada.

6.4 Aparato para inalação da fumaça da maconha

A *Cannabis sativa* possui uma taxa de absorção maior quando administrada via oral (cerca de 90 a 95%) e lenta (30 a 45 minutos) do que via inalatória (cerca de 50%) (5 a 10 minutos) (KALANT et al., 2011). Porém, a fim de simular a forma popular de uso, ou seja, por via inalatória, o modelo de exposição já descrito previamente por LICHTMAN et al. (2001) e JARDIM et al. (2010) foi adaptado e desenvolvido no LIM 05 – Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – HCFMUSP pela Dra. Mariana Matera Veras e pelo Engenheiro Marco Antônio G. Martins. O aparelho consiste em uma câmara da queima da maconha, uma de mistura e uma de exposição, onde os animais foram acondicionados individualmente para exposição somente via inalação² (Figura 2).

Nas exposições, foram utilizados cigarros preparados com 200 mg da droga e as exposições foram controladas por tempo, fluxo de fumaça e a concentração de CO₂.

Com base em estudos piloto determinou-se que 5 minutos de exposição eram suficientes para a queima dos 200 mg de Cannabis.

6.5 Protocolo de exposição

As fêmeas foram expostas à fumaça durante 5 minutos diariamente. A exposição foi controlada com base na concentração de CO₂ e a dose interna foi avaliada pela presença de Δ 9-THC na urina, onde se encontraram metabólitos (THC – COOH). A coleta da urina foi realizada sempre 24 horas após a exposição e de acordo com o protocolo de KHOSHO et al. (1985).

As dosagens dos metabólitos do Δ 9-THC na urina foram realizadas em parceria com o Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar do Instituto de Química – USP em colaboração com a Profa. Marina F. Maggi Tavares. Uma descrição detalhada da metodologia utilizada para detecção dos metabólitos do Δ 9-THC na urina pode ser encontrada em BENEVENUTO et al. (2017).

² Todo o procedimento de exposição foi conduzido em capela de pressão negativa de ar, com a finalidade de que o residual de fumaça tóxica produzida fosse totalmente exaurido para o ambiente externo.

Figura 2: Representação esquemática do sistema de geração e exposição dos animais experimentais à fumaça da queima da *Cannabis sativa* (BENEVENUTO et al., 2017).

6.6 Caracterização da exposição – HPAs na fumaça da maconha

A análise de detecção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs na fumaça proveniente da queima de *Cannabis sativa* foi conduzida pela técnica de cromatografia gasosa com detector de massa acoplado (GC-MS). Amostras da fumaça foram coletadas em quatro tubos adsorventes XAD (Orbo 32 – Supelco). O método de extração foi adaptado de LEE et al. (2004). Os compostos orgânicos foram extraídos com 10 mL de diclorometano utilizando o banho de ultrassom (3 ciclos - 20 minutos). O solvente extraído foi concentrado utilizando um evaporador rotativo e filtrado com uma membrana de filtro de seringa 33 mm (Millex).

Todas as amostras foram analisadas por GC/MS (7820A + 5975 MSD) (Agilent Technologies). As análises quantitativas e qualitativas foram realizadas em uma coluna corrente de fenil-metilo 5% inerte, VF (30m x 0,250mm, 0,25µm). 1µL de cada amostra foi injetado (injeção splitless). O programa de temperatura de aquecimento do GC foi de 80°C, por 4 min, aumentando 20°C/min até 200°C, após 4°C/min até 270°C e 5°C/min até 280°C. O gás transportador utilizado foi o hélio, em fluxo de 1,3 mL/min. A temperatura do injetor foi ajustada em 280°C, a linha de transferência para 300°C e a fonte de íons para 200°C. A curva de

calibração foi preparada com base em soluções padrão (Sigma-Aldrich) e os coeficientes de correlação para todos os HPAs foram $R^2 > 0,99$.

Foram analisados 14 tipos HPAs no estudo: Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, benz[a]antraceno, Criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, indenol[1,2,3-c,d]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]Perileno.

6.7 Coleta

As coletas dos baços e timos para este estudo foram realizadas no 18,5° dia (DG) (neonatos) e nos 20° dia e 60° dia pós-nascimento (DPN) que representam idades correspondentes a crianças e jovens adultos em humanos. No 18,5° DG parte das fêmeas do estudo (n=10) foram eutanasiadas para a coleta das placentas. Os fetos foram eutanasiados *in útero* por overdose de anestésico (Pentobarbital i.v (a.uterina) 200mg/kg peso). Para a coleta dos tecidos, a parede abdominal foi aberta, o útero exposto e os vasos uterinos ligados de forma a não permitir que o sangue contido na placenta fosse perdido. A outra parte das fêmeas (n=10) seguiu com a gestação, onde as proles foram cuidadas até o 20 DPN e 60 DPN, dias correspondentes às novas coletas. Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico inalatório (ISOFLURANO®) e após a coleta do sangue (imediatamente após confirmação do óbito, realizada a partir de punção da veia cava, pós-abertura da cavidade abdominal), os órgãos foram removidos, e fixados por imersão em paraformaldeído 4%. Após 24hs fixados, os tecidos foram transferidos para álcool 70% até serem processados para inclusão em parafina. O mesmo ocorreu com os neonatos utilizados no estudo.

6.8 Avaliação dos parâmetros reprodutivos

Os pesos médios dos timos e baços dos neonatos foram avaliados a fim de relacionar possíveis diferenças com a exposição gestacional à fumaça da queima de *Cannabis sativa*, semelhante ao apresentado em estudo anterior (BENEVENUTO et al. 2017). Os animais avaliados foram separados em dois grupos, exposto e controle, conforme tabela 1.

Tabela 1: Divisão dos grupos para avaliação do peso médio dos timos e baços dos neonatos.

	TIMO	BAÇO
Exposição		
Grupo CONTROLE	N = 21	N = 17
Grupo CANNABIS	N = 19	N = 17

6.9 Avaliação estereológica

A estereologia é um método bem estabelecido e utilizado para se obter dados relacionados a quantidades tridimensionais dos órgãos, como o volume, áreas de superfície e comprimento até mesmo de tecidos mais complexos. Para isso, são necessários cortes histológicos bidimensionais. A avaliação morfo-quantitativa do baço e timo das proles foi realizada utilizando-se essa técnica. Os animais (n=32) foram separados em 02 grupos principais (expostos e controles), levando em consideração outras duas variáveis, o sexo e a idade (tabela 2).

Foram avaliados os volumes totais dos órgãos e os volumes totais e as densidades de volume dos principais compartimentos dos órgãos em todos os animais.

Tabela 2. Divisão dos grupos para avaliação estereológica e histoquímica.

	Baço		Timo	
Idade/ Exposição	20 DPN	60 DPN	20 DPN	60 DPN
Controle	4 machos e 4 fêmeas	4 machos e 4 fêmeas	4 machos e 4 fêmeas	4 machos e 4 fêmeas
Exposto	4 machos e 4 fêmeas	4 machos e 4 fêmeas	4 machos e 4 fêmeas	4 machos e 4 fêmeas

6.9.1 Volumes e densidades de volumes do timo e do baço e seus respectivos compartimentos

Os volumes totais do timo e do baço e de seus respectivos compartimentos foram obtidos pelo Princípio de Cavalieri. Segundo este método, é possível estimar o volume de uma estrutura, cortando-a em fatias equidistantes e paralelas e medindo-se a área das faces de secção, sendo, portanto, o volume determinado pela seguinte fórmula:

$$V = \Sigma A * T$$

Onde T é a espessura das fatias e ΣA é a soma de todas as áreas das fatias produzidas.

Na avaliação, os volumes totais foram determinados de forma indireta por meio da equação:

$$v = m / d$$

Onde m representa a massa obtida em gramas e d a densidade específica (1,05 g/cm³). O volume absoluto de cada compartimento tímico e esplênico (córtex, medula, polpa branca e polpa vermelha) foi estimado indiretamente a partir da multiplicação do volume total do timo e/ou baço pela fração de volume (Vv) de cada compartimento. A fração de volume de cada compartimento foi obtida pelo método de contagem de pontos. Para isto um sistema teste de 63 pontos (a (p) = 0,5 mm²) foi sobreposto na série de cortes histológicos verticais obtidos dos blocos de parafina e observados utilizando-se uma objetiva de pequeno aumento (2,5X), de maneira que a amostra toda pudesse ser vista. Os pontos incidentes sobre cada compartimento foram contados para estimar a densidade de volume das duas zonas de cada órgão avaliado e, utilizando a equação:

$$Vv (\text{estrutura} / \text{esp.ref}) = P(\text{estrutura}) / P(\text{total})$$

Onde Vv é a fração de volume do componente (ex: córtex tímico) dentro de um espaço referência, no caso o timo como um todo; P (estrutura) é o número de pontos incidentes sobre o componente; P (total) é o número total de pontos sobre o espaço referência.

