Luciano Belotti

**Efeitos do uso da *Cannabis sativa* durante a gestação sobre o
desenvolvimento pulmonar: estudo experimental em camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2019

Luciano Belotti

**Efeitos do uso da *Cannabis sativa* durante a gestação sobre o
desenvolvimento pulmonar: estudo experimental em camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Belotti, Luciano

Efeitos do uso da Cannabis sativa durante a
gestação sobre o desenvolvimento pulmonar : estudo
experimental em camundongos / Luciano Belotti. --
São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1.Pulmão/crescimento e
desenvolvimento 2.Cannabis 3.Histologia
4.Pulmão/patologia 5.Morfologia

USP/FM/DBD-103/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A todo o decurso de vida profissional e particular oferecidos e vivenciados nesse período. Aos momentos bons, embora pela própria simpatia, foram mais prazerosos. Aos momentos ruins que na maioria das vezes não foram bem compreendidos, e que por alguma razão se fizeram necessários, restaram a reflexão e o aprendizado.

AGRADECIMENTOS

À orientação da **Dra. Mariana Matera Veras** pelos esforços e dedicação empenhados para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff** por meio de seu generoso e amplo conhecimento cooperando significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva (Prof. Burns)** pelos ensinamentos em todo o período de vivência na FMUSP. Em especial, agradecer a sua orientação nas análises das imagens histopatológicas.

Ao **Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva** e a **Dra. Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero** pela oportunidade e aprendizado trabalhando no LIM 05 - Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental.

Aos amigos **Natália de Souza Xavier Costa**, **Gabriel Ribeiro Júnior** e **Adair Aparecida dos Santos Alemany**, pela ajuda, motivação, companheirismo e confiança. É uma grande satisfação trabalhar com vocês. Obrigado pelo profissionalismo, aprendizado e amizade.

Ao **Dr. Marco Antonio Garcia Martins** pelo desenvolvimento e montagem sistema de exposição de fumaça.

À **Sarah Gomes de Menezes Benevenuto** pela parceria nas aplicações das exposições no período gestacional das fêmeas grávidas.

À **Dunia Waked** pela colaboração na execução das colorações de H&E e *Picrossírius Red* nas lâminas de tecido pulmonar dos fetos com 18 dias gestacionais.

À **Nilmara de Oliveira Alves Brito** por realizar as análises de cromatografia gasosa na fumaça da *Cannabis* e na urina dos camundongos gestantes.

Aos profissionais do laboratório de histologia, principalmente a **Kelly Soares**, pelas dicas e aconselhamentos quanto as colorações e cuidados com os materiais enviados à rotina da histologia.

À **Fátima Stagheti, Sonia Maria Neumayr, Welluma Souza e Thiago Luiz Vieira Rezende** pela facilitação e assessoria nas documentações exigidas pelo departamento e acesso aos professores.

Aos funcionários do museu do departamento de patologia, **Carlos e Reginaldo** pelo trabalho de digitalização das lâminas.

Às agencias financiadoras **CAPES e CNPq** pelo auxílio financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Hipótese histórica da origem e utilização da Cannabis	4
2.2. Canabinóides e sistema endocanabinóide	6
<u>2.2.1 Sistema endocanabinóide no sistema respiratório</u>	<u>9</u>
2.3. Uso recreacional da Cannabis sativa: Formas de consumo	9
2.4. Uso recreacional e principais efeitos adversos no sistema respiratório	11
<u>2.4.1. Uso recreacional e efeitos adversos durante a gravidez</u>	<u>13</u>
2.5. Desenvolvimento Pulmonar	15
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	21
4.1 Objetivo geral	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. MATERIAL E MÉTODO	23
5.1 Animais	23
5.2 Droga.....	23
5.3 Grupos experimentais	24
5.4 Protocolo de exposição.....	26
<u>5.4.1 Câmara de exposição</u>	<u>26</u>

5.4.2 <u>Análise e caracterização de HPAs</u>	27
5.4.3 <u>Análise de caracterização da exposição</u>	28
5.5 Eutanásia dos animais e coleta	30
5.6 Estudo estereológico dos pulmões	32
5.6.1 <u>Estudo estereológicos dos pulmões dos fetos</u>	32
5.6.2 <u>Estudo estereológico dos pulmões das fêmeas grávidas e das proles de 20 e 60 dias</u>	33
5.6.2.1 <u>Amostragem e inclusão</u>	34
5.6.2.2 <u>Volume Pulmonar ("Reference Space")</u>	35
5.6.2.3 <u>Volume (V) e Densidade de Volume (Vv) dos Compartimentos Pulmonares</u>	35
5.6.2.4 <u>Áreas de superfície total e Densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos</u>	37
5.6.2.5 <u>Estimativa da espessura dos septos alveolares (Arithmetic mean thickness)</u>	38
5.6.2.6 <u>Estimativa do volume médio alveolar, densidade numérica alveolar (Nv) e do número total de alvéolos (Nt) das proles de 20 e 60 dias</u>	38
5.7 Protocolo de análise do lavado bronco-alveolar	42
5.8 Análise de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	43
5.9 Análise estatística	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Níveis de HPAs na fumaça de Cannabis sativa	46
6.2 Caracterização da exposição	47
6.3 Análise das células inflamatórias no LBA das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))	47
6.4 Avaliação histopatológica do tecido pulmonar das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))	47
6.5 Análises morfológicas pulmonares das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))	48
6.6 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))	50
6.7 Análises de remodelamento tecidual das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))	52
6.7.1 <u>Proporções de colágeno no parênquima pulmonar das mães</u>	52
6.7.2 <u>Proporções de fibras elásticas no parênquima pulmonar das mães</u>	53

6.8 Análises morfológicas pulmonares dos grupos 1 (C18) e 2 (M18) (18º dia gestacional)	54
6.9 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares dos grupos 1 (C18) e 2 (M18) (18º dia gestacional)	56
6.10 Análise de remodelamento tecidual dos grupos 1 (C18) e 2 (M18) (18º dia gestacional)	60
<u>6.10.1 Proporções de colágeno no mesênquima pulmonar dos fetos</u>	<u>60</u>
6.11 Análise do volume total (Vt) pulmonar dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal)	61
6.12 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal)	61
6.13 Análise da estimativa do volume médio alveolar, densidade numérica alveolar (Nv) e do número total de alvéolos (Nt) dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal) pelo método do dissector	64
6.14 Análises de remodelamento tecidual dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal)	65
<u>6.14.1 Proporções de colágeno no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (20º dia pós-natal)</u>	<u>65</u>
<u>6.14.2 Proporções de fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (20º dia pós-natal)</u>	<u>65</u>
6.15 Análise do volume total (Vt) pulmonar dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60º dia pós-natal)	66
6.16 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60º dia pós-natal)	67
6.17 Análise da estimativa do volume médio alveolar, densidade numérica alveolar (Nv) e do número total de alvéolos (Nt) dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60º dia pós-natal) pelo método do dissector	74
6.18 Análises de remodelamento tecidual dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60º dia pós-natal)	75
<u>6.18.1 Proporções de colágeno no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (60º dia pós-natal)</u>	<u>75</u>
<u>6.18.2 Proporções de fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (60º dia pós-natal)</u>	<u>76</u>
7. DISCUSSÃO	77
8. CONCLUSÃO	87
9. ANEXO.....	88

Anexo A: Auto de entrega da droga concedido através de solicitação oficial ao Delegado Seccional de Marília com fornecimento autorizado pela 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais – Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília/SP.....	88
Anexo B: Aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	89
Anexo C: Resultados significativos representados em tabelas.	90
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Lista de abreviaturas e siglas

Δ^8 -THC - Δ^8 -tetrahydrocanabinol

Δ^9 -THC - Δ^9 -tetrahydrocanabinol

a(p) – área do ponto

a.C. - antes de Cristo

ACOG - *American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice*

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

AG - araquidonoilglicerol

AMT - *arithmetic mean thickness*

ATS - *American Thoracic Society*

BSTFA - N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida

BaPE - índice benzo(a)pireno equivalente

CBC - canabicromeno

CBD - canabidiol

CBE - canabielsoin

CBG - canabigerol

CBL - canabiciolol

CBN - canabinol

CBND - canabinodiol

CBT - canabitriol

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CRH - Hormônio corticotrófico

DP - desvio padrão

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

ECB - sistema endocanabinóide

EP - erro padrão

ERS - *European Respiratory Society*

FgF - *fibroblast growth factor*

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GC-MS - cromatografia gasosa com detector de massa acoplado

GPR55 - receptor acoplado a proteína G 55

GPR119 - receptor acoplado a proteína G 119

H&E - Coloração Hematoxilina-Eosina

HEPA - *high efficiency particulate arrestance*

HPAs - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Id2 - *inhibitor of DNA binding 2*

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

IQR - intervalo interquartil

LBA - lavado bronco-alveolar

NK - *natural killer*

Nkx2.1 - *NK2 homeobox 1*

n.s. – não significativo

PBS - *phosphate buffered saline solution*

PPAR - *peroxisome proliferator-activated receptor*

rpm - rotação por minuto

Shh - *sonic hedgehog*

SIM - monitoração iônica seletiva

Sox - *sex determining region Y-box*

St – densidade de superfície

Sv – superfície total

T – espessura

Th1 - células T *helper* de tipo 1

Th2 - células T *helper* de tipo 2

THC - tetrahydrocannabinol

TCH-COOH - 11-nor-9-carboxi-THC

TMCS - trimetilclorossilano

TRPV1 - *transient receptor potential vanilloid 1*

Vt – volume total

Vv – densidade de volume

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema mostrando a fase inicial de desenvolvimento do sistema respiratório em camundongos. **A** - O intestino primitivo (endoderme) dará origem a órgãos como a tireoide, traqueia, pulmão, fígado e pâncreas. Aproximadamente no 9,5º dia da idade gestacional, a traqueia e os brotos pulmonares primários começam a crescer. Seguidamente entre o 9,5º e 10º dia, os brotos primários alongam-se, enquanto que o primórdio traqueal começa a se separar do esôfago primitivo pelo crescimento de um septo traqueoesofágico. No 10,5º dia os brotos primários dão origem aos brotos secundários do pulmão (início do *branching*) (representado pelas setas vermelhas 1 e 2 respectivamente). **B** - Entre o 11º e 16,5º dia, o *branching* se mantém constante (sentido proximal-distal) até formar a árvore brônquica (setas 1, 2, 3, representam os brotos primários, secundários e terciários, respectivamente). **C** - Entre os dias 17º e 18º as células epiteliais distais das vias aéreas se diferenciam em pneumócitos do tipo I e II e se expandem para formar os sáculos. **D** - Na fase pós-natal entre o 3º e 14º dia os sáculos são subdivididos pelo crescimento secundário do septo (septação) dando origem à alvéolos maduros.....17

Figura 2 - Representação das fases do desenvolvimento pulmonar em Camundongo (fase embrionária 8,5º-9,5ºd; fase pseudoglandular 9,5º-16,5ºd; fase canalicular 16,5º-17,5ºd; fase sacular 17,5º-5ºd e fase alveolar 5º-30ºd) e humanos (fase embrionária 4º-7ºs; fase pseudoglandular 7º-17ºs; fase canalicular 17º-26ºs; fase sacular 27º-36ºd; fase alveolar 36ºs-2 anos e aproximadamente até os 18 anos os pulmões continuam crescendo e expandindo). d=dias; s=semanas.....18

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental. Legenda: **DG** – dias gestacionais; **DPN** – dias pós-natal; **M18** – grupo 1; **C18** – grupo 2; **M20** – grupo 3; **C20** – grupo 4; **M60** – grupo 5; **C60** – grupo 6.....24

Figura 4 - Representação esquemática do sistema de exposição das fêmeas grávidas à fumaça da queima da *Cannabis sativa* (Adaptado do desenho desenvolvido por Marco Antonio Garcia Martins).....27