Assim, os órgãos foram processados e incluídos em parafina e cortes seriados de 5µm de espessura foram realizados com auxílio de um micrótomo rotativo até o seu esgotamento. Em intervalos constantes (1 corte a cada 200µm, ou seja, 1 a cada 40 cortes), 3 cortes consecutivos foram coletados em lâmina comum. A cada intervalo das séries foram coletados outros cortes consecutivos em lâminas silanizadas para a análise histoquímica (descrito no item 6.10).

Os cortes sequenciais (e sucessivos) obtidos para o estudo dos volumes dos compartimentos dos órgãos linfoides foram desparafinizados e corados pelo método de Hematoxilina-eosina (H.E). Após isso, as lâminas histológicas foram escaneadas (Pannoramic SCAN system 3D HISTECH - 4000-HCS-HCS_Brazil_11) e com o uso de softwares para microscópio virtual - Pannoramic Viewer e o software IMAGEJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>] para a geração dos sistemas testes de pontos (Figuras 3 e 4).

Figura 3: Fotomicrografia de corte histológico de baço em pequeno aumento com sistema de teste de pontos sobreposto utilizada para a análise do volume total e dos compartimentos (coloração H.E.). Software IMAGEJ.

Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico de timo em pequeno aumento com sistema de teste de pontos sobreposto utilizada para a análise do volume total e dos compartimentos (coloração H.E.). Software IMAGEJ.

6.9.2 Avaliação estereológica da medula e do córtex tímicos e das polpas branca e vermelha esplênicas

Figura 5: Fotomicrografias do timo em pequeno aumento (5 μm). Coloração H.E.

Figura 6: Fotomicrografias do timo em maior aumento (20 μm). Coloração H.E.

Figura 7: Fotomicrografias do baço em pequeno aumento (5 μ m). Coloração H.E.

Figura 8: Fotomicrografias do baço em maior aumento (20 μ m). Coloração H.E.

6.10 Avaliação das fibras do sistema colágeno

Realizamos a avaliação por métodos histoquímicos, utilizando-se a coloração Picrosírius Red. Essa coloração é específica para a visualização de fibras do sistema colágeno, aumentando a birrefringência deste material. Os grupos analisados foram os mesmos do estudo estereológico e a divisão para a leitura das lâminas também foi semelhante: dois grupos principais (expostos e controles), levando em consideração as variáveis sexo e idade, como apresentado anteriormente na tabela 2. As lâminas histológicas também foram escaneadas e analisadas com o uso dos mesmos softwares utilizados para avaliação estereológica (item 6.9.1).

A quantificação de fibras do sistema colágeno foi realizada por método semi quantitativo em cada um dos órgãos (timos e baços) e seus subcompartimentos conforme tabela a seguir. A quantificação foi realizada de acordo com 04 classes. Não foi realizada a diferenciação dos tipos de colágenos, apenas a sua quantificação, baseada na leitura de 10 campos por lâmina, seguindo o seguinte critério de evidência de fibras de colágeno: CLASSE 0 = nada, CLASSE 1 = pouco, CLASSE 2 = médio e CLASSE 3 = muito.

Tabela 3. Análise de fibras do sistema colágeno por área dos compartimentos tímicos e esplênicos.

Análise de fibras de colágeno por área dos compartimentos	
TIMO	BAÇO
Córtex	Polpa branca
Medula	Polpa vermelha
Vasos sanguíneos - grandes e pequenos	Vasos sanguíneos - grandes e pequenos
Corpúsculos de Hassal	Trabéculas
	Bainha linfocitária periarteriolar

6.10.1 Avaliação histoquímica para quantificação de fibras do sistema colágeno nos timos e baços

Figura 9: Ilustração da avaliação de fibras do sistema colágeno nos timos dos animais não expostos (A) e expostos (B) à *Cannabis sativa* na gestação (60 DPN). Na região da medula, podem-se observar os vasos sobrepostos na região de tecido perivascular (setas amarelas). Na região cortical, nota-se presença de fibras colágenas (setas brancas). Aumento 40X.

Figura 10: Ilustração da avaliação de fibras do sistema colágeno nos timos dos animais expostos (A) e não expostos (B) a *Cannabis sativa* na gestação (20 DPN) em maior aumento. Nota-se colágeno na zona medular e vaso interlobular na zona cortical (seta branca); Na zona medular (B), formações de corpúsculos de Hassal (setas amarelas). Aumento 20X.

Figura 11: Ilustração da avaliação de fibras do sistema colágeno nos baços dos animais expostos (A) e não expostos (B) à *Cannabis sativa* na gestação (20 DPN). As setas brancas apontam para áreas de trabéculas conjuntivas; a seta amarela aponta para um ramo de arteríola na área da polpa branca. Aumento 40X.

Figura 12: Ilustração da avaliação de fibras do sistema colágeno nos baços dos animais não expostos (A) e expostos (B) à *Cannabis sativa* na gestação (60 DPN) em maior aumento. As setas brancas apontam para áreas de trabéculas conjuntivas (mais direcionadas a polpa vermelha); as setas amarelas apontam para vasos da área da polpa branca. Aumento 20X.

6.11 Protocolos - Técnicas histoquímicas

6.11.1 Hematoxilina-Eosina

A técnica de coloração Hematoxilina-Eosina é uma das técnicas mais utilizadas na histologia e permite a visualização de constituintes celulares diversos, principalmente núcleo, citoplasma e tecido conjuntivo. O procedimento

adotado consiste em um método regressivo. As lâminas com os cortes histológicos foram posicionadas em suportes de coloração, seguindo a seguinte ordem de coloração: desparafinização em xilol (xileno) em dois banhos de cinco minutos; hidratação em soluções de etanol com concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%); lavagem em água corrente por cinco minutos; coloração com Hematoxilina de Harris por três minutos; lavagem em água corrente por dez minutos; contra coloração com passagem rápida (máximo dez segundos) em Eosina; lavagem em três mergulhos de água; desidratação até etanol absoluto (95%, 100% e 100%); e clarificação em xilol (xileno) até a montagem das lâminas. Os cortes corados com esse método foram utilizados para determinação dos compartimentos principais dos tecidos analisados (córtex e medula tímicos e polpas branca e vermelha esplênicas), através da visualização celular mais densa e nucleada e regiões citoplasmáticas, assim como células epiteliais.

6.11.2 Picrosírius Red

A técnica de coloração Picrosírius Red, para quantificação das áreas de colágeno, foi realizada da seguinte maneira: as lâminas foram dispostas em berços de coloração, desparafinizadas em xilol (xileno) em dois banhos de dez minutos. Após, foram hidratadas em soluções de etanol com concentrações decrescentes (100%, 96% e 70%) e lavadas em água corrente por dois minutos. O material foi então imerso em coloração de Picrosírius Red a 0,1% por 60 minutos e lavados em água corrente por cinco minutos. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por no máximo seis minutos (em testes realizados nos tecidos linfoides, determinou-se a metade desse tempo). Após, as lâminas passaram por lavagem em água corrente por dez minutos, desidratadas até etanol absoluto (70%, 96% e 100%) por três minutos cada. A clarificação foi realizada em xilol (xileno) e as lâminas montadas. O método é sensível e demonstra eficácia quanto ao estudo do colágeno, correlacionando tanto características histoquímicas quanto morfológicas, a fim de auxiliar o entendimento dessa molécula em estruturas teciduais.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software estatístico Statistical Package for Sciences Social (SPSS) versão 17.0 para as análises estatísticas. Médias, erros padrões (SE) ou desvios padrões (SD) foram calculados para cada uma das variáveis consideradas. A comparação entre os parâmetros avaliados no estudo foi realizada com análises univariadas e multivariadas, com a aplicação dos testes: MANOVA, para inspecionar a relação entre as variáveis dependentes e a presença de interação entre os fatores exposição, idade e sexo; CHI-SQUARE, para testar diferenças e a relação entre as variáveis X exposição em análise fatorial confirmatória e T-TEST ou MANN-WHITNEY, para amostras independentes, a fim de avaliar se a média da amostra difere significativamente de um valor hipotético, na comparação do parâmetro reprodutivo (peso).

A hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $p < 0,05$.

8 RESULTADOS

8.1 Avaliação do nível de Δ^9 -THC na amostra de *Cannabis sativa*

O nível de Δ^9 -THC detectado nas amostras de *Cannabis sativa* utilizada nas exposições foi de 0,3%.

8.2 Caracterização da exposição

As amostras de urina coletadas das mães gestantes permitiu a detecção e identificação da presença do THC-COOH (carboxi THC), que é o principal biomarcador da exposição à *Cannabis*. A detecção e identificação foi realizada pela confirmação da razão m/z THC-d3, 306, 374, 389; THC, 303, 315, 371, e 386 -COOH THC, 371, 372, 473, 488, e dos picos de intensidade pela técnica de espectrometria de massa.

8.3 Avaliação dos níveis de hidrocarbonetos presentes na fumaça

Para medir a concentração e determinar a caracterização de HPAs na fumaça proveniente da pirólise de *Cannabis sativa*, foram coletadas e analisadas quatro amostras durante o período de exposição. A tabela 4 apresenta os valores de concentração para cada tipo de HPA determinado em valores de média e desvio padrão (DP).

Tabela 4: Valores da Concentração de HPAs na fumaça de *Cannabis sativa* por cigarro queimado.

Caracterização de HPAs	Concentrações de HPAs na fumaça da <i>Cannabis sativa</i> (ng/cigarro)
HPAs	Média ± DP
Fluoreno	27,0 ± 20
Fenantreno	186,8 ± 47
Antraceno	194,8 ± 57
Fluoranteno	<LD
Pireno	215,4 ± 94
Benz[a]antraceno	45,0 ± 28
Criseno	100,8 ± 90
Benzo[b]fluoranteno	23,1 ± 27
Benzo[k]fluoranteno	27,6 ± 30
Benzo[e]pireno	141,5 ± 82
Benzo[a]pireno	5,5 ± 6
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6,6 ± 7
Dibenzo[a,h]antraceno	8,0 ± 6
Benzo[g,h,i]Perileno	28,4 ± 1
Peso (mg)	200
Volume de fumaça (L)/cigarro	1,00
BaPE*	1,26

*BaPE=BaA×0,06+B(b+k)F×0,07+BaP+DBA×0,6+InP×0,08 (Vasconcellos *et al.*, 2010). O índice benzo(a)pireno equivalente (BaPE) é calculado para avaliar o risco à saúde devido à exposição aos HPAs carcinogênicos. LD: limite de detecção.

8.4 Desfechos nas proles

Para avaliação do peso dos órgãos linfoides dos neonatos, foram utilizados 40 animais, onde foram obtidos os pesos médios de 40 timos e 34 baços. E para a análise do peso corporal, dos volumes relativos e totais do timo e do baço incluindo seus principais compartimentos, foram utilizados 32 animais com idades de 20 e 60 dias, machos e fêmeas em igual proporção (dados detalhados no item, tabela 1). Os resultados estão apresentados a seguir:

8.4.1 Peso dos timos e baços – Neonatos

O peso médio dos órgãos dos neonatos (tabela 1) não apresentou diferenças significativas entre os animais expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação, considerando os fatores exposição (apenas) e exposição e sexo. Entretanto, observa-se que há uma ligeira diminuição do peso, do baço e do timo, no grupo de neonatos exposto, conforme as figuras a seguir:

Figura 13: Gráficos de barras do peso médio dos timos dos neonatos, avaliados de acordo com a exposição gestacional à *Cannabis sativa* ($p=0,32$) (A) e exposição gestacional e sexo ($p=0,71$) (B).

Figura 14: Gráficos de barras do peso médio dos baços dos neonatos, avaliados de acordo com a exposição gestacional à *Cannabis sativa* ($p=0,58$) (C) e exposição gestacional e sexo ($p=0,84$) (D).

8.4.2 Peso corporal de jovens e adultos

Aos 20 dias de vida (20 DPN), os machos expostos à *Cannabis* durante a gestação apresentaram um peso corporal menor e aos 60 dias de vida (60 DPN) um peso aumentado quando comparado aos animais não expostos. A análise das fêmeas quanto ao peso mostra resultados similares (figura 15).

Os dados demonstram que a exposição gestacional à *Cannabis sativa* durante a gestação provoca em um primeiro momento uma redução do peso, porém com o avanço da idade a condição inverte para um peso aumentado.

Figura 15: Gráfico de barras do peso corporal médio nos animais estudados de acordo com idade, exposição à *Cannabis sativa* e sexo ($p=0,0001$) (A) e gráficos de interação mostrando o efeito da exposição e da idade sobre o peso médio corporal dos machos (B) e fêmeas (C) expostos gestacionalmente à *Cannabis sativa* ($p=0,01$).

8.4.3 Volume total do timo (mm³)

O volume total do timo apresentou variações significativas relacionadas à exposição. Os animais com 20 DPN (tanto os machos quanto as fêmeas) expostos à *Cannabis* apresentaram o volume tímico maior em relação aos animais controle e aos mais velhos (figura 16). Nos animais com 60 dias (adultos) o volume foi menor em comparação ao dos animais controle, também independente do sexo, mas mais expressivo nos machos.

Figura 16: Gráfico de barras do volume total médio do timo (mm³) dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,004$) (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos (B) e fêmeas (C) sobre o volume total do timo ($p=0,007$).

8.4.4 Volumes totais da medula e do córtex do timo (mm³)

O volume medular dos timos dos machos expostos à *Cannabis* na gestação foi maior nas proles com 20 DPN em relação aos animais controle, enquanto que nos com 60 DPN o volume foi expressivamente menor, conforme figura 17. Nas fêmeas expostas com 20 DPN, o volume medular tímico se apresentou maior em relação às fêmeas controles, e nas fêmeas com 60 DPN não houve diferenças entre os grupos.

Figura 17: Gráfico de barras do volume total médio da medula (mm³) dos timos dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,04$) (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos (B) e fêmeas (C) sobre o volume total da medula do timo ($p=0,07$).

Em relação ao córtex, nos machos expostos com 20 DPN, o volume foi maior e já nos de 60 DPN esse volume foi em média 2 vezes menor que o volume dos animais controle (figura 18). Nas fêmeas, os resultados foram similares, expostas de 20 DPN com volume maior e expostas com 60 DPN com volume menor do córtex (Figura 18 C), mas menos expressivo em comparação aos machos.

Figura 18: Gráfico de barras do volume total médio do córtex (mm³) dos timos dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,002$) (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume total do córtex do timo de machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,005$).

8.4.5 Fração de volume da medula e do córtex do timo (%)

Os resultados relacionados ao volume fracional da medula (%) e córtex (%) dos timos nas proles expostas e controle de diferentes idades não apresentou diferenças quando comparados, apesar do volume medular nos animais com 20 DPN e 60 DPN expostos ter sido relativamente maior ao dos controles (figuras 19) e o volume cortical ter se apresentado menor nos machos com 60 DPN expostos (figuras 20). E mesmo quando relacionados individualmente, esses volumes se apresentam proporção semelhantes nos animais expostos e não expostos durante a gestação, em ambas as idades.

Figura 19: Gráfico de barras do volume fracional médio da medula (%) dos timos dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,45$). (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional da medula do timo de machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,72$).

Figura 20: Gráfico de barras do volume fracional médio do córtex (%) dos timos dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,45$) (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional do córtex do timo de machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,72$).

8.4.6 Volume total do baço (mm³)

O volume total do baço dos animais expostos e não expostos à *Cannabis sativa* durante a gestação apresentou algumas diferenças em relação à idade. Nos machos com 20 DPN, não houve diferença quanto à exposição, já na idade com 60 DPN, os machos expostos apresentaram um volume menor do baço em comparação aos machos controles (figura 21). Nas fêmeas não houve diferenças.

Figura 21: Gráfico de barras do volume total médio do baço (mm³) dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,004$). (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume total do baço em machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,05$).