Figura 5 - Fotomicrografia representativa do tecido pulmonar (coloração H&E) dos fetos em 20x, grupos 1 e 2. Legenda: **VA** – via aérea; **VS** – vaso sanguíneo; **SA** – saco alveolar; o mesênquima está representado pelas setas verdes.....32

Figura 6 - Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. **A** e **B** - preparação do ágar a 12%; **C** - pulmão a ser incluído; **D** - inclusão do pulmão em ágar; **E** e **F** - Cortes verticais seriados; **G** - Fatias obtidas para a estimativa do volume total pulmonar pelo método de Cavalieri.....34

Figura 7 - **A** e **B** - Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa das densidades de volume dos compartimentos pulmonares. **C** - Sistema teste de arcos ciclóides para estimativa de áreas de superfície. Os pontos neste sistema teste são representados pelas extremidades dos arcos.....37

Figura 8 – Exemplo da aplicação do dissector físico nas proles de 20 e 60 dias de idade. **A** e **B** são fotomicrografias (20x) de cortes subsequentes (5µm) de tecido pulmonar de camundongos com 60 dias de idade, e representam os pares (fatias) consecutivos (Coloração H&E). Os quadrados com área fixa desenhados na imagem representam as frames (ferramenta usada para delimitar a área de contagem das “*bridges*”). As linhas vermelhas das frames representam as regiões de exclusão para a contagem. O plano **A** é utilizado como referência para a contagem das “*bridges*” na imagem de amostragem representada no plano **B**. Seguidamente, o plano **B** é utilizado como referência para a contagem das “*bridges*” na imagem de amostragem representada no plano **A**. As setas verdes indicam as estruturas de contagem “*bridges*” ausentes na frame de referência **A**. A seta vermelha mostra um exemplo de “*bridge*” na região de exclusão.....40

Figura 9 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). **A**, **B** e **C** – grupo controle (Mães AF) em 10x, 20x e 40x respectivamente; **D**, **E** e **F** – grupo exposição (Mães MA) em 10x, 20x e 40x respectivamente.....48

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica do volume total pulmonar (mm^3) das mães.....49

Gráfico 2 – Representação gráfica da proporção do volume total pulmonar (mm^3) pelo peso corpóreo (g) das mães.....50

Gráfico 3 – Representação gráfica do volume total do septo (mm^3) das mães.....51

Gráfico 4 – Representação gráfica do volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) das mães.....52

Gráfico 5 - Representação gráfica do peso dos pulmões (g) dos fetos.....54

Gráfico 6 - Representação gráfica do volume total pulmonar (cm^3) dos fetos.....55

Gráfico 7 - Representação gráfica da proporção do volume total pulmonar (cm^3) pelo peso corpóreo (g) dos fetos. (n.s. – não significativo).....56

Gráfico 8 - Representação gráfica do volume de saco alveolares (cm^3) dos fetos. (n.s. – não significativo).....57

Gráfico 9 - Representação gráfica do volume total de mesênquima (cm^3) dos fetos.....58

Gráfico 10 - Representação gráfica da densidade de volume de sacos alveolares (pré-alvéolos) (%) dos fetos.....59

Gráfico 11 - Representação gráfica da densidade de volume de mesênquima (%) dos fetos. (n.s. – não significativo).....60

Gráfico 12 - Representação gráfica do volume total das vias aéreas (mm^3) das proles com 20 dias de idade. (n.s. – não significativo).....62

Gráfico 13 - Representação gráfica da densidade de volume das vias aéreas totais (%) das proles com 20 dias de idade. (n.s. – não significativo).....63

Gráfico 14 - Representação gráfica da densidade de superfície das vias aéreas totais (mm^{-1}) das proles com 20 dias de idade.....64

Gráfico 15 - Representação gráfica do volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....67

Gráfico 16 - Representação gráfica do volume total de tecido conjuntivo (mm^3) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....68

Gráfico 17 - Representação gráfica da densidade de volume do espaço aéreo alveolar (%) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....69

Gráfico 18 - Representação gráfica da densidade de volume dos septos alveolares (%) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....70

Gráfico 19 - Representação gráfica da densidade de volume de tecido conjuntivo (%) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....71

Gráfico 20 - Representação gráfica da densidade de superfície dos septos alveolares (mm^{-1}) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....72

Gráfico 21 - Representação gráfica da área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....73

Gráfico 22 - Representação gráfica da espessura dos septos alveolares (mm) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....74

Gráfico 23 - Representação gráfica da estimativa do número total de alvéolos (milhões) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).....75

Lista de símbolos

Δ - delta

< - menor

°C - grau célsius

cm³ – centímetro cúbico

CO – monóxido de carbono

g - grama

HCN – cianeto de hidrogênio

L - litro

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mm² - milímetro quadrado

mm³ – milímetro cúbico

ms - milissegundo

m/z - razão massa sobre a carga

NaOH - hidróxido de sódio

ng - nanograma

NO_x – óxidos de nitrogênio

μL - microlitro

μg – micrograma

μm – micrometro

μm² – micrometro quadrado

Lista de tabelas

Tabela 1 - Concentração e caracterização dos HPAs na fumaça da *Cannabis sativa* provenientes do sistema de exposição.....46

Tabela 2 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) dos grupos Mães AF (C18) e Mães MA (M18).....53

Tabela 3 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) dos fetos: grupo 1 (C18) e grupo 2 (M18).....61

Tabela 4 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) das proles (20° dia pós-natal): grupo 3 (C20) e grupo 4 (M20).....68

Tabela 5 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) das proles (60° dia pós-natal): grupo 5 (C60) e grupo 6 (M60).....76

Belotti, L. *Efeitos do uso da Cannabis sativa durante a gestação sobre o desenvolvimento pulmonar: estudo experimental em camundongos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A *Cannabis sativa* é a droga ilícita usada com maior frequência por gestantes. O Δ^9 -tetrahydrocannabinol é o canabinóide principal responsável pelos efeitos psicoativos agindo principalmente nos receptores canabinóides 1 no cérebro. O consumo de *Cannabis* durante a gestação pode afetar o sistema endocanabinóide causando impactos na fase implantacional e no desenvolvimento fetal. Além disso, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol é uma substância que pode atravessar a barreira feto-placentária e estar presente no leite materno. Sabe-se, no entanto, que qualquer estímulo ou insulto em um período crítico de desenvolvimento embrionário-fetal pode representar consequências mais tarde na vida. A fumaça de *Cannabis* contém elementos tóxicos prejudiciais semelhantes aos da fumaça de cigarro, logo o uso crônico de *Cannabis* tem sido associado a efeitos deletérios sobre o sistema respiratório. Embora vários estudos abordarem os efeitos da exposição à *Cannabis sativa*, escassos são aqueles que estudam a exposição gestacional e seus efeitos na prole. Além disso, os efeitos da *Cannabis sativa* sobre o desenvolvimento pulmonar são pouco conhecidos. O objetivo deste estudo é analisar os efeitos do uso da *Cannabis sativa* no desenvolvimento pulmonar da prole de camundongos, cujas mães foram expostas no período de gestação e analisar os efeitos no próprio tecido pulmonar dessas mães. Camundongos fêmeas grávidas (BALB/c) com aproximadamente 3 meses foram expostas à fumaça de *Cannabis sativa* ou ar filtrado por um período de 13 dias. Após as exposições os pulmões e os fetos das fêmeas grávidas foram coletados e o perfil inflamatório pulmonar avaliado no lavado broncoalveolar. As análises morfologia tecidual foram conduzidas e avaliadas utilizando os parâmetros estereológicos do volume pulmonar total, volume total e densidade de volume dos compartimentos pulmonares (parênquima pulmonar, vias aéreas, vasos sanguíneos, espaços aéreos alveolares, septos alveolares, áreas de superfície total e densidade de superfície dos alvéolos). Adicionalmente foram incluídas as análises de disector físico para a estimativa de volume médio alveolar, densidade numérica e o número total de alvéolos para as proles com 20 e 60 dias de idade. As análises estereológicas das fêmeas grávidas mostraram um aumento significativo no volume total pulmonar, no volume total dos septos e no volume total dos espaços aéreos alveolares, quando comparados com as fêmeas grávidas expostas ao ar filtrado (grupo controle). Nos fetos com 18 dias de idade gestacional, houve uma diminuição significativa no volume total pulmonar, no volume total e na densidade de volume de sacos alveolares, no volume total e na densidade de volume de mesênquima, quando comparados com o grupo controle. Na prole com 20 dias de idade, houve um aumento no volume total, na densidade de volume e de superfície das vias aéreas, quando comparados com o grupo controle. Na prole com 60 dias de idade, houve um aumento no volume total do espaço aéreo alveolar, na densidade de volume do espaço aéreo alveolar, na densidade de superfície dos septos alveolares e na estimativa do número total de alvéolos,

quando comparados com o grupo controle. Já os parâmetros de densidade de volume dos septos alveolares, área de superfície total dos septos alveolares e espessura dos septos alveolares, mostraram-se diminuídas quando comparados com o grupo controle. Os resultados mostraram que a exposição à fumaça de *Cannabis* é capaz de induzir alterações morfológicas no tecido pulmonar de camundongos (BALB/c) fêmeas grávidas e nas suas respectivas proles.

Descritores: Pulmão/crescimento e desenvolvimento; *Cannabis*; Histologia; Pulmão/patologia; Morfologia

Belotti, L. *Effects of Cannabis sativa during gestation on lung development: an experimental study in mice*. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Cannabis sativa is the illicit drug most frequently used by pregnant women. Δ^9 -tetrahydrocannabinol is the main cannabinoid responsible for psychoactive effects and acts mainly on the cannabinoid 1 receptors in the brain. *Cannabis* use during pregnancy can affect the endocannabinoid system causing impacts on the implantation phase and fetal development. In addition, Δ^9 -tetrahydrocannabinol is a substance that can cross the fetal-placental barrier and be present in breast milk. It is known, however, that any stimulus or insult in a critical period of embryonic-fetal development can have consequences later in life. *Cannabis* smoke contains harmful toxic elements similar to those of cigarette smoke, so chronic use of *Cannabis* has been associated with deleterious effects on the respiratory system. Although several studies address the effects of exposure to *Cannabis sativa*, few are those who study gestational exposure and its effects on offspring. In addition, the *Cannabis sativa* effects on lung development are poorly understood. The aim of this study is to analyze the effects of *Cannabis sativa* on the mice offspring lung development whose mothers were exposed during the gestation period and to analyze the effects on the lung tissue of these mothers. Pregnant female mice (BALB / c) with approximately 3 months were exposed to *Cannabis sativa* smoke or filtered air for 13 days. After the exposures the lungs and fetuses of the pregnant females were collected and the lung inflammatory profile evaluated in the bronchoalveolar lavage. The tissue morphology analyzes were conducted and evaluated using the stereological parameters of total lung volume, total volume and volume density of lung compartments (lung parenchyma, airways, blood vessels, alveolar air spaces, alveolar septa, total surface areas and alveoli surface density). In addition, physical dissector analyzes were used to estimate the mean alveolar volume, numerical density and the total number of alveoli for offspring at 20 and 60 days of age. Stereological analyzes of pregnant females showed a significant increase in total lung volume, total septal volume and alveolar air spaces total volume when compared to pregnant females exposed to filtered air (control group). In fetuses with 18 days gestational age, there was a significant decrease in total lung volume, total volume and volume density of saccules, total volume and volume density of mesenchymal stroma when compared to the control group. In the 20-day-old offspring, there was an increase in total volume, volume density and surface density of airway when compared to the control group. In the 60-day-old offspring, there was an increase in total alveolar airspace volume, alveolar airspace volume density, alveolar septal surface density, and total alveolar number estimation, as compared to the control group. The alveolar septa volume density, alveolar septa total surface area and alveolar septa thickness were decreased when compared to the control group. The results showed that exposure to *Cannabis smoke* is able to induce morphological changes in the lung tissue of pregnant (BALB / c) mice and their respective offspring.