8.4.7 Volumes totais das polpas branca e vermelha (mm³)

O volume total da polpa branca nos machos com 20 DPN foi menor nos expostos à *Cannabis* em relação aos não expostos, mas não tão expressivo e estatisticamente significativo como a diferença observada nos animais com 60 DPN. Já nas fêmeas expostas com 20 DPN, o volume foi maior em relação às controles e menor também nas mais velhas. Com isso, nota-se que nos animais com 60 DPN expostos à *Cannabis* na gestação, apresentam um de volume de polpa branca menor quando comparados aos controles, sendo mais evidente nos machos (figura 22).

Figura 22: Gráfico de barras do volume total médio da polpa branca (mm³) dos baços dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,0001$) (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição em machos (B) e fêmeas (C) sobre o volume total da polpa branca do baço ($p= 0,05$).

O volume total da polpa vermelha nos machos expostos e não expostos com 20 DPN não apresentou variação significativa. Já os machos expostos à *Cannabis* com 60 DPN apresentaram volume menor em relação aos animais não expostos (figuras 23). Os volumes da polpa vermelha dos baços das fêmeas de ambas as idades também não apresentaram variações significativas em relação à exposição.

Figura 23: Gráfico de barras do volume total médio da polpa vermelha (mm³) dos baços dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,02$). (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume total da polpa vermelha do baço em machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,07$).

8.4.8 Fração de volume das polpas branca e vermelha do baço (%)

A proporção dos volumes fracionais da polpa branca nos machos expostos e não expostos à *Cannabis* durante a gestação e de ambas as idades não apresentou variações. Porém, nota-se que as fêmeas com 20 DPN expostas na gestação, apresentam proporção de volume maior em relação às fêmeas controles. Nas fêmeas com 60 DPN, uma diferença significativa na proporção volume não foi observada (figuras 24 e 25).

Figura 24: Gráfico de barras do volume fracional médio da polpa branca (%) dos baços dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,02$) (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional da polpa branca do baço em machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,5$).

A proporção dos volumes de polpa vermelha nos machos expostos, de ambas as idades, foram em média, similares. Nas fêmeas com 20 DPN expostas à *Cannabis* em relação às controles, o volume foi menor. Com 60 DPN, não houve diferença marcante. Uma observação curiosa é que a fração de volume das polpas branca e vermelha nas fêmeas expostas não variou com a idade (Figuras 24 e 25 C).

Figura 25: Gráfico de barras do volume fracional médio da polpa vermelha (%) dos baços dos animais expostos à *Cannabis sativa* e ao ar filtrado durante a gestação de acordo com a idade e o sexo ($p=0,02$). (A) e gráficos de interação dos fatores idade e exposição sobre o volume fracional da polpa vermelha do baço em machos (B) e fêmeas (C) ($p=0,5$).

8.5 Análise de fibras do sistema colágeno

Sob microscopia de luz, para os dois grupos do estudo, expostos e controles, machos e fêmeas, separados por idade - 20 DPN (n=16) e 60 DPN (n=17) foram avaliadas semi quantitativamente a presença de fibras do sistema colágeno os seguintes compartimentos:

a) nos timos: áreas corticais e medulares, vasos maiores e menores situados na região de tecido perivascular; nos septos interlobulares, (que se ramificam na junção corticomedular para suprir o córtex e a medula); na periferia da medula (região corticomedular); e circundante aos corpúsculos tímicos ou de Hassal (formações de tamanhos e formas muito diversas, com células ou restos celulares degenerados agrupados e enrolados).

b) nos baços: áreas de polpa branca (região de folículos linfoides) e polpa vermelha (presença de cordões e sinusoides esplênicos); vasos maiores e menores, denominados artérias ou arteríolas derivadas da artéria esplênica; trabéculas do estroma, formado por fibras reticulares, que serve de passagem para os vasos; bainha linfocitária periarteríolar (PALS), formada pela junção de linfócitos, artérias e arteríolas esplênicas.

Os resultados observados estão descritos a seguir:

8.5.1 Zona cortical tímica

A região cortical tímica nos animais com 20 DPN expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação, apresentou pouca presença de fibras colágenas (classe 1), sendo mais expressiva nos animais não expostos. Porém, apenas animais nos expostos observamos quantidades maiores (classe 2) dessas fibras (figura 26).

Figura 26: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno no córtex tímico dos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,038$).

Figura 27: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno no córtex tímico dos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,02$).

O mesmo foi observado nos animais com 60 DPN, onde a região cortical nos animais não expostos à *Cannabis sativa* na gestação, também apresentou pouca presença de fibras colágenas (classe 1). Novamente observa-se um maior número de animais expostos na classe 2, o que significa maior presença de fibras relacionadas ao sistema colágeno por exposição (figura 27).

8.5.2 Zona medular tímica

A região da medula dos timos analisados nos animais com 20 DPN expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação, continha fibras colágenas em baixa (1), média (2) e maior (3) quantidades, mas não foram apresentadas diferenças significativas entre os grupos expostos e controle.

Observa-se uma maior evidência de colágeno na medula tímica dos animais expostos, quando analisada por quantidade (classe 3) (figura 28).

Figura 28: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na medula tímica dos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação (p=NS).

Figura 29: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na medula tímica dos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação (p=NS).

Observamos fibras do sistema colágeno na região da medula dos animais com 60 DPN, tanto nos animais expostos à *Cannabis sativa* na gestação, quanto nos que não foram expostos. Nos animais controles, há uma menor presença (classe 1 e 2). Já nos expostos, a quantidade de colágeno nas classes 2 e 3 é maior (figura 29), mas não foram observadas diferenças significativas.

8.5.3 Vasos grandes – Tecido perivascular e septos interlobulares do timo

Nestas regiões, observamos que há a presença de fibras do sistema colágeno em todos os animais e em ambas as idades. Entretanto, nossos resultados mostram que a exposição somada à idade faz com que haja um acúmulo maior na parede e região perivascular dos vasos maiores nos indivíduos expostos (figura 30 e 31).

Figura 30: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos típicos maiores nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,5$).

Figura 31: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos típicos maiores nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

8.5.4 Vasos pequenos – Tecido perivascular e septos interlobulares do timo

A evidência de fibras colágenas nos vasos menores foi semelhante ao que foi observado nos vasos maiores (figuras 32 e 33).

Figura 32: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos típicos menores nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,5$).

Figura 33: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos típicos menores nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

8.5.5 Corpúsculos tímicos ou de Hassal – Região medular tímica

Ao analisar a área medular, além da predominância de células epiteliais, podemos encontrar corpúsculos tímicos. A avaliação da deposição de fibras de colágeno nessa área mostra uma reduzida presença e sem diferenças entre os grupos com 20 DPN (figura 34). Na avaliação dos animais com 60 DPN, os dados foram semelhantes, sem significância estatística, como apresentado na figura 35.

Figura 34: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos corpúsculos tímicos na região de epitélio da medula tímica nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,5$).

Figura 35: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos corpúsculos tímicos na região de epitélio da medula tímica nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,665$).

8.5.6 Polpa branca esplênica

A área da polpa branca do baço apresentou deposição de fibras do sistema colágeno nas três classes avaliadas (classes 1, 2 e 3) nos animais com 20 DPN expostos e não expostos à *Cannabis* na gestação. Apenas um animal exposto apresentou quantidade de fibras de colágeno a mais em comparação ao grupo controle, mas sem diferenças significativas.

Nos animais com 60 DPN, apesar de haver apenas animais expostos que apresentaram fibras colágenas na classe 3, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (figura 37).

Figura 36: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa branca do baço nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

Figura 37: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa branca do baço nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

8.5.7 Polpa vermelha esplênica

A polpa vermelha do baço, maior área do parênquima esplênico, apresentou fibras do sistema colágeno nas classes 2 e 3 nos animais com 20 DPN expostos e não expostos à *Cannabis* na gestação (figura 38). Quase todos os animais com 60 DPN apresentaram colágeno classe 3 na área de polpa vermelha, mas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (figura 39).

Figura 38: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa vermelha do baço nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,767$).

Figura 39: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na área de polpa vermelha do baço nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,5$).

8.5.8 Vasos grandes – Cordões e Sinusoides esplênicos

Observamos fibras do sistema colágeno nas classes 1 e 2 nos vasos derivados da artéria esplênica nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis* na gestação (figura 40), sem diferenças entre os grupos. O mesmo foi observado nos animais mais velhos (60 DPN), porém as três classes de colágeno foram notadas (figura 41).

Figura 40: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos grandes (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,5$).

Figura 41: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos grandes (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

8.5.9 Vasos pequenos – Cordões e sinusoides esplênicos

A frequência de animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis* na gestação que apresentaram fibras do sistema colágeno (classe 2) nos vasos pequenos derivados da artéria esplênica, foi proporcionalmente idêntica (figura 42). Nos animais com 60 DPN, houve uma pequena variação quando comparados os grupos por exposição (figura 43), com deposição de fibras de colágeno nas classes 1, 2 e 3, mas sem diferenças significativas.

Figura 42: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos pequenos (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

Figura 43: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nos vasos pequenos (cordões e sinusoides esplênicos) no baço nos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

8.5.10 Trabéculas – Estroma esplênico

Na avaliação das trabéculas no estroma do baço dos animais de 20 DPN, foram observadas fibras do sistema colágeno nas classes 2 e 3 nos grupos exposto e controle (figura 44), havendo uma maior frequência de animais expostos com uma maior deposição, mesmo sem diferenças estatísticas.

Figura 44: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nas trabéculas do estroma esplênico dos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,141$).

Figura 45: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno nas trabéculas do estroma esplênico dos animais com 60 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,041$).

Em relação aos animais com 60 DPN, observou-se um aumento significativo de fibras do sistema colágeno na maior parte dos animais analisados (figura 45), sendo que estes foram expostos à *Cannabis sativa* na gestação.

8.5.11 Bainha linfocitária periarteriolar esplênica (PALS)

A análise de fibras do sistema colágeno na região da bainha linfocitária periarteriolar também foi realizada. Nos animais com 20 DPN, (figura 46) nota-se colágeno nas classes 1 e 2, com uma frequência proporcionalmente igual nos animais expostos (figura 46). Nos animais com 60 DPN também foi observada uma proporcionalidade na evidência de colágeno nas classes 1, 2 e 3 e entre os grupos, mas sem diferenças estatísticas (figura 47).

Figura 46: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na bainha periarteriolar (PALS) nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=0,141$).

Figura 47: Distribuição da frequência de acordo com as classes de colágeno na bainha periarteriolar (PALS) nos animais com 20 DPN, expostos e não expostos à *Cannabis sativa* na gestação ($p=NS$).

9 DISCUSSÃO

A exposição gestacional (via inalação materna) a fumaça proveniente da pirólise da *Cannabis sativa* provoca alterações no desenvolvimento dos órgãos linfoides da prole exposta. Neste estudo nossos resultados mostram que os filhotes gerados por mães expostas a maconha apresentam diferenças no peso e estrutura do baço e timo. Os desfechos avaliados sugerem também que há um efeito dependente do sexo e principalmente da idade.

Neste estudo nosso foco foi avaliar a prole, entretanto o uso da maconha na gestação gera preocupações e riscos em dois indivíduos distintos, a mãe e o concepto (GUNN et al., 2016).

A utilização de maconha para fins recreativos gera grandes discussões devido aos seus efeitos fetotóxicos ainda não serem bem conhecidos e por ser a droga ilícita mais consumida entre gestantes em diversos países. Apesar de recentemente estudos avaliarem com mais frequência os seus efeitos, visto o aumento de usuários em todo o mundo, a continuidade dessas avaliações ainda é um passo de grande importância em termos de saúde pública. Nas revisões atuais sobre o tema “gestação e uso da maconha” é possível notar a carência de estudo mais elaborados e sem interferências de exposição a outras substâncias, tais como tabaco e álcool, que confundem os achados (NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE et al., 2017)

Estudos experimentais em camundongos mostraram que a exposição aguda e crônica ao Δ^9 -THC (com injeção intraperitoneal da substância), resultou em alterações na função imunológica (BHARGAVA et al., 1996). Em um deles, sugere-se que a diminuição dos linfócitos T e B devido ao aumento da mortalidade de doença bacteriana e viral nos animais cronicamente expostos à substância, indicando que a resposta celular e humoral à infecção foi reduzida (MASSI et al., 1996).

Muitos são os estudos que avaliam os efeitos da *Cannabis sativa* no período gestacional, e em todos são descritos desfechos negativos, sejam embriotóxicos ou fetotóxicos. Porém, ainda são encontradas muitas controvérsias, possivelmente geradas devido aos diferentes tipos de exposição, dosagem da droga, uso concomitante com outras drogas ilícitas (o mais comum),

e até mesmo por levantamentos ou relatos que podem ter lacunas ou informações incompletas.

No presente estudo, avaliamos os impactos da exposição gestacional via inalação da fumaça oriunda da queima de *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento do baço e timo em proles de diferentes idades. Em nosso modelo experimental buscamos simular a forma mais comum de uso da droga, o fumo, diferente de outros estudos experimentais disponíveis que utilizam injeções intraperitoneais ou gavagem oral de Δ^9 -THC.

É importante ressaltar que os efeitos observados em nosso estudo não podem ser atribuídos restritamente a um único composto presente na *Cannabis sativa* e, devem ser considerados como consequência da exposição a uma mistura de substâncias químicas presentes na fumaça, como NO, NOx, CO, cianeto de hidrogênio, aminas aromáticas, amônia, tolueno, benzeno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (MOIR et al., 2008). A análise de hidrocarbonetos na fumaça produzida em nosso estudo mostrou que há HPAs sabidamente carcinogênicos e embriotóxicos.

O estudo do desenvolvimento dos órgãos linfoides é essencial para entendermos como os componentes do sistema imunológico reagem quando expostos a substâncias tóxicas e também avaliarmos possíveis alterações nas respostas imunológicas precoces e tardias (ROTH et al., 2006). Por esse motivo, avaliamos a estrutura do timo e do baço de filhotes, em diferentes idades, cujas mães inalaram fumaça decorrente da queima da maconha no período gestacional.

Nossos resultados mostram que os efeitos apresentam diferenças dependentes do sexo do animal em algumas das análises realizadas. Os nossos achados indicam que os machos são mais susceptíveis aos efeitos. Isto já havia sido percebido em um estudo anterior, que mostrou que os machos, filhos de mães expostas à maconha na gestação apresentam baixo peso ao nascer associada a um aumento no volume e peso da placenta (BENEVENUTO et al., 2017).

Uma associação semelhante pôde ser feita ao observar os efeitos nos órgãos nos neonatos expostos, que apresentaram decréscimos significativos nos pesos dos pulmões, cérebro, fígado e timo (BENEVENUTO et al., 2017). Apesar de no presente estudo não terem sido observadas essas mesmas alterações

significativas no peso dos timos e baços dos neonatos, foi notada uma tendência na diminuição do peso dos baços. Possivelmente, no estudo de BENEVENUTO et al., 2017 esta diferença se deva ao fato dos autores terem considerado machos e fêmeas na mesma análise de peso. Em nosso estudo os pesos foram considerados de acordo com o sexo dos animais.

Em relação ao peso corporal das proles, verificamos que os animais com 60 DPN cujas mães foram expostas na gestação, são mais pesados que os animais controle, apesar de na infância (20 DPN), os animais mostrarem um peso menor. Este maior peso pode ser explicado de diversas formas, mais estudos ainda são necessários para entender esta associação. Podemos especular com base nas evidências disponíveis na literatura que crianças que apresentam baixo peso ao nascer têm maiores chances de apresentar sobrepeso quando adultas, ou que o maior peso poderia estar relacionado às propriedades estimulantes do apetite que a droga apresenta (DI MARZO et al., 2005).

Estudos prévios (WILLIAMS et al., 1998; WILLIAMS et al., 2002) indicam que a exposição gestacional altera a expressão dos receptores de canabinoides, principalmente o CB1 e os seus ligantes endógenos (anandamida e 2-araquidonilglicerol) e que estão envolvidos no equilíbrio energético em mamíferos. E esta alteração poderia aumentar o armazenamento de energia no tecido adiposo e reduzir o gasto energético (DI MARZO et al., 2011). Porém, diferente do nosso estudo, estes trabalhos utilizaram exposição via oral ou injeção intraperitoneal ao Δ^9 -THC e até mesmo a anandamina.

Além disso, são poucos os estudos que avaliam as consequências tardias, em jovens e adultos, decorrentes da exposição pré-natal destes indivíduos à maconha. As interferências ocorridas nesse período da vida sejam por questões genéticas, metabólicas ou ambientais, podem ser determinantes para desfechos mais tarde na vida adulta.