Keywords: Lung/growth and development; *Cannabis*; Histology; Lung/pathology; Morphology

1. INTRODUÇÃO

A maconha (*Cannabis sativa*) é entre as drogas ilícitas, a mais frequentemente utilizada pelas gestantes e, assim como para o álcool e o tabaco, não existem níveis seguros relacionados ao uso durante a gravidez ou amamentação (ACOG, 2015, Emery et al., 2016). O uso de *Cannabis* durante a gestação está associado a baixo peso ao nascimento, parto prematuro e maior taxa de hospitalização de recém-nascidos (Hayatbakhsh et al., 2012; Benevenuto et al., 2015; Gunn et al., 2016).

As propriedades medicinais e psicoativas da *Cannabis* estão diretamente relacionadas aos seus compostos canabinóides. O THC ou mais especificamente o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) é o canabinóide mais abundante na *Cannabis* e o principal responsável pelos efeitos psicoativos. Quando inalado, atravessa os alvéolos pulmonares e entra na circulação atingindo o cérebro rapidamente (Grotenhermen, 2003; ACOG, 2015).

O Δ^9 -THC entra na corrente sanguínea e interage com o sistema ECB (sistema endocanabinoide) ativando os receptores CB1 e CB2 pertencentes a família de receptores acoplados a proteína-G na membrana celular, que são encontrados basicamente em órgãos como cérebro e células do sistema imunológico (Alger, 2013). O Δ^9 -THC mimetiza a ação dos ligantes endógenos derivados do ácido araquidônico: N-araquidoniletonolamida (Anandamida) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), ambos existentes em nosso organismo (Mechoulam e Hanuš, 2000; Elsohly e Slade, 2005). Além disso, o sistema ECB está

envolvido em vários processos fisiológicos que incluem apetite, sensação de dor, humor, sono, memória, regulação da temperatura corporal e modulação do sistema imunológico (Croxford e Yamamura, 2005; Manzanares et al., 2006; Downey e Verster, 2014).

O sistema ECB se mostra presente e ativo desde os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, permitindo que um organismo em formação complete etapas distintas do desenvolvimento pré e pós-natal (Fride, 2008). Sabe-se também que o Δ^9 -THC pode afetar o equilíbrio do sistema endocanabinóide (ECB) causando impactos na fase implantacional do embrião e no desenvolvimento fetal, elevando os riscos de aborto e restrição de crescimento fetal (Zuckerman et al., 1989; Paria e Dey, 2000; Gray et al., 2010).

Os receptores canabinóides podem ser encontrados também nas células estruturais dos pulmões, bem como nas células residentes e na maioria dos leucócitos, apesar do seu papel não ser bem compreendido nestas células. Sabe-se, no entanto, que a exposição ao Δ^9 -THC pode comprometer as defesas do sistema imunológico dos pulmões, principalmente a capacidade de defesa contra patógenos externos (Croxford e Yamamura, 2005; ACOG, 2015; Turcotte et al., 2016).

Ainda que uso recreacional da *Cannabis* tenha por objetivo alcançar os efeitos psicoativos imediatos como o relaxamento e leve euforia (*desired effects*), pouco se sabe sobre os problemas de saúde que podem ser causados pelo uso recreativo da maconha. Evidências indicam que o uso frequente e prolongado pode ser prejudicial para a saúde mental e física. Os efeitos crônicos do consumo de *Cannabis* incluem transtornos de humor, exacerbação de distúrbios psicóticos

em pessoas vulneráveis, deficiências cognitivas e distúrbios somáticos (Johns, 2001; Boyce e McArdle, 2008; Karila et al., 2014).

O uso crônico de *Cannabis* tem sido associado a diferentes efeitos deletérios sobre o sistema respiratório, incluindo a inflamação de vias aéreas com desenvolvimento de bronquite crônica, obstrução de vias aéreas, hiperinsuflação pulmonar e alterações enfisematosas (Reece, 2009).

Alguns estudos indicam que estes efeitos negativos, semelhantes ao tabagismo, estão ligados principalmente à inalação da fumaça proveniente da combustão da *Cannabis*, que contém elementos tóxicos como os óxidos de nitrogênio (NOx), monóxido de carbono (CO), cianeto de hidrogênio (HCN), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e amônia (Moir et al., 2008; Loflin e Earleywine, 2015). Portanto, o abuso de *Cannabis* na gravidez pode ser potencialmente prejudicial e determinante para o desenvolvimento fetal (Hutchings et al., 1989; Garry et al., 2009; Wu et al., 2011).

Durante a gestação, o pulmão sofre significativas alterações morfológicas em seus estágios de desenvolvimento, portanto qualquer insulto ocorrido nesse período pode ser significativo (Rosenthal e Bush, 2002). Entretanto, os efeitos da *Cannabis* sobre o desenvolvimento pulmonar não são conhecidos e apesar de vários estudos abordarem os efeitos da exposição à *Cannabis*, escassos são aqueles que estudam a exposição em mulheres grávidas e seus efeitos nos descendentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hipótese histórica da origem e utilização da *Cannabis*

A origem da *Cannabis* não é muito clara, mas acredita-se que seu surgimento se deu na Ásia Central desde o período Neolítico (cerca de 6.000 a.C.), onde foram encontrados os primeiros vestígios e evidências arqueológicas, indicando que essa planta era cultivada para a obtenção de fibras (fabricação de tecidos, cordas, redes de pesca e papel), extração do óleo das sementes (aquecer os alimentos), como droga alucinógena (práticas xamânicas) e posteriormente na medicina (analgésicos, diurético, anticonvulsivante etc.). (Schultes et al., 1974; Li, 1974; Touw, 1981).

O uso da *Cannabis* como medicamento e droga psicoativa, foram relatadas pelos ancestrais chineses na farmacopeia mais antiga do mundo a *pen- ts'ao ching* (Li, 1977). No entanto, pela influência de fatores geográficos e climáticos, acredita-se que em determinadas regiões que a *Cannabis* era cultivada, os seus compostos farmacológicos ativos eram mais evidentes, o que possivelmente levaram à descoberta de que a planta (especificamente a sua resina) possuía efeitos psicoativos (Kalant, 2001). Esses efeitos psicoativos eram bem conhecidos na Índia, devido as formas de preparo para o consumo: O *Bhan* o tipo mais fraco, é proveniente das folhas secas com as flores cuidadosamente removidas, a *Ganja*, um tipo mais forte, é preparada com as flores da planta do sexo feminino e o *Charas*, o tipo mais forte de todos, é

produzido exclusivamente da resina que cobre flores da planta do sexo feminino (Touw, 1981).

Existem muitos nomes direcionados especificamente aos efeitos psicoativos e ao uso recreacional da planta, incluindo por exemplo: *maconha* (do português brasileiro), *marijuana* (derivação hispânica), *sinsemilla* (marijuana sem sementes), *grass*, *pot*, *hashish*, *kif*, *ganja*, *weed*, *hemp*, *Mary Jane*, *reefer* etc. Os taxonomistas e a maioria das pessoas no mundo referem-se a planta pelo nome de *Cannabis*, nome este ligado ao gênero (Hazekamp, 2009; Clarke e Merlin, 2013; Fitzgerald et al., 2013). O gênero *Cannabis* pertence à família *Cannabaceae* e pode ser dividida em três espécies: *Cannabis sativa* Linnaeus, *Cannabis indica* Lamarck e *Cannabis ruderalis* Janisch. No entanto, também é comum referir-se apenas ao nome *Cannabis sativa*, pois além de ocorrer o cruzamento entre as espécies (híbridas), existem controvérsias envolvendo a taxonomia da *Cannabis*, podendo também ser classificada como um gênero monotípico (contendo apenas uma única espécie) (Hazekamp, 2009; Clarke e Merlin, 2013; Chasteen, 2016).

A resina excretada pelos tricomas glandulares distribuídas por toda a superfície da planta, além de conter uma variedade de componentes (canabinóides, terpenos, compostos fenólicos e alcalóides), possui um papel de defesa contra o ataque de insetos e fungos (Flores-Sanchez e Verpoorte, 2008).

Certamente, o conhecimento dos efeitos psicotrópicos e medicinais da resina estimulou o interesse dos seres humanos pela *Cannabis*, levantando a hipótese para o aumento na domesticação da planta, o que poderia explicar a sua larga e crescente distribuição pelo mundo (Hazekamp, 2009).

2.2. Canabinóides e sistema endocanabinóide

Embora a *Cannabis* tenha sido usada para fins recreativos e medicinais por pelo menos quatro milênios, somente no final da década de 80 e início da década de 90, os estudos sobre o THC foram determinantes para a descoberta do sistema ECB, constituído pelos receptores canabinóides (CB1 e CB2) (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993) e os ligantes endógenos como a anandamida (Devane et al., 1992) e 2-AG (Mechoulam et al., 1995).

Os canabinóides são substâncias encontradas originalmente nas plantas de *Cannabis*, mas referem-se a qualquer substância que é especificamente reconhecida pelo sistema ECB (Lambert e Fowler, 2005). Com o isolamento e a caracterização química da primeira molécula de Δ^9 -THC (Gaoni e Mechoulam, 1964), os estudos se intensificaram para entender como funcionava e se o nosso organismo produzia ou não compostos semelhantes (Alger, 2013).

Os canabinóides podem ser divididos em três tipos: fitocanabinóides (proveniente de vegetais), endocanabinóides (ligantes endógenos sintetizados pelo nosso organismo e em outros animais) e canabinóides sintéticos (HU-210 e desacetil-L-nantradol) (Howlett et al., 2002; Lambert e Fowler, 2005).

Atualmente, mais de 80 fitocanabinóides foram isolados a partir da *Cannabis* e são classificados em 10 principais subclasses: canabigerol (CBG), canabiciolol (CBL), canabinol (CBN), canabicromeno (CBC), canabidiol (CBD), canabielsoin (CBE), canabitriol (CBT), canabinodiol (CBND), Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -THC (Flores-Sanchez e Verpoorte, 2008).

Apenas 3 destas principais subclasses são reconhecidamente capazes de desencadear efeitos psicoativos no indivíduo pelo uso recreacional: Δ^9 -THC, Δ^8 -THC e CBN. O Δ^9 -THC, o CBD e o CBN são os 3 fitocanabinóides que são encontrados em maiores quantidades na composição química da planta, sendo que o CBD possui outros tipos de atividades farmacológicas não psicoativa (efeitos anticonvulsiantes) (Kalant, 2001; Sirikantaramas et al., 2005).

O Δ^9 -THC é uma substância capaz de induzir alucinações em humanos e seus efeitos podem ser comparados com os efeitos do uso crônico de anestésicos e solventes. Importante do ponto de vista toxicológico e farmacológico, o Δ^9 -THC é considerado um agonista parcial de ambos receptores CB1 e CB2, uma vez que não é capaz de desencadear a ativação completa de receptores. Seus efeitos psicoativos estão relacionados à sua ação em principalmente receptores CB1 presentes no cérebro (Mechoulam e Hanuš, 2000; Yamaori et al., 2010).

Os endocanabinóides e seus receptores estão presentes em grande parte no cérebro e ambos, CB1 e CB2, são expressos nos terminais pré-sinápticos excitatórios (glutamatérgicos) e inibitórios (GABAérgicos) (Di Marzo et al., 2015). Estes receptores também podem ser encontrados em outros órgãos como o pulmão, coração, pâncreas e bexiga, glândulas adrenais, tecido adiposo e conjuntivo, em regiões gastrointestinal e reprodutiva e células do sistema imune (Alger, 2013; Andre et al., 2016).

A síntese dos endocanabinóides ocorre nos neurônios pós-sinápticos pelo influxo de cálcio e a ação de enzimas fosfolipases que convertem os fosfolipídeos em endocanabinoides. Os endocanabinoides são liberados sob

demanda na fenda sináptica (não são armazenados em vesículas) a partir de precursores lipídicos e em direção aos neurônios pré-sináptico (similar a uma sinalização parácrina), onde se ligam aos receptores canabinóides agindo como mensageiros retrógrados em alguns sistemas neurotransmissores como glutamatérgico e GABAérgico, além de agirem como moduladores da transmissão pós-sináptica dopaminérgico, serotoninérgico e colinérgico (Alger, 2002; Basavarajappa, 2007; Zogopoulos et al., 2013).

Os endocanabinóides também se ligam a outros receptores como TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid 1*), PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), GPR55 e GPR119. Apesar de ser pouco entendida e explorada a interação nestes receptores, alguns estudos mostram que o controle da circulação sanguínea, temperatura corporal, liberação de insulina e citocinas, densidade óssea, proliferação de células cancerígenas e motilidade gastrointestinal estão relacionados a ação dos endocanabinóides e agonistas canabinóides nestes receptores e não só diretamente nos receptores CB1 e CB2 (Li et al., 2013; Huang et al., 2016; Ligresti et al., 2016).

Por ser capaz de ativar múltiplas vias de sinalização celular, crê-se que o sistema ECB possui um papel regulatório em diversas funções celulares e fisiológicas no sistema cardiovascular, no metabolismo energético e na reprodução, além de ser uma promessa terapêutica em distúrbios de coordenação motora, processamento de memória, controle do apetite, modulação da dor e neuroproteção (Wang e Ueda, 2009; Ligresti et al., 2016).

2.2.1 Sistema endocanabinóide no sistema respiratório

Apesar das evidências sobre o potencial terapêutico do sistema ECB no processo de inflamação pulmonar mediante à inibição do recrutamento e função das células do sistema imunológico, alguns canabinóides possuem efeitos deletérios na função pulmonar (Turcotte et al., 2016). Particularmente o Δ^9 -THC, pode comprometer a função de células pulmonares como o epitélio brônquico, células dendríticas e macrófagos alveolares prejudicando a resposta imunológica aos agentes patogênicos (Baldwin et al., 1997; Roth et al., 2002; Tashkin et al., 2002).

Tanto as células estruturais quanto as células pulmonares de defesa são capazes de sintetizar endocanabinóides e expressar receptores CB1 e CB2 (exceto fibroblastos) quando expostas a estímulos inflamatórios. Sabe-se, no entanto, que os endocanabinóides e receptores CB1 e CB2, podem regular as funções das células de defesa como macrófagos alveolares e no recrutamento de leucócitos, neutrófilos e eosinófilos, mas o impacto que isso pode ter na homeostase e patologia pulmonar não é totalmente compreendido (Turcotte et al., 2016).

2.3. Uso recreacional da *Cannabis sativa*: Formas de consumo

A quantidade de Δ^9 -THC presente na *Cannabis* e as diferentes formas de consumo são consideradas determinantes para os efeitos adversos à saúde e potencial psicoativo (Cascini et al., 2012; Pickett et al., 2015). A concentração média de THC encontrada na *Cannabis* de uso recreacional aumentou de 1,5% em 1980 para 4,2% em 1997. Os níveis máximos de THC encontrados foram de

29,9% para a *Cannabis* conhecida como *marijuana* e 33,1% para a do tipo *sinsemilla*. Já as concentrações mais elevadas de THC foram encontradas no *hashish* e no óleo de *hashish* (extraído diretamente da resina) com 52,9% e 47%, respectivamente (Brenneisen, 2007).

Normalmente a *Cannabis* é fumada na forma de cigarros contendo de 0,5g a 1g da droga (Adams e Martim, 1996). Os cigarros podem ser feitos a partir de papéis confeccionados com a própria fibra da *Cannabis* (*seda*) ou em papéis de tabaco provenientes de charutos (*blunts*). A utilização de tubos modificados conhecidos como *pipes*, *bongs*, *buckets* (com auxílio de um recipiente com água e uma garrafa pet) e *narguilé*, são as formas de uso menos convencionais. O uso de cigarros eletrônicos (*e-cigarretes*) para vaporizar óleo de *hashish* tem sido reportado em estudo recente por Morean et al. (2015). A *Cannabis* também pode ser preparada e consumida junto com alimentos na forma biscoitos, espaguete, bolos, *brownies* e bebidas na forma de chá (*Bhang*) (Ashton, 2001; Fitzgerald et al., 2013; Greydanus et al., 2013; Joshi et al., 2014; Biehl e Bumham, 2015).

A *Cannabis* fumada na forma de cigarros é preferencialmente utilizada pelos usuários recreacionais, pois os efeitos psicoativos iniciam quase que instantaneamente (Huestis, 2007). Já o uso da *Cannabis* por via oral, os efeitos psicoativos podem demorar mais a iniciar, porém perduram por mais tempo (Wachtel et al., 2002; Grotenhermen, 2003).

A *Cannabis* quando fumada, o THC é absorvido e penetra rapidamente nos tecidos, sendo distribuído para o cérebro e outros compartimentos corporais aumentando os níveis plasmáticos de THC rapidamente (Huestis et al., 1992).

Por ser uma substância altamente lipofílica, o THC se liga preferencialmente ao tecido adiposo, ocorrendo uma rápida diminuição dos seus níveis no sangue. A biodisponibilidade do THC pode variar de acordo com o aproveitamento do usuário ao inalar a fumaça (Musshoff e Madea, 2006).

O THC é metabolizado principalmente no fígado pelas enzimas do complexo citocromo P450, a hidroxilação do Δ^9 -THC dá origem ao composto psicoativo 11-hidroxi-THC (11-OH-THC). O 11-OH-THC, é oxidado a um composto inativo 11-nor-9-carboxi-THC (TCH-COOH). THC-COOH é dos compostos canabinóides excretados principalmente na urina como um conjugado de ácido glucurônico (THC-COOHglu), sendo detectável em exames laboratoriais (Musshoff e Madea, 2006; Akhtar et al., 2016).

2.4. Uso recreacional e principais efeitos adversos no sistema respiratório

Desde a metade do século 20 até os dias atuais, o uso de *Cannabis* tornou-se quase tão comum quanto o uso de tabaco entre adolescentes e adultos jovens (Hall, 2015). O uso frequente de *Cannabis* na adolescência pode aumentar os riscos na saúde física e mental, favorecendo o surgimento de problemas de saúde na idade adulta como doenças respiratórias e sintomas psicóticos (por exemplo esquizofrenia) (Bechtold et al., 2015).

O uso crônico e os níveis elevados de THC encontrados atualmente na *Cannabis* estão diretamente ligados ao desenvolvimento de tolerância, dependência e abstinência à droga. A tolerância leva os usuários a um aumento

da dosagem e frequência do uso. O aparecimento da síndrome de abstinência estimula o uso contínuo, levando o usuário à dependência (Ashton, 2001; Hall, 2015).

A fumaça de *Cannabis* contém muitas substâncias químicas similares às encontradas na fumaça de cigarro. Embora não haja evidências suficientes para afirmar que o uso de *Cannabis* esteja relacionado com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema pulmonar e obstrução de vias aéreas, os usuários que fumam *Cannabis* regularmente podem ter sintomas e agravamentos análogos nos pulmões quando comparados aos usuários de tabaco (Tashkin, 2013; Lee e Hancox, 2011). Os sintomas e problemas respiratórios como aumento da tosse, expectoração, falta de ar (dispneia), doença pulmonar bolhosa, hiperinsuflação pulmonar, sibilos, faringite, rouquidão da voz, bronquite crônica e agravamento dos sintomas de asma, podem ocorrer em usuários que fumam *Cannabis* regularmente (Tashkin, 2013; Bechtold et al., 2015).

Estudos *in vitro* tem demonstrado que o THC por si só pode exercer efeitos adversos nas células epiteliais pulmonares e supressão de células imunológicas (Sarafian et al., 2003; Sarafian et al., 2005; Yuan et al., 2002). Na fumaça da *Cannabis* quando inalada, parte do THC que está na fase particulada é depositado sobre a mucosa respiratória representando potencial impacto na função celular, podendo causar modificações estruturais e funcionais nas vias aéreas e no parênquima pulmonar a longo prazo (Lutchmansingh et al., 2014).

No entanto, estudo realizado em roedores por Calignano et al. (2000) mostrou que o THC ao se ligar a receptores CB1 expressos em terminais

axônicos nos nervos vagais das vias aéreas, pode causar um efeito broncodilatador de curta duração nas vias aéreas. Sabe-se, no entanto, que fumar *Cannabis* não possui papel terapêutico para doenças obstrutivas das vias aéreas como a asma, e que ao contrário disso, as consequências a longo prazo incluem inflamação das vias aéreas, edema e hipersecreção de muco (Roth et al., 1998; Joshi et al., 2014).

Apesar de nenhum estudo comprovar a relação do uso de *Cannabis* com o desenvolvimento do câncer, sua fumaça contém produtos químicos potencialmente carcinogênicos, além disso, os efeitos negativos relacionados ao uso da *Cannabis* são agravados quando um usuário também fuma regularmente tabaco (Taylor et al., 2003).

2.4.1. Uso recreacional e efeitos adversos durante a gravidez

As significativas alterações anatômicas e fisiológicas que ocorrem durante a gravidez nos sistemas cardiovascular, respiratório, hematológico, renal, gastrointestinal e endócrino são resultantes da adaptação materna à gravidez. Essas alterações fisiológicas e adaptações são necessárias para permitir o desenvolvimento do feto e permitir que a mãe e o feto sobrevivam às demandas do parto (Tan e Tan, 2013).

O sistema respiratório durante a gravidez é afetado por fatores bioquímicos (mudanças no padrão hormonal) e mecânicos (alterações na parede torácica e do diafragma para acomodar expansão do útero) que alteram a função pulmonar, o padrão ventilatório e a troca gasosa (LoMauro e Aliverti, 2015). O

aumento de progesterona e estrogênio durante a gravidez alteram o equilíbrio broncoconstritor e broncodilatador das vias aéreas. O aumento de estrógeno na mucosa das vias aéreas superiores causa hiperemia, hipersecreção e edema, podendo levar a obstrução nasal (Hegewald e Crapo, 2011).

As células T maternas adquirem um estado transitório de tolerância durante a gravidez, especificamente para antígenos fetais herdados do pai, protegendo contra a rejeição. Inicialmente a gravidez produz um ambiente de imunossupressão na função de células NK (*natural killer*), células fagocitárias e outras células envolvidas na citotoxicidade, principalmente pelo aumento nos níveis de progesterona (Robinson e Klein, 2012). Outra importante adaptação que leva à tolerância durante a gravidez humana é a supressão de citocinas tipo Th1 na resposta dos linfócitos, levando a uma prevalência na resposta do tipo Th2 (Pouwels-Fry et al., 2009). Embora as alterações na fisiologia respiratória sejam notavelmente toleradas, a eficiência da capacidade imunológica de lidar com insultos respiratório pode mostrar-se vulnerável para algumas doenças como pneumonia, tuberculose e influenza (McCormack e Wise, 2009; Silasi et al., 2015; Le Gouez et al., 2016).

Recentes estudos têm relacionado a exposição pré-natal às substâncias químicas contidas nos poluentes atmosféricos, na fumaça proveniente do tabagismo e abuso de drogas, com as potenciais consequências envolvendo distúrbios no desenvolvimento fetal e de doenças que se manifestam na infância, podendo persistir ao longo da vida (Perera e Herbstman, 2011). Alguns destes compostos como os HPAs, CO, alguns fitocanabinóides (como o THC), cocaína,

anfetaminas e nicotina são capazes de atravessar a barreira placentária e podem ser excretados no leite materno (Ganapathy et al., 1999; Jauniaux et al., 1999).