Em humanos, um dos únicos estudos que avaliou a associação entre uso da maconha e ganho de peso (adolescentes do sexo masculino), não encontrou nenhuma associação do uso de maconha com alterações do peso corporal (JIN et al., 2017).

Em BENEVENUTO et al (2017), camundongos fêmeas gestantes expostas à fumaça da maconha apresentaram um aumento na ingestão de alimento ao

final da gestação, o que pode ser mais um indício do estímulo do apetite que a droga apresenta.

Além das alterações no peso dos órgãos linfoides dos neonatos e do peso corporal das proles correspondentes jovens e adultos, observamos que a exposição gestacional à fumaça da *Cannabis sativa* é capaz de provocar alterações na estrutura interna do timo e do baço.

Morfologicamente, o timo dos animais, cujas mães “fumaram” maconha mostrou inicialmente um volume maior e com o avanço da idade progrediu para um decréscimo significativo no seu volume total. Esta redução no volume se dá por uma diminuição significativa do córtex do timo. O córtex do timo é a área de maturação e proliferação dos linfócitos T, e outras células de importância para o sistema imunológico (HOLSAPPLE et al., 2003), portanto esta diminuição de seu volume precocemente pode implicar em prejuízos na defesa imunológica do animal. Em conjunto a essa redução, observou-se também um aumento de fibras do sistema colágeno na zona cortical e também na medular.

A involução tímica relacionada com a idade correlaciona-se diretamente com a declinação da timopoiese, porém em camundongos essa involução ocorre em média aos 3 meses (GUI et al., 2012), e no presente estudo avaliamos animais com 20 e 60 dias de idade.

O desenvolvimento tímico e sua programação sofrem influências genéticas e também ambientais e é muito sensível aos eventos iniciais durante os períodos pré e pós-natal e em longo prazo podem determinar efeitos que se manifestam na vida adulta. Um estudo *in vivo* e *in vitro*, com camundongos tratados com hormônios esteroides, para avaliação de células do estroma tímico e da expressão dos componentes da matriz extracelular, demonstrou que a expressão de proteínas nessa região do timo é modulada durante o desenvolvimento embrionário, na vida adulta, durante o envelhecimento e em condições autoimunes. Hormônios podem modular uma variedade de proteínas expressas no microambiente tímico (células epiteliais tímicas), compreendendo hormônios tímicos, citoqueratinas e proteínas da membrana basal (LANNES-VIEIRA et al., 1991).

Com isso, acreditamos que as exposições à *Cannabis* durante a gestação podem ter contribuído em uma modulação hormonal e conseqüentemente na diminuição do volume tímico em longo prazo. Também, os machos obtiveram

maior ganho do peso corporal que pode estar associada à involução tímica. Estudos associam o ganho de peso corporal e acúmulo de gordura com uma rápida involução tímica; tanto a ingestão calórica excessiva quanto a obesidade são fatores que aceleram a involução do timo, o que poderia explicar nossos achados (GUI et al., 2012).

O baço dos animais expostos também apresentou alterações. O seu volume total foi menor nos machos (principalmente) e nas fêmeas com 60 DPN que foram expostos à *Cannabis* durante a gestação, sugerindo uma menor atividade imunológica e hematopoiética já que o órgão reserva células hematopoiéticas que auxiliam o desenvolvimento das células mieloide e eritroide, além de contribuir ativamente na resposta imunológica humoral ao longo da vida (TREUTING et al., 2011).

Os volumes totais da polpa branca do baço, área com grande importância imunológica, onde ocorre a síntese dos linfócitos T indispensável para a imunidade humoral apresentou uma redução do volume nos machos e nas fêmeas de 60 DPN. Nos volumes fracionais, não foi significativo, mas ao observar o volume absoluto, foi menor nos machos e nas fêmeas com 60 DPN.

Os volumes fracionais da polpa vermelha, não apresentaram diferenças expressivas em relação aos animais expostos e não expostos à *Cannabis* na gestação. Quando observamos esses volumes totais, nos machos expostos de 60 DPN ele se apresenta menor em relação aos animais controle, mas esses animais apresentaram também um menor volume do órgão total, sugerindo uma possível diminuição em sua função, pela ação da *Cannabis sativa* durante a gestação.

Os resultados observados indicam que tanto o timo quanto o baço tem seu desenvolvimento alterado pela exposição gestacional a *Cannabis*, mas ainda não é possível saber se os efeitos são diretos ou indiretos e se essa diminuição nos volumes dos órgãos está associada a perda de células por apoptose ou por um efeito antiproliferativo das células (ELMORE, 2006).

Em estudo realizado por MCKALLIP et al. (2002), a exposição ao Δ^9 -THC induziu a apoptose em linfócitos do timo e baço de camundongos, sendo esta regulada por CB2 e ocasionando na redução da celularidade nesses órgãos. Porém, a metodologia utilizada nesse e na maioria dos estudos isolam este

canabinoide para avaliar os seus efeitos, não sendo similar às reais condições do uso recreativo da droga, como em nosso estudo.

A avaliação da presença e disposição das fibras de colágeno no baço e no timo permitiu verificar que há um aumento no córtex tímico (20 DPN e 60 DPN), e entre as trabéculas do baço (60 DPN) dos animais expostos à *Cannabis sativa* durante a gestação. No córtex tímico há um acréscimo de colágeno intersticial entre os vasos menores, apesar da avaliação em geral dos vasos ter sido também realizada em todo o órgão e não ter apresentado alterações entre os grupos. Os vasos tímicos localizados nessa região do órgão possuem células reticulares epiteliais que influenciam na mediação da passagem dos linfócitos e sangue para a medula (WEISS, 1963).

Já é descrito que o volume ocupado pelo espaço epitelial tímico após sua involução é substituído por células adiposas e linfóides não tímicas que preenchem o espaço perivascular do órgão (TREUTING et al., 2011). Porém, as diferenças observadas são comparadas de acordo com a exposição gestacional; com isso, acreditamos que um aumento de fibras colágenas na região do córtex do timo (que apresenta esses vasos) nos animais que sofreram exposição pré-natal, possa interferir na passagem de linfócitos e de outras células imunes.

Assim como nas zonas corticais do timo, observamos um acréscimo de fibras do sistema colágeno nas trabéculas parenquimatosas, que formam o estroma do baço, nos animais com 60 DPN expostos à *Cannabis sativa* na gestação. As trabéculas são importantes por formarem uma ligação entre as duas principais regiões do órgão (polpas branca e vermelha), pois constituem cordões e sinusoides esplênicos que se ramificam pelo órgão, e que acabam formando as bainhas linfocitárias periarteriolas na região da polpa branca. O acréscimo de fibras do sistema colágeno no baço pode ocorrer para reparar danos ocasionados por processos inflamatórios ou por alguma lesão na cápsula ou parênquima do órgão (SUTTIE, 2006) e pode ser induzida por uma variedade de substâncias químicas ou tóxicas (GOODMAN et al., 1984). Com isso, podemos especular que a exposição gestacional à *Cannabis sativa* pode ter provocado tais alterações.

Em complemento, é descrito que pode haver decréscimos na bainha linfocitária periarteriolar (PALS) após exposição a substâncias tóxicas (ELMORE S.A, 2006). PALS são localizadas na polpa branca do baço, e assim como

observamos a redução do volume total dos baços dos animais expostos, essa mesma região se mostrou significativamente reduzida nesses mesmos animais.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram diferenças significativas, que podem ser achados importantes na complementação de possíveis novas alterações no sistema imunológico de indivíduos que sofreram exposição pré-natal a *Cannabis sativa*. Isso porque tanto o período pré-natal quanto o pós-natal são os principais momentos de maturação, desenvolvimento e constituição de órgãos linfoides, principalmente o timo, que é fundamental para a integridade do sistema imunológico (GORDON e MANLEY, 2011).

Apesar da importância de se considerar o estado nutricional (não foi realizado o acompanhamento do consumo diário de ração), carga de antígenos, lesões espontâneas individuais, carga de hormônios esteroides e estresse dos animais (ELMORE S.A, 2018), as alterações encontradas servem como uma contribuição para futuras avaliações relacionadas à imunotoxicidade da droga sob os órgãos linfoides.