Quando a gestante fuma maconha o feto é exposto a quantidades descontroladas de THC e produtos tóxicos provenientes da pirólise (como CO e HPAs). Os relatos na literatura são pouco esclarecedores quanto as consequências adversas no desenvolvimento fetal em uma situação de exposição gestacional (Hayatbakhsh et al., 2012; Huizink, 2014; Morris et al., 2011).

2.5. Desenvolvimento Pulmonar

O sistema respiratório origina-se a partir do intestino primitivo. O broto primordial pulmonar e a traqueia emergem simultaneamente da endoderme na parte ventral do intestino primitivo. O broto primordial dará origem aos brotos iniciais esquerdo e direito. Este processo inicial descrito acima é marcado pela expressão do fator de transcrição Nkx2.1 em camundongos (Swarr e Morrissey, 2015). A porção proximal do sistema respiratório (traqueia, laringe e brotos iniciais) se separa do esôfago para formar os dois brônquios principais. Ao final deste período chamado de fase embrionária, o desenvolvimento pulmonar é dividido em mais 4 estágio subsequentes: pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar (Burri, 2006).

Os brotos pulmonares primários, gerados a partir da estrutura da via aérea proximal, vão dar origem a porção distal que compreendem os brotos secundários e terciários, os quais formarão a árvore brônquica. O epitélio

pulmonar proximal é gerado a partir de progenitores de endoderme expressando o fator Sox2 que se diferenciam em linhagens ciliadas, secretoras e basais durante o desenvolvimento (Swarr e Morrisey, 2015).

Este processo de sucessivos brotamentos e ramificações é chamado de *branching* e são característicos do estágio pseudoglandular (figura 1A e B) (Cardoso, 2001; Cardoso e Kotton, 2008). O crescimento inicial dos brotos pulmonares primários e *branching* são sinalizados por múltiplas vias de sinalização, incluindo as vias do FgF (*Fibroblast growth fator*), pela expressão de FgF10 e FgF2, que promove o crescimento e a formação de novos ramos e Shh (*Sonic Hedgehog*), que restringe este processo por feedback negativo e possivelmente inibindo a expressão de FgF10 (Iber e Menshykau, 2013; Swarr e Morrisey, 2015).

No pulmão, a região cranial desenvolve-se mais rapidamente do que a região caudal, ocorrendo uma sobreposição parcial da fase canalicular na fase pseudoglandular. Durante a fase canalicular, a árvore respiratória continua expandindo em diâmetro e comprimento, acompanhada de vascularização e angiogênese ao longo das vias aéreas. Os bronquíolos terminais são então divididos em bronquíolos respiratórios e ductos alveolares, e na fase final da gestação as células epiteliais distais das vias aéreas são diferenciadas em pneumócitos tipo I e pneumócitos tipo II (figura 1C) pela expressão de Sox9 / Id2 (Swarr e Morrisey, 2015), formando sáculos. Uma rede de capilares e vasos linfáticos são formados ao redor dos sáculos que seguidamente são subdivididos pelo processo de septação em alvéolos (figura 1D). A fase alveolar ou alveolização é a última etapa do desenvolvimento pulmonar, onde a maior parte

da superfície de troca gasosa é formada (Cardoso e Kotton, 2008; Warburton et al, 2010).

Figura 1 - Esquema mostrando a fase inicial de desenvolvimento do sistema respiratório em camundongos. **A** - O intestino primitivo (endoderme) dará origem a órgãos como a tireoide, traqueia, pulmão, fígado e pâncreas. Aproximadamente no 9,5º dia da idade gestacional, a traqueia e os brotos pulmonares primários começam a crescer. Seguidamente entre o 9,5º e 10º dia, os brotos primários alongam-se, enquanto que o primórdio traqueoesofágico começa a se separar do esôfago primitivo pelo crescimento de um septo traqueoesofágico. No 10,5º dia os brotos primários dão origem aos brotos secundários do pulmão (início do *branching*) (representado pelas setas vermelhas 1 e 2 respectivamente). **B** - Entre o 11º e 16,5º dia, o *branching* se mantém constante (sentido proximal-distal) até formar a árvore brônquica (setas 1, 2, 3, representam os brotos primários, secundários e terciários, respectivamente). **C** - Entre os dias 17º e 18º as células epiteliais distais das vias aéreas se diferenciam

em pneumócitos do tipo I e II e se expandem para formar os sáculos. **D** - Na fase pós-natal entre o 3º e 14º dia os sáculos são subdivididos pelo crescimento secundário do septo (septação) dando origem à alvéolos maduros (Adaptado de Cardoso e Kotton, 2008).

O sistema respiratório desenvolve-se no período pré-natal e pós-natal, apresentando diferenças no tempo e duração das fases dependendo da espécie (Cardoso e Kotton, 2008). Em mamíferos a ramificação das vias aéreas acontece exclusivamente no período pré-natal. Já a formação dos alvéolos abrange os períodos pré-natal e pós-natal e em espécies como o rato e camundongo este período ocorre somente no período pós-natal (figura 2) (Cardoso, 2001).

Figura 2 - Representação das fases do desenvolvimento pulmonar em Camundongo (fase embrionária 8,5º-9,5ºd; fase pseudoglandular 9,5º-16,5ºd; fase canalicular 16,5º-17,5ºd; fase sacular 17,5º-5ºd e fase alveolar 5º-30ºd) e humanos (fase embrionária 4º-7ºs; fase pseudoglandular 7º-17ºs; fase canalicular 17º-26ºs; fase sacular 27º-36ºd; fase alveolar 36ºs-2 anos e aproximadamente até os 18 anos os pulmões continuam crescendo e expandindo). d=dias; s=semanas (Cardoso e Kotton, 2008; Miller e Marty, 2010).

Em camundongos, o desenvolvimento pulmonar pós-natal não é bem caracterizado, sobretudo no momento em que a alveolização está completa.

Estudos sugerem que fase de alveolização continua após os septos alveolares terem atingido a maturidade, podendo persistir até a idade adulta (Mund et al., 2008).

3. JUSTIFICATIVA

A *Cannabis sativa* é a droga ilícita mais usada entre as gestantes e os insultos sofridos durante o período do desenvolvimento fetal podem ocasionar consequências mais tarde na vida, porém estudos investigando os efeitos desta exposição na saúde materna e fetal ainda são escassos. Além disso, os efeitos da exposição gestacional da *Cannabis* sobre o desenvolvimento pulmonar ainda foram pouco explorados.

4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

4.1 *Objetivo geral*

Os objetivos deste estudo são:

- Analisar os efeitos do uso de *Cannabis sativa* no tecido pulmonar de camundongos fêmeas gestantes.
- Analisar os efeitos do uso de *Cannabis sativa* no desenvolvimento pulmonar de filhotes de camundongos, cujas mães foram expostas durante a gestação.

4.2 *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos do estudo no pulmão de camundongos fêmeas grávidas expostas a fumaça de *Cannabis* e ao ar filtrado são:

- Avaliar os parâmetros inflamatórios no lavado bronco-alveolar (LBA);
- Avaliar as alterações morfológicas no tecido pulmonar pela técnica estereológica;
- Avaliar as alterações de remodelamento tecidual pulmonar (análise quantitativa de fibras colágenas e elásticas)

Os objetivos específicos do estudo no desenvolvimento pulmonar dos filhotes de camundongos são:

- Avaliar as alterações morfológicas no tecido pulmonar pela técnica estereológica nos fetos com 18,5 dias de idade gestacional (grupo representante da fase canalicular) provenientes de fêmeas expostas durante a gestação a *Cannabis sativa* e ao ar filtrado;
- Avaliar as alterações morfológicas no tecido pulmonar pela técnica estereológica na prole com 20 dias de idade (grupo representante da fase alveolar) provenientes de fêmeas expostas durante a gestação a *Cannabis sativa* e ao ar filtrado;
- Avaliar as alterações morfológicas no tecido pulmonar pela técnica estereológica na prole com 60 dias (grupo representante da fase alveolar tardia) de idade provenientes de fêmeas expostas durante a gestação a *Cannabis sativa* e ao ar filtrado;
- Quantificação de fibras colágenas nos fetos provenientes de fêmeas expostas durante a gestação a *Cannabis sativa* e ao ar filtrado;
- Quantificação fibras colágenas e elásticas nas proles com 20 e 60 dias de idade provenientes de fêmeas expostas durante a gestação a *Cannabis sativa* e ao ar filtrado.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas com aproximadamente 3 meses de idade da linhagem BALB/c. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Criação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), através do protocolo de pesquisa n°374/13 aprovado pela CEUA-FMUSP (Comissão de Ética no Uso de Animais) (documento anexado no item 9 anexo B). Para a utilização dos materiais coletados (pulmões) proposto para este projeto, a CEUA-FMUSP aprovou o protocolo de pesquisa n°043/15.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMUSP com temperatura (22 a 25°C), 70% de umidade relativa, ciclo de luz 12 horas claro/12 horas escuro e água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do centro de bioterismo da FMUSP, sendo que todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo.

5.2 Droga

A *Cannabis sativa*, contendo 0,3% de Δ^9 -THC, utilizada neste estudo foi doada para fins científicos pelo Núcleo de Perícias Médico Legal - Instituto de Criminalística de Marília, legalmente autorizado pela 3° Vara Criminal da Comarca de Marília, São Paulo, Brasil (documento anexado no item 9 anexo A).

A droga é proveniente de uma apreensão de entorpecentes realizada pela polícia local (Benevenuto et al., 2017).

5.3 Grupos experimentais

Previamente e durante 7 dias consecutivos, todas as fêmeas foram treinadas para familiarização e adaptação com os procedimentos experimentais e com os pesquisadores. Após o período de familiarização e adaptação, as fêmeas foram colocadas em gaiolas com os machos para acasalar, na proporção de duas fêmeas para um macho (Veras et al., 2009). O 0,5 dia gestacional foi determinado pela observação do “plug” vaginal ou pela presença de espermatozoides no lavado vaginal evidenciando a ocorrência do acasalamento.

As fêmeas grávidas foram divididas em 6 grupos (n=5 por grupo), conforme representado na figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental. Legenda: **DG** – dias gestacionais; **DPN** – dias pós-natal; **M18** – grupo 1; **C18** – grupo 2; **M20** – grupo 3; **C20** – grupo 4; **M60** – grupo 5; **C60** – grupo 6.

Abaixo segue a descrição de cada grupo:

Grupo 1: Fetos coletados de fêmeas grávidas expostas à fumaça da *Cannabis sativa* desde do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação, sendo a eutanásia realizada no 18,5º dia de gestação (M18) para a coleta dos fetos.

Grupo 2: Fetos coletados de fêmeas grávidas expostas ao ar ambiente desde do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação, sendo a eutanásia realizada no 18,5º dia de gestação (C18) para a coleta dos fetos.

Grupo 3: Prole com 20 dias de idade proveniente de fêmeas grávidas expostas à fumaça da *Cannabis sativa* desde do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação (M20).

Grupo 4: Prole com 20 dias de idade proveniente de fêmeas grávidas expostas ao ar ambiente desde do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação (C20).

Grupo 5: Prole com 60 dias de idade proveniente de fêmeas grávidas expostas à *Cannabis sativa* desde do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação (M60).

Grupo 6: Prole com 60 dias de idade proveniente de fêmeas grávidas expostas ao ar ambiente desde do 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação (C60).

As fêmeas grávidas expostas a fumaça da *Cannabis* (**Grupo Mães MA**) e ao ar filtrado (**Grupo Mães AF**) que foram utilizadas nos grupos 1 e 2, representam os indivíduos do estudo realizado no tecido pulmonar e coleta do

LBA de camundongos fêmeas grávidas, conforme descritos previamente no item Objetivos Gerais e Específicos 4.1 e 4.2.

5.4 Protocolo de exposição

As exposições das fêmeas grávidas foram conduzidas durante 5 minutos, uma vez por dia, durante 13 dias seguidos (do 5,5º dia de gestação ao 17,5º dia de gestação). Os grupos controle foram submetidos à inalação de ar filtrado, com as mesmas características de tempo e periodicidade dos animais expostos à fumaça de *Cannabis sativa*. Os “cigarros” confeccionados para o estudo continham 0,2g da droga. O conteúdo de cada cigarro de *Cannabis* foi manualmente inserido dentro dos invólucros (tubos) de cigarros brancos disponíveis comercialmente. Isto permitiu-nos preparar cigarros padronizados.

5.4.1 Câmara de exposição

O sistema de exposição representado na figura 4, é composto de uma bomba que sopra ar através de um filtro HEPA em um amortecedor de pulso. O fluxo de ar é dividido em duas direções que passam através das válvulas que controlam o fluxo. Um fluxo vai para a câmara de fumaça e o outro vai diretamente para a câmara de mistura. A câmara de fumaça é uma caixa vedada de 1L de volume com uma abertura para o fluxo de ar, criando uma pressão positiva que obriga o fluxo de ar a passar através do cigarro, e, consequentemente, a fumaça flui para a câmara de mistura. A câmara de mistura é outro compartimento vedado de 1L de volume com um anteparo para promover

o processo de mistura. A mistura de ar com fumaça é conduzida para a câmara onde as fêmeas ficam dispostas em suportes tubulares individuais. O fluxo da fumaça foi controlado a 1,2 L/min. O cigarro preparado de *Cannabis* teve uma duração de 5 minutos de exposição neste sistema. Um sistema idêntico foi construído para realizar exposições com o grupo controle.

Figura 4 - Representação esquemática do sistema de exposição das fêmeas grávidas à fumaça da queima da *Cannabis sativa* (Adaptado do desenho desenvolvido por Marco Antonio Garcia Martins).

5.4.2 Análise e caracterização de HPAs

A análise de detecção de HPAs presentes na fumaça de *Cannabis sativa* provenientes do sistema de exposição (figura 4), foram conduzidas pela técnica

de cromatografia gasosa com detector de massa acoplado (GC-MS). As amostras de fumaça foram coletadas em quatro tubos adsorventes XAD (Orbo 32 – Supelco). O método de extração da fumaça após ser coletada 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 foi extraído e 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 presente estudo: Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, benz[a]antraceno, Criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]Perileno.

5.4.3 Análise de caracterização da exposição

A exposição materna foi caracterizada pela presença de metabólitos Δ^9 -THC (THC - COOH) em amostras de urina. A urina foi recolhida a cada 24 horas

após a exposição, de acordo com o protocolo de Khosho et al. (1985). As análises foram conduzidas pela técnica GC-MS conforme descrição a seguir:

Foram utilizados os seguintes reagentes químicos para a análise GM-MS: hidróxido de sódio (Merck,- Darmstadt, Alemanha, Reino Unido), ácido acético (Merck - Darmstadt, Alemanha, Reino Unido), hexano (Sigma-Aldrich-Sigma Aldrich - St. Louis, MO, EUA), acetato de etilo (LabSynth São Paulo, Brasil, BR), BSTFA (N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) em 1% TMCS (Trimetilclorossilano) (Cerilliant/Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA) e padrões: THC, CBD, CBN, THC-COOH em 1mg/concentração de 1 µg/mL e D3 THC/mL) (Cerilliant/Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA).

As amostras de urina (200µL) foram hidrolisadas com NaOH. Após a hidrólise, a solução foi acidificada e, em seguida, extraiu-se por mistura de hexano/acetato de etilo (9/1). A camada orgânica foi recolhida e seca sob corrente de azoto. O extrato foi derivado com a adição de 50 µL de BSTFA com 1% TMCS e incubou-se a 80°C durante 30 min. Um microlitro da solução final foi, em seguida, injetado na coluna de cromatografia de gás. Como um padrão interno, foi utilizado 50 µL de D3 THC (1µg/mL).

As análises foram realizadas em um sistema GC-MS (7820A + 5975 MSD) (Agilent Technologies) com um HP-5 MS equipado com uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e usando uma injeção *splitless*. A temperatura de injeção foi de 280°C. O gás transportador, hélio, a uma taxa de fluxo de 1mL/min e o volume de injeção de 1µL. A temperatura da coluna foi mantida a 170°C durante 0,5min e, em seguida, aumentada para 200°C a uma velocidade de 35°C/min. A temperatura foi subsequentemente elevada para 290°C a uma

velocidade de 20°C, a cada 2 min. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C. As temperaturas da fonte de íons e quadripolos foram mantidas a 280°C e 200°C, respectivamente. Modo de monitoração iônica seletiva (SIM) foi usado com um tempo de pausa de 50 ms. Os tempos de retenção foram 5,90 e 6,66 minutos para THC-D3 e THC-COOH, respectivamente. Os seguintes íons qualitativos (m/z) foram analisados: THC-d3, 306, 374, 389; THC, 303, 315, 371, 386; e THC-COOH, 371, 372, 473, 488.

5.5 Eutanásia dos animais e coleta

Após o término de período de exposições de 13 dias consecutivos (desde o 5,5º dia de gestação até o 17,5º dia de gestação), as fêmeas grávidas dos grupos 1 e 2, foram eutanasidas no 18º dia de gestação. As fêmeas grávidas previamente sedadas com anestésico inalatório isoflurano e eutanasiadas por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (200 mg.kg⁻¹ peso corporal).

A parede abdominal foi aberta imediatamente, os vasos uterinos ligados e o útero cuidadosamente removido e examinado para a determinação dos sítios implantacionais, reabsorções, fetos vivos e mortos. A ligadura dos vasos sanguíneos uterinos é feita para que não ocorra perda do sangue placentário na remoção do útero. Seguidamente à remoção do útero da cavidade abdominal, foi realizada a dissecação e separação dos fetos, placenta e cordão umbilical. Em metade dos fetos de cada fêmea, os pulmões foram separados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para futuras análises que se façam necessárias. A outra metade dos fetos foram colocados em imersão na

solução de formol (4%) e depois de 24 horas transferidos para a imersão em álcool 70% até o momento da dissecação dos fetos para a coleta dos pulmões.

As fêmeas grávidas foram pesadas, traqueostomizadas e canuladas e nos pulmões foram realizadas três lavagens de 0,5 mL de PBS cada e aproximadamente 1 mL de LBA foi recuperado. Após a coleta do LBA, os pulmões foram removidos da cavidade torácica, insuflados e fixados por imersão em paraformaldeído 4% tamponado (em PBS) durante 24 horas para a avaliação estereológica.

Após o período de 20 (grupo 3 e 4) ou 60 (grupo 5 e 6) dias após o nascimento, os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (200 mg.kg^{-1} peso corporal) e pesados. Nestes animais não foi realizado o procedimento do LBA. Assim, por uma toracotomia mediana os pulmões foram expostos, o lobo direito foi isolado ligando-se o brônquio direito com fio de sutura 6.0. Em seguida a traqueia foi canulada e o pulmão esquerdo insuflado com aproximadamente 0,4 mL de solução salina 0,9%. Após a insuflação, o brônquio esquerdo foi ligado e os pulmões removidos e separados. O pulmão direito foi dividido em três fragmentos, sendo que dois foram acondicionados em criotubo e mantidos no freezer -80°C e um fragmento fixado em glutaraldeído, para futuras análises ultraestruturais. O pulmão esquerdo foi mantido em solução fixadora de paraformaldeído 4% tamponado (em PBS) por 24 horas e posteriormente em álcool 70% até a realização das análises estereológicas.

5.6 Estudo estereológico dos pulmões

A estereologia vem sendo aplicada para a quantificação de estruturas pulmonares desde 1963 (Weibel, 1963). Recentemente, uma ação conjunta da ATS (*American Thoracic Society*) e da ERS (*European Respiratory Society*) padronizou os métodos estereológicos para o pulmão. Neste estudo seguimos as recomendações da ATS-ERS (Hsia et al., 2010).

5.6.1 Estudo estereológicos dos pulmões dos fetos

Nos fetos foram avaliados o volume total e os volumes totais e densidades de volume do mesênquima, sacos alveolares (pré-alvéolos), vias aéreas e vasos sanguíneos (figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografia representativa do tecido pulmonar (coloração H&E) dos fetos em 20x, grupos 1 e 2. Legenda: **VA** – via aérea; **VS** – vaso sanguíneo; **SA** – saco alveolar; o mesênquima está representado pelas setas verdes.

A amostragem do pulmão foi realizada de forma sistemática uniforme e randômica. A quantificação dos parâmetros pulmonares avaliados foi conduzida em cortes verticais. Assim para a amostragem, os pulmões inteiros (incluindo as estruturas do hilo) foram incluídos em blocos de parafina. O maior eixo do órgão foi definido como eixo horizontal. O bloco foi seccionado verticalmente (perpendiculares ao eixo horizontal) em cortes de 5µm. As fatias produzidas foram coradas com H&E.

Para estimar o volume de determinado órgão sem cavidades e com densidade específica aproximada ao valor de 1, pode-se utilizar o peso do próprio órgão. Portanto, para determinar o volume pulmonar de referência (total), o peso do pulmão foi convertido em volume (V_{pul} , cm^3) dividindo-se pela densidade do tecido, considerada $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$ (ICRP, 2002).

Aos métodos utilizados para determinar densidades de volume, densidades de superfície e áreas de superfície dos compartimentos pulmonares foram conduzidos como descritos no item Material e Método 5.6.2.3 e 5.6.2.4.

5.6.2 Estudo estereológico dos pulmões das fêmeas grávidas e das proles de 20 e 60 dias

Os seguintes parâmetros foram avaliados: volume pulmonar total, volume total e densidade de volume dos compartimentos pulmonares: parênquima pulmonar (excluindo-se brônquios, vasos, septos inter-lobulares, linfonodos); vias aéreas; vasos sanguíneos; espaços aéreos alveolares; septos alveolares

(pneumócitos e capilares); áreas de superfície total e densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.

5.6.2.1 Amostragem e inclusão

A amostragem do pulmão foi feita de forma sistemática uniforme e randômica. A quantificação dos parâmetros pulmonares avaliados foi conduzida em cortes verticais. Assim para a amostragem, os pulmões inteiros (incluindo as estruturas do hilo) foram incluídos em blocos de ágar (12%). O esquema da amostragem é mostrado na figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. **A e B** - preparação do ágar a 12%; **C** - pulmão a ser incluído; **D** - inclusão do pulmão em ágar; **E e F** - Cortes verticais seriados; **G** - Fatias obtidas para a estimativa do volume total pulmonar pelo método de Cavalieri (Fotos: Natália de Souza Xavier Costa).

5.6.2.2 Volume Pulmonar (“Reference Space”)

O volume pulmonar foi estimado pelo método de Cavalieri. Por este método é possível estimar o volume de um objeto de forma arbitrária, seccionando-o em fatias paralelas equidistantes e multiplicando-se a distância entre os cortes pela somatória das áreas das faces de corte. As áreas das faces de corte ou transectos pode ser obtida facilmente pelo método de contagem de pontos. Para este fim, um sistema teste de pontos (de área associada ao ponto (ap) conhecida) foi sobreposto às fatias de ágar e os pontos incidentes sobre o compartimento de interesse foram contados em todas as fatias. Assim o volume foi obtido aplicando-se a fórmula:

$$V_{\text{pulmão}} = \sum p_t \times a(p) \times T$$

onde p_t são os pontos incidentes sobre o pulmão, $a(p) = 9 \text{ mm}^2$ e T é a espessura das fatias produzidas no ágar (neste caso 2mm).