Nossos achados corroboram entre si, o volume do córtex do timo (responsável pela proliferação e diferenciação das células T) está diminuído nos animais expostos; nestes mesmos animais observamos uma diminuição na polpa branca do baço, área de ativação dos linfócitos B provenientes da circulação e que aglomera células apresentadoras de antígenos, células NKs e linfócitos T e um acréscimo de fibras do sistema colágeno em um dos principais compartimentos tímicos (córtex) e nas trabéculas esplênicas, o que nos permite sugerir que há uma diminuição na migração dos linfócitos para o baço com potencial prejuízo da resposta imunológica nestes indivíduos.

Estudos experimentais realizados há décadas, que utilizaram modelos animais, já apontavam que a *Cannabis sativa* é capaz de provocar imunomodulação e isso pode causar alterações qualitativas e quantitativas em órgãos linfoides, sendo um importante meio de investigação patológica, no caso de alterações histológicas (celulares ou na arquitetura do órgão), sendo possível apontar se uma substância química causa ou não supressão ou aprimoramento da resposta imune, mesmo não havendo um aprofundamento na função imunológica.

A formação dos órgãos linfoides inicia-se na vida embrionária e fetal e sua maturação só ocorre após o nascimento. Desta forma, a ação de substâncias

teratogênicas pode provocar uma redução na população linfocitária do baço, devido a fatores bloqueadores que podem interferir na proliferação linfocitária de órgãos primários como o timo.

Além disso, a escassez de estudos relacionados à imunotoxicidade da maconha durante o período gestacional gera ainda uma maior preocupação por ser um período de alterações fisiológicas e imunológicas no feto e na mãe e que pode acarretar em danos tardios, podendo haver até o agravante de uma associação com o ambiente, sendo ainda mais difícil se tirar conclusões sobre os seus reais efeitos.

10 CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados obtidos demonstram que a exposição gestacional por inalação à fumaça da queima da *Cannabis sativa* causa efeitos fetotóxicos que podem ser observados por alteração no baço e no timo da prole e os efeitos são distintos para machos e fêmeas e se tornam mais marcantes com o avanço da idade do animal.

Portanto, é cada vez mais importante que se reforcem as discussões e novos estudos sejam realizados. Apesar da gama de estudos que avaliam os prós e contras de seu uso, muitos pontos ainda necessitam de maiores esclarecimentos, visando sempre a contribuição em debates sobre a descriminalização do uso recreativo e legalização do uso medicinal da droga.

11 REFERÊNCIAS

BACZYNSKY, W. O. T.; ZIMMERMAN, A. M. Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol on the Immune System in Mice. *Pharmacology*, v. 26, n. 1, p. 1-11, 1983.

BENEVENUTO, Sarah G. et al. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: an experimental study in mice. *Toxicology*, v. 376, p. 94-101, 2017.

BESSA, Marco A. et al. Underreporting of use of cocaine and marijuana during the third trimester of gestation among pregnant adolescents. *Addictive Behaviors*, v. 35, n. 3, p. 266-269, 2010.

BHARGAVA, Hemendra N. et al. Cellular Immune Function in Mice Tolerant to or Abstinent from/-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *Pharmacology*, v. 52, n. 5, p. 271-282, 1996.

BORINI, Paulo; GUIMARÃES, Romeu Cardoso; BORINI, Sabrina Bicalho. Possible hepatotoxicity of chronic marijuana usage. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 122, n. 3, p. 110-116, 2004.

BRECHER, Edward M. et al. *Licit and illicit drugs*. Boston: Little, Brown, 1972.

CAMPOLONGO, Patrizia et al. Developmental consequences of perinatal cannabis exposure: behavioral and neuroendocrine effects in adult rodents. *Psychopharmacology*, v. 214, n. 1, p. 5-15, 2011.

CARLINI, E. A. et al. Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 25, n. 8, p. 664-665, 1973.

CESTA, Mark F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*, v. 34, n. 5, p. 455-465, 2006.

CHABARRIA, Kristin C. et al. Marijuana use and its effects in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 215, n. 4, p. 506. e1-506. e7, 2016.

CONNER, Shayna N. et al. Maternal marijuana use and neonatal morbidity. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 213, n. 3, p. 422. e1-422. e4, 2015.

CORRIGAN, Desmond. The pharmacology of cannabis: issues for understanding its use. *EMCDDA MONOGRAPHS*, p. 30, 2008.

CUMANO, Ana; GODIN, Isabelle. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Current opinion in immunology*, v. 13, n. 2, p. 166-171, 2001.

DEVANE, William A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.

DEWEY, William L. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological reviews*, v. 38, n. 2, p. 151-178, 1986.

DI MARZO, Vincenzo; MATIAS, Isabel. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 585, 2005.

DI MARZO, Vincenzo; PISCITELLI, Fabiana; MECHOULAM, Raphael. Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. In: *Diabetes-Perspectives in Drug Therapy*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 75-104.

EBRAHIM, Shahul H.; GFROERER, Joseph. Pregnancy-related substance use in the United States during 1996–1998. *Obstetrics & Gynecology*, v. 101, n. 2, p. 374-379, 2003.

EL MARROUN, Hanan et al. Demographic, emotional and social determinants of cannabis use in early pregnancy: the Generation R study. *Drug and alcohol dependence*, v. 98, n. 3, p. 218-226, 2008.

EL MARROUN, Hanan et al. Intrauterine cannabis exposure affects fetal growth trajectories: the Generation R Study. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, v. 48, n. 12, p. 1173-1181, 2009.

EL MARROUN, Hanan et al. A prospective study on intrauterine cannabis exposure and fetal blood flow. *Early human development*, v. 86, n. 4, p. 231-236, 2010.

ELMORE, Susan A. Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicologic pathology*, v. 34, n. 5, p. 656-665, 2006.

ELMORE, Susan A. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicologic pathology*, v. 34, n. 5, p. 648-655, 2006.

ELMORE, Susan A. Enhanced Histopathology Evaluation of Lymphoid Organs. In: *Immunotoxicity Testing*. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 147-168.

GAONI, Yechiel; MECHOULAM, Raphael. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GOODMAN, D. G.; WARD, J. M.; REICHARDT, W. D. Splenic fibrosis and sarcomas in F344 rats fed diets containing aniline hydrochloride, p-chloroaniline, azobenzene, o-toluidine hydrochloride, 4, 4'-sulfonyldianiline, or D & C red No. 9. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 73, n. 1, p. 265-273, 1984.

GORDON, Julie; MANLEY, Nancy R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development*, v. 138, n. 18, p. 3865-3878, 2011.

GOVERNING, 2018. The States and Localities. State Marijuana Laws in 2018. <http://www.governing.com/gov-data/state-marijuana-laws-map-medical-recreational.html>. Last accessed January 8, 2018.

GRIFFIN, Graeme et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v. 258, p. 18, 1992.

GRIFFIN, Graeme et al. Evidence for the presence of CB 2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *European journal of pharmacology*, v. 339, n. 1, p. 53-61, 1997.

GROTENHERMEN, Franjo. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics*, v. 42, n. 4, p. 327-360, 2003.

GROTENHERMEN, Franjo. The toxicology of cannabis and cannabis prohibition. *Chemistry & biodiversity*, v. 4, n. 8, p. 1744-1769, 2007.

GUI, Jingang et al. Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging and disease*, v. 3, n. 3, p. 280, 2012.

GUNN, J. K. L. et al. Prenatal exposure to cannabis and maternal and child health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, v. 6, n. 4, p. e009986, 2016.

HALL, Wayne D. Cannabis use and the mental health of young people. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, v. 40, n. 2, p. 105-113, 2006.

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

HOLLADAY, Steven D.; SMIALOWICZ, Ralph J. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environmental health perspectives*, v. 108, n. Suppl 3, p. 463, 2000.

HOLSAPPLE, Michael P.; WEST, Lori J.; LANDRETH, Kenneth S. Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, v. 68, n. 4, p. 321-334, 2003.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

HOWLETT, Allyn C. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *British journal of pharmacology*, v. 142, n. 8, p. 1209-1218, 2004.

HUIZINK, A. C. Prenatal cannabis exposure and infant outcomes: overview of studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 52, p. 45-52, 2014.

HURD, Y. L. et al. Marijuana impairs growth in mid-gestation fetuses. *Neurotoxicology and teratology*, v. 27, n. 2, p. 221-229, 2005.

IZQUIERDO, Iván; ORSINGHER, Otto A.; BERARDI, Antonio C. Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. *Psychopharmacologia*, v. 28, n. 1, p. 95-102, 1973.

JARDIM, José Roberto et al. An inhalation chamber model for controlled studies of tobacco smoke toxicity in rodents. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, v. 46, n. 9, p. 455-458, 2010.