5.6.2.3 Volume (V) e Densidade de Volume (Vv) dos Compartimentos Pulmonares

O método de contagem de pontos foi utilizado para estimarmos as densidades de volume das estruturas pulmonares de interesse: parênquima pulmonar, vias aéreas, vasos sanguíneos, espaços aéreos alveolares e septos alveolares (pneumócitos e capilares).

Para esta análise os blocos de parafina foram seccionados em cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura e dois pares de cortes consecutivos de cada bloco, distantes $300\mu\text{m}$ foram coletados em lâminas de vidro histológicas. Cortes

randomicamente selecionados também foram coletados em lâminas silanizadas para estudos imunohistoquímicos adicionais. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina-eosina.

A geração e sobreposição dos sistemas teste de pontos bem como as contagens foram realizadas com auxílio do programa ImageJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>] (figura 7). Os pontos incidentes sobre as diferentes estruturas pulmonares (vias aéreas, vasos sanguíneos, espaços aéreos alveolares e septos alveolares) e sobre o parênquima pulmonar (como um todo) foram contados em todos os campos e a densidade de volume foi obtida pela fórmula:

$$V_{vcomp} = \Sigma pt_{comp} / \Sigma pt_{parênquima}$$

onde Σpt_{comp} e $\Sigma pt_{parênquima}$ referem-se a soma de todos os pontos contados em todos os campos analisados de cada pulmão.

O volume total de cada compartimento foi convertido em volume absoluto (total) multiplicando-se a densidade de volume (V_{vcomp}) pelo volume total do espaço de referência correspondente, neste caso que pode ser o pulmão ou o parênquima pulmonar dependendo do parâmetro a ser avaliado.

$$V_{comp} = V_{vcomp} \times V_{pulmão \text{ ou } parênquima}$$

Figura 7 - A e B - Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa das densidades de volume dos compartimentos pulmonares. **C** - Sistema teste de arcos ciclóides para estimativa de áreas de superfície. Os pontos neste sistema teste são representados pelas extremidades dos arcos.

5.6.2.4 Áreas de superfície total e Densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos

Quando avaliamos áreas de superfície é importante randomizarmos a orientação, pois esta medida é influenciada pela orientação da estrutura. Assim como foi aplicada a metodologia de cortes verticais. Da mesma forma e nos mesmos campos que foram utilizados para as medidas de volume, foi utilizado um sistema teste de arcos cicloides (figura 7C). Nesta análise as intersecções entre os arcos e os limites da superfície da estrutura analisada foram contadas. E, aplicando-se os dados nas fórmulas a seguir obtivemos as estimativas de densidade de área das estruturas:

$$Sv_{comp} = 2 \times \sum l_{comp} / \sum pt_{comp} \times l(p)$$

onde $l(p)$ é o comprimento da linha, Σl é o número total de intersecções entre os cicloides e o compartimento de interesse e Σpt é o número de pontos no compartimento de interesse.

As áreas de superfície absolutas foram obtidas aplicando-se a fórmula:

$$St_{comp} = Sv_{comp} \times V_{tpulmão}$$

onde Sv_{comp} é densidade de volume do compartimento analisado e $V_{tpulmão}$ é o volume total dos pulmões.

5.6.2.5 Estimativa da espessura dos septos alveolares (Arithmetic mean thickness)

A espessura dos septos alveolares foi derivada a partir da média aritmética (AMT_{septo}) aplicando-se a seguinte fórmula:

$$AMT_{septo} = 2 \times V_{tsepto} / St_{septo}$$

onde V_{tsepto} é o volume total dos septos alveolares e St_{septo} é a área de superfície total dos septos alveolares.

5.6.2.6 Estimativa do volume médio alveolar, densidade numérica alveolar (N_v) e do número total de alvéolos (N_t) das proles de 20 e 60 dias

Para estimar o número de alvéolos foi utilizado o método do dissector físico (*physical disector*) (Ochs et al., 2004), sendo aplicado a característica de Euler (Knust et al., 2009). A característica de Euler (número de Euler) permite-

se estimar o número de partículas de um objeto em 3D como um todo, baseado em observações de alterações topológicas em plano 2D de intersecções – dissectors, independente de sua forma, da direção e orientação de varredura aplicada no objeto. Em outras palavras, analisando os padrões de uma fatia (dissector) e comparando com os padrões das fatias consecutivas desse objeto (Gundersen et al., 1993).

A cada 100 μm foi examinado um par de cortes histológicos separados por 5 μm . A princípio, os cortes de cada par de lâminas coradas com H&E foram digitalizadas com auxílio do escâner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHisTech Ltd. Budapest, Hungary) e as imagens foram fotomicrografadas com auxílio de software Pannoramic Viewer (3DHisTech, Budapest, Hungary) com aumento de 20X.

As imagens dos cortes histológicos do tecido pulmonar de um mesmo par foram impressas e sobre cada imagem foi sobreposto um sistema teste constituído por um quadrado de área fixa e conhecida (frame de 34.574,40 μm^2 para as proles de 20 dias - frame de 44.438,88 μm^2 para as proles de 60 dias) delimitado por 4 linhas. As linhas limitantes superior e esquerda foram denominadas de linhas de inclusão e as linhas inferior e direita, linhas de exclusão. Foram contados os alvéolos “*bridges*” que não tocaram as linhas de exclusão e estavam presentes no plano de contagem, mas não plano de referência. As contagens das “*bridges*” foram feitas inicialmente do plano A de referência para o plano B de contagem (A→B) e seguidamente do plano B como referência e plano A como contagem (B→A) (figura 8).

Figura 8 – Exemplo da aplicação do dissecador físico nas proles de 20 e 60 dias de idade. **A** e **B** são fotomicrografias (20x) de cortes subsequentes (5 μ m) de tecido pulmonar de camundongos com 60 dias de idade, e representam os pares (fatias) consecutivos (Coloração H&E). Os quadrados com área fixa desenhados na imagem representam as frames (ferramenta usada para delimitar a área de contagem das “bridges”). As linhas vermelhas das frames representam as regiões de exclusão para a contagem. O plano **A** é utilizado como referência para a contagem das “bridges” na imagem de amostragem representada no plano **B**. Seguidamente, o plano **B** é utilizado como referência para a contagem das “bridges” na imagem de amostragem representada no plano **A**. As setas verdes indicam as estruturas de contagem “bridges” ausentes na frame de referência **A**. A seta vermelha mostra um exemplo de “bridge” na região de exclusão.

Em cada pulmão foram aplicados 20 pares de dissectores, segundo a dimensão do corte histológico.

Para se calcular a densidade numérica de alvéolos (N_v) dividiu-se a quantidade de alvéolos contados em cada pulmão pelo volume total amostrado pela aplicação dos dissectores no mesmo pulmão.

$$N_v \text{ de alvéolos} = \frac{Q^-}{A_T \times h \times n}$$

onde, Q^- é o número de alvéolos contados, A_T é a área do sistema teste e h é a distância entre os cortes adjacentes e n é número de pares contatos em cada pulmão; desta forma, o denominador da equação corresponde ao volume amostrado por pulmão.

Para se estimar a quantidade total de alvéolos (N_t) multiplicou-se o valor da densidade numérica pelo volume total do parênquima.

$$N_t \text{ alvéolos} = N_v \text{ de alvéolos} \times V_t \text{ Parênquima}$$

onde, N_v é a densidade numérica de alvéolos e V_t parênquima é o volume total do parênquima.

5.7 Protocolo de análise do lavado bronco-alveolar

O LBA foi centrifugado (1000 rpm durante 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante coletado e separado. O botão de células foi ressuspensionado em 300µl de PBS, homogenizado e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. Para a avaliação de número total de células, 20µl do “*pellet*” ressuspensionado foi colocado em uma câmara de Neubauer. Para estimar o número total de células usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Contagem total de células} = \text{contagem total} \times 10^5 \times \text{diluição da amostra}$$

Para avaliação diferencial das células foi utilizada uma centrífuga de células (Cytospin 3 - Shandon) para a confecção das lâminas. A centrífuga de células permite o preparo de esfregaços das suspensões celulares para uma análise morfológica e prepara uma monocamada de células numa área definida. O Cytospin é composto por um suporte para lâmina com um funil plástico seguida de um cilindro, onde a amostra ressuspensionada é colocada. Entre a lâmina e o suporte é colocado um molde espesso de papel de filtro perfurado exatamente no local de encontro com o cilindro que depositará as células na área pré-determinada (Araújo-Jorge et al., 2000).

Desta forma, lâminas devidamente limpas e identificadas foram acopladas a centrífuga de células, 100µl das amostras foram pipetadas nos funis e centrifugadas por 6 minutos a uma velocidade de 450 rpm. Depois das lâminas estarem secas, elas foram coradas com o auxílio do Kit Instant Prov - conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia (NewProv). Posteriormente as lâminas foram montadas com resina para microscopia

Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após a realização do protocolo descrito acima as lâminas foram digitalizadas com o auxílio do escâner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e as análises foram feitas com a ajuda do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Durante a análise, as células foram classificadas em: macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e células epiteliais.

5.8 Análise de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

Para a análise de colágeno total, as lâminas foram coradas com *Picrosirius red*. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70%- água). Em seguida, as lâminas foram coradas com *Sirius red* por 15 minutos e lavadas em água corrente. Depois as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi por 5 minutos e lavadas novamente em água corrente. Por fim, as lâminas foram desidratadas em gradiente de álcool (70% - 95% - absoluto), passadas no xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Nesta coloração as fibras colágenas se coram em vermelho vivo.

Para a análise de fibras elástica, as lâminas foram coradas com Resorcina Fucsina oxidada. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70% - água). Em seguida, as lâminas foram oxidadas em solução de oxona 10% por 40 minutos, lavadas com água por 5 minutos e passadas rapidamente por álcool 70% e 96%. Depois as lâminas foram coradas

com resorcina-fucsina por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas por mais 5 minutos. As lâminas foram diferenciadas em álcool 70% até ser possível ver apenas as fibras elásticas em roxo escuro. Por fim, as lâminas foram desidratadas em gradiente de álcool (95% - absoluto), passadas no xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A análise com as lâminas coradas para determinar a quantidade estimada de colágeno e fibras elásticas foram realizadas nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. A amostragem do material foi realizada em cortes verticais de 5µm. A princípio, as lâminas foram digitalizadas com auxílio do escâner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd. Budapest, Hungary).

Foram selecionadas cinco vias aéreas cortadas transversalmente por animal para a análise. Em cada via aérea foi medido o perímetro da membrana basal, diâmetro maior, diâmetro menor, área total e área positivamente marcada (um espectro de cor previamente definido para cada coloração a partir de lâminas do próprio estudo) com o auxílio do software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics –Silver Spring MD, USA). A área selecionada para a quantificação de fibras colágeno/elástica foi determinada a partir da membrana basal até o limite da inserção dos septos alveolares.

No parênquima pulmonar foram selecionados 10 campos excluindo-se vias aéreas e vasos sanguíneos para a análise. Em cada campo foi medida a área total do campo, área positivamente marcada (um espectro de cor previamente definido para cada coloração a partir de lâminas do próprio estudo) e área sem tecido pulmonar (branco) com o auxílio do software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics –Silver Spring MD, USA). Através

destas medidas foi possível estimar a quantidade de tecido pulmonar em cada campo (área total do campo - área sem tecido pulmonar) e a proporção de tecido marcado (área positivamente marcada / quantidade de tecido pulmonar em cada campo).

5.9 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o software estatístico SPSS 17 (SPSSinc© / IBM© Chicago, EUA). Médias, medianas, erros padrões (EP), desvios padrões (DP) ou intervalos interquartis (IQR) foram calculados para cada grupo. Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para a determinação do perfil de distribuição dos dados (paramétricos ou não paramétricos). Para a comparação das variáveis utilizamos o Teste t de Student ou teste de Mann-Whitney de acordo com a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados respectivamente. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Foi realizada uma análise multivariada (two-way ANOVA) para avaliar os efeitos da exposição à *Cannabis* e se há uma interferência do sexo (gênero) da prole. Este teste produz um termo de interação que identifica se o efeito observado é produto da exposição ou do sexo e o nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

Para a confecção dos gráficos foi utilizado GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP ou mediana (IQR) para os dados paramétricos e não paramétricos respectivamente.