JIN, LEXIE ZHIYAN et al. Association between use of cannabis in adolescence and weight change into midlife. *PloS one*, v. 12, n. 1, p. e0168897, 2017.

KALANT, Harold. Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Research and Management*, v. 6, n. 2, p. 80-91, 2001.

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

KLEIN, Thomas W.; FRIEDMAN, Herman; SPECTER, Steven. Marijuana, immunity and infection. *Journal of neuroimmunology*, v. 83, n. 1, p. 102-115, 1998.

KO, Jean Y. et al. Prevalence and patterns of marijuana use among pregnant and nonpregnant women of reproductive age. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 213, n. 2, p. 201. e1-201. e10, 2015.

KO, Jean Y. et al. Marijuana use during and after pregnancy and association of prenatal use on birth outcomes: A population-based study. *Drug and alcohol dependence*, v. 187, p. 72-78, 2018.

KORANTZOPOULOS, P. et al. Atrial fibrillation and marijuana smoking. *International journal of clinical practice*, v. 62, n. 2, p. 308-313, 2008.

KOREN, Gideon; KOREN, Edited Gideon. *Maternal-fetal toxicology: a clinician's guide*. 2001.

KOZELA, Ewa et al. Cannabinoids decrease the th17 inflammatory autoimmune phenotype. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 8, n. 5, p. 1265-1276, 2013.

LANDRETH, K. S. Critical windows in development of the rodent immune system. Human & experimental toxicology, v. 21, n. 9-10, p. 493-498, 2002.

LANNES-VIEIRA, J.; DARDENNE, MIREILLE; SAVINO, WILSON. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 39, n. 11, p. 1539-1546, 1991.

LARANJEIRA, Ronaldo et al. Il levantamento nacional de álcool e drogas (LENAD)-2012. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas/Universidade Federal de São Paulo, 2014.

LICHTMAN, Aron H. et al. The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. Drug and alcohol dependence, v. 63, n. 2, p. 107-116, 2001.

LIMA, A. Oliveira. Fisiologia e fisiopatologia do sistema linforetico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 7, n. 2, p. 133-152, 1973.

LOEBSTEIN, Ronen; LALKIN, Arie; KOREN, Gideon. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. Clinical pharmacokinetics, v. 33, n. 5, p. 328-343, 1997.

MALHOTRA, Anil; BISWAS, Parthasarathy. Cannabis Use and Performance in Adolescents. Journal of Indian Association for Child and Adolescent Mental Health, v. 2, n. 2, p. 59-67, 2006.

MANLEY, Nancy R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. In: Seminars in immunology. Academic Press, 2000. p. 421-428.

MASSI P, SACERDOTE P, PONTI W, FUZIO D, MANFREDI B, VIGANO D, PAROLARO D. Immune function alteration in mice tolerant to delta 9 tetrahydrocannabinol: Functional and biochemical parameters. J Neuroimmunol, 92: 60]/6, 1996.

MATSUDA, Lisa A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v. 346, n. 6284, p. 561, 1990.

MCKALLIP, Robert J. et al. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 302, n. 2, p. 451-465, 2002.

MEBIUS, Reina E.; KRAAL, Georg. Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology*, v. 5, n. 8, p. 606, 2005.

MECHOULAM, Raphael. Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *British journal of pharmacology*, v. 146, n. 7, p. 913-915, 2005.

MELVIN, Lawrence S.; JOHNSON, M. Ross. Structure-activity relationships of tricyclic and nonclassical bicyclic cannabinoids. *NIDA Res Monogr*. v. 79, p. 31-47, 1987.

METZ, Torri D.; STICKRATH, Elaine H. Marijuana use in pregnancy and lactation: a review of the evidence. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 213, n. 6, p. 761-778, 2015.

MOIR, David et al. 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, 2008.

MUNRO, Sean; THOMAS, Kerrie L.; ABU-SHAAR, Muna. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

MUNSON, A. E. et al. Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on the immune system. *The Pharmacology of Marijuana*, p. 187-197, 1976.

NAGARKATTI, Prakash et al. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future*, v. 1, n. 7, p. 1333-1349, 2009.

NAHAS, Gabriel G. et al. Inhibition of cellular mediated immunity in marijuana smokers. *Science*, v. 183, n. 4123, p. 419-420, 1974.

NAHAS, Gabriel; LATOUR, Colette. The human toxicity of marijuana. *The Medical Journal of Australia*, v. 156, n. 7, p. 495-497, 1992.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE et al. The health effects of cannabis and cannabinoids: The current state of evidence and recommendations for research. National Academies Press, 2017.

PARK, B. et al. Identification of the CB1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the human placenta. *Placenta*, v. 24, n. 10, p. 990-995, 2003.

PARK, Boram; MCPARTLAND, John M.; GLASS, Michelle. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, v. 70, n. 2, p. 189-197, 2004.

REECE, Albert Stuart. Chronic toxicology of cannabis. *Clinical Toxicology*, v. 47, n. 6, p. 517-524, 2009.

RØDNER SZNITMAN, Sharon; OLSSON, Börje; ROOM, Robin. A Cannabis Reader: Global Issues and Local Experiences—Perspectives on Cannabis Controversies: Treatment and Regulation in Europe. vol. 1. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities., 2008.

RODRIGUEZ DE FONSECA, Fernando et al. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism*, v. 40, n. 1, p. 2-14, 2004.

ROTH, Michael D.; BALDWIN, Gayle C.; TASHKIN, Donald P. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on human immune function and host defense. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 121, n. 1, p. 229-239, 2002.

SALAS-WRIGHT, Christopher P. et al. Substance use and teen pregnancy in the United States: evidence from the NSDUH 2002–2012. *Addictive behaviors*, v. 45, p. 218-225, 2015.

SAMSHA, 2015. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Center for Behavioral Health Statistics and Quality (2015). Behavioral health trends in the United States: Results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health (HHS Publication No. SMA 15-4927, NSDUH Series H-50). Retrieved from <http://www.samhsa.gov/data/>.

SHERWOOD, R. A. et al. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *European journal of pediatrics*, v. 158, n. 6, p. 488-492, 1999.

SHORTMAN, Ken et al. The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunological reviews*, v. 165, n. 1, p. 39-46, 1998.

STOLKER, A. A. M. et al. Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1058, n. 1, p. 143-151, 2004.

SUTTIE, Andrew W. Histopathology of the spleen. *Toxicologic pathology*, v. 34, n. 5, p. 466-503, 2006.

TANDA, Gianluigi; GOLDBERG, Steven R. Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms—a review of recent preclinical data. *Psychopharmacology*, v. 169, n. 2, p. 115-134, 2003.

TASHKIN, D. P. Smoked marijuana as a cause of lung injury. *Monaldi Archives for Chest Disease*, v. 63, n. 2, 2005.

TAYLOR, D. Robin; HALL, W. Respiratory health effects of cannabis: position statement of the Thoracic Society of Australia and New Zealand. *Internal medicine journal*, v. 33, n. 7, p. 310-313, 2003.

TREUTING, Piper M.; DINTZIS, Suzanne M. (Ed.). *Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas (expert consult)*. Academic Press, 2011.

TURNER, Carlton E.; ELSOHL, Mahmoud A.; BOEREN, Edward G. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products*, v. 43, n. 2, p. 169-234, 1980.

UNODC, 2015. United Nations Office on Drugs and Crime, *World Drug Report*, 2015. United Nations publication, Sales No. E.15. XI.6.

VAN DE PAVERT, Serge A.; MEBIUS, Reina E. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nature reviews. Immunology*, v. 10, n. 9, p. 664, 2010.

WEISS, Leon. Electron microscopic observations on the vascular barrier in the cortex of the thymus of the mouse. *The Anatomical Record*, v. 145, n. 3, p. 413-437, 1963.

WEISSMAN, Irving L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *cell*, v. 100, n. 1, p. 157-168, 2000.

WILLIAMS, Claire M.; ROGERS, Peter J.; KIRKHAM, Tim C. Hyperphagia in pre-fed rats following oral Δ 9-THC. *Physiology & Behavior*, v. 65, n. 2, p. 343-346, 1998.

WILLIAMS, Claire M.; KIRKHAM, Tim C. Observational analysis of feeding induced by Δ 9-THC and anandamide. *Physiology & behavior*, v. 76, n. 2, p. 241-250, 2002.