6. RESULTADOS

6.1 Níveis de HPAs na fumaça de *Cannabis sativa*

Foram coletadas 4 amostras durante o período de exposição, para medir a concentração e determinar a caracterização de HPAs na fumaça proveniente da pirólise de *Cannabis sativa* no sistema de exposição. A tabela 1 apresenta os valores de concentração para cada tipo de HPA determinado em valores de média e DP.

Tabela 1 - Concentração e caracterização dos HPAs na fumaça da *Cannabis sativa* provenientes do sistema de exposição.

HPAs encontrados na fumaça de <i>Cannabis sativa</i>	Concentrações de HPAs na fumaça da <i>Cannabis sativa</i> (ng/cigarro)
	Média ± DP
Fluoreno (Flu)	27,0 ± 20
Fenantreno (Fen)	186,8 ± 47
Antraceno (Ant)	194,8 ± 57
Fluoranteno (Fla)	<LD
Pireno (Pir)	215,4 ± 94
Benz[a]antraceno (BaA)	45,0 ± 28
Criseno (Cri)	100,8 ± 90
Benzo[b]fluoranteno (BbF)	23,1 ± 27
Benzo[k]fluoranteno (BkF)	27,6 ± 30
Benzo[e]pireno (BeP)	141,5 ± 82
Benzo[a]pireno (BaP)	5,5 ± 6
Indeno[1,2,3-cd]pireno (InP)	6,6 ± 7
Dibenzo[a,h]antraceno (DBA)	8,0 ± 6
Benzo[g,h,i]perileno (BghiP)	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.

6.2 Caracterização da exposição

Foi possível detectar, identificar e confirmar a presença de THC-COOH, o principal biomarcador de exposição à *Cannabis*, em todas as 20 amostras de urina. A detecção e identificação foram realizadas por confirmação de m/z de THC-d3, 306, 374, 389; THC, 303, 315, 371 e 386 - COOH THC, 371, 372, 473, 488, além das intensidades dos picos.

6.3 Análise das células inflamatórias no LBA das mães (grupos:

Mães AF (C18) e Mães MA (M18))

Não encontramos alterações significativas no número de células inflamatórias totais e no número total de leucócitos, neutrófilo, macrófagos, linfócitos e eosinófilos entre os grupos. Os valores de mediana e (IQR) são apresentados na (tabela 2).

6.4 Avaliação histopatológica do tecido pulmonar das mães

(grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))

Na avaliação histopatológica do tecido pulmonar, o grupo controle (Mães AF) apresenta aspecto normal sem alterações significativas (figuras 8 A, B e C). No grupo das mães expostas a *Cannabis* (Mães MA), o parênquima pulmonar apresenta congestão e edema dos septos alveolares (figuras 8 D, E e F).

Figura 9 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). **A**, **B** e **C** – grupo controle (Mães AF (C18)) em 10x, 20x e 40x respectivamente; **D**, **E** e **F** – grupo exposição (Mães MA (M18)) em 10x, 20x e 40x respectivamente.

Os resultados significativos a seguir representados em gráficos contidos nos itens 6.5 a 6.17, estão representados também na forma de tabelas na seção 9. Anexo (Anexo C).

6.5 Análises morfológicas pulmonares das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))

O volume total pulmonar (mm^3) mostrou-se aumentado no grupo das mães expostas a *Cannabis* (Mães MA (M18)) ($662,40 \pm 49,94$; $p=0,009$), quando

comparado com o grupo das mães expostas ao ar filtrado (Mães AF (C18)) ($522,00 \pm 76,36$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Representação gráfica do volume total pulmonar (mm^3) das mães.

Quando normalizado pelo peso corporal, o volume total pulmonar (mm^3/g) mostrou-se aumentado no grupo das mães expostas a *Cannabis* (Mães MA (M18)) ($17,94 (1,54)$; $p=0,009$) quando comparados com o grupo das mães expostas ao ar filtrado (Mães AF (C18)) ($13,97 (4,38)$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Representação gráfica da proporção do volume total pulmonar (mm³) pelo peso corpóreo (g) das mães.

6.6 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))

O volume total do septo (mm³) mostrou-se aumentado no grupo das mães expostas a *Cannabis* (Mães MA (M18)) ($227,76 \pm 22,28$; $p=0,028$) quando comparado com o grupo das mães expostas ao ar filtrado (Mães AF (C18)) ($185,37 \pm 27,54$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Representação gráfica do volume total do septo (mm^3) das mães.

Quando analisamos o volume total dos espaços aéreos alveolares (mm^3) observamos aumento significativo no grupo das mães expostas a *Cannabis* (Mães MA (M18)) ($341,13 \pm 27,28$; $p=0,010$) em relação ao grupo das mães expostas ao ar filtrado (Mães AF (C18)) ($250,91 \pm 53,77$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Representação gráfica do volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) das mães.

6.7 Análises de remodelamento tecidual das mães (grupos: Mães AF (C18) e Mães MA (M18))

6.7.1 Proporções de colágeno no parênquima pulmonar das mães

Não encontramos alterações significativas na proporção de colágeno no tecido pulmonar entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 2).

6.7.2 Proporções de fibras elásticas no parênquima pulmonar das mães

Não encontramos alterações significativas na proporção de fibras elásticas no tecido pulmonar entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 2).

Tabela 2 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) dos grupos Mães AF (C18) e Mães MA (M18).

Variáveis	Mães AF (C18)	Mães MA (M18)
Número de células inflamatórias totais/ml	24750 (25125)	33375 (48750)
Número total de leucócitos/ml	1110000 (3510000)	1335000 (1950000)
Número total de neutrófilos/ml	15605,38 (87488,24)	22965,18 (60043,77)
Número total de macrófagos/ml	718235,29 (2760052,06)	1064641,33 (1285549,25)
Número total de linfócitos/ml	160723,98 (499100,70)	90323,90 (292674,34)
Número total de eosinófilos/ml	17050,17 (89261,63)	17039,25 (0,00)
Peso corporal (g)	40,1160 ± 3,678	37,5820 ± 2,676
Densidade de volume (Vv) da via aérea parede (%)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Densidade de volume (Vv) da via aérea luz (%)	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02
Densidade de volume (Vv) da via aérea total (%)	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,03
Densidade de volume (Vv) do vaso (%)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,02
Densidade de volume (Vv) do espaço aéreo alveolar (%)	0,47 ± 0,04	0,51 ± 0,05
Densidade de volume (Vv) do tecido conjuntivo (%)	0,005 ± 0,003	0,001 ± 0,002
Densidade de volume (Vv) do septo (%)	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,31
Volume total (Vt) da via aérea parede (mm ³)	12,08 ± 6,94	13,19 ± 9,14
Volume total (Vt) da via aérea luz (mm ³)	24,84 ± 13,16	30,38 ± 21,26
Volume total (Vt) da via aérea total (mm ³)	36,92 ± 18,47	43,58 ± 28,08
Volume total (Vt) do vaso (mm ³)	46,08 ± 9,74	48,93 ± 15,06
Volume total (Vt) do tecido conjuntivo (mm ³)	2,70 ± 1,77	0,98 ± 1,65
Densidade de superfície (Sv) do septo (mm ⁻¹)	376,93 ± 40,13	312,37 ± 61,81
Área de superfície total (St) do septo (mm ²)	1,96 ± 3,44	2,09 ± 5,53
Espessura dos septos (ATM) (mm)	0,001 ± 0,000	0,002 ± 0,000
Proporção de colágeno no parênquima (μm ² /μm ²)	0,015 ± 0,003	0,016 ± 0,009
Proporção de fibras elásticas no parênquima (μm ² /μm ²)	0,067 ± 0,005	0,059 ± 0,022

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). **Mães AF (C18)** – Mães que receberam ar filtrado; **Mães MA (M18)** – mães expostas à fumaça de *Cannabis sativa*.

6.8 Análises morfológicas pulmonares dos grupos 1 (C18) e 2 (M18) (18º dia gestacional)

O peso dos pulmões (g) mostrou-se diminuído no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) ($0,02210 \pm 0,007978$; $p=0,010$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) ($0,03042 \pm 0,005600$) – (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Representação gráfica do peso dos pulmões (g) dos fetos.

O volume total pulmonar (cm³) mostrou-se diminuído no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) ($0,020849 \pm 0,0075268$; $p=0,009$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) ($0,028718 \pm 0,0052859$) – (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Representação gráfica do volume total pulmonar (cm³) dos fetos.

Quando normalizado pelo peso corporal, o volume total pulmonar (cm³/g) mostrou-se diminuído no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) ($0,020530 \pm 0,0057978$; $p=0,010$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) ($0,027642 \pm 0,0045026$) – (Gráfico 7). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,029$).

Gráfico 7 - Representação gráfica da proporção do volume total pulmonar (cm^3) pelo peso corpóreo (g) dos fetos. (n.s. – não significativo).

6.9 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares dos grupos 1 (C18) e 2 (M18) (18º dia gestacional)

O volume total de sacos alveolares (pré-alvéolos) (cm^3) mostrou-se diminuído no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) ($0,002784 \pm 0,0015226$; $p=0,006$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) ($0,004739 \pm 0,0014876$) – (Gráfico 8). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,034$).

Gráfico 8 - Representação gráfica do volume total de saco alveolares (cm³) dos fetos. (n.s. – não significativo).

O volume total de mesênquima (cm³) mostrou-se diminuído no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) ($0,015670 \pm 0,0054074$; $p=0,019$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) ($0,020846 \pm 0,0041040$) – (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Representação gráfica do volume total de mesênquima (cm³) dos fetos.

A densidade de volume de sacos alveolares (pré-alvéolos) (%) mostrou-se diminuída no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) ($0,12327 \pm 0,048693$; $p=0,041$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) ($0,16406 \pm 0,039078$) – (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Representação gráfica da densidade de volume de sacos alveolares (pré-alvéolos) (%) dos fetos.

A densidade de volume de mesênquima (%) mostrou-se aumentada no grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 2 M18) (0,75567 (0,073); $p=0,048$) quando comparado com o grupo dos fetos, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 1 C18) (0,71833 (0,049)) – (Gráfico 11). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a interação da exposição a *Cannabis* e sexo (gênero) ($p=0,046$).

Gráfico 11 - Representação gráfica da densidade de volume de mesênquima (%) dos fetos. (n.s. – não significativo).

6.10 Análise de remodelamento tecidual dos grupos 1 (C18) e 2 (M18) (18º dia gestacional)

6.10.1 Proporções de colágeno no mesênquima pulmonar dos fetos

Não encontramos alterações significativas na proporção de colágeno no tecido pulmonar entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 3).

Tabela 3 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) dos fetos: grupo 1 (C18) e grupo 2 (M18).

Variáveis	Grupo 1 (C18)	Grupo 2 (M18)
Peso corporal (g)	1,020 ± 0,1398	0,888 ± 0,1221
Densidade de volume (Vv) da via aérea (%)	0,072 ± 0,028	0,073 ± 0,020
Densidade de volume (Vv) do vaso (%)	0,038 ± 0,017	0,040 ± 0,015
Volume total (Vt) da via aérea total (cm ³)	0,0019 (0,0007)	0,0015 (0,0013)
Volume total (Vt) do vaso (cm ³)	0,0011 ± 0,0005	0,0008 ± 0,0004
Proporção de colágeno no mesênquima (μm ² /μm ²)	0,0675 ± 0,0747	0,0253 ± 0,0287

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). **Grupo 1 (C18)** – fetos provenientes de mães que receberam ar filtrado; **Grupo 2 (M18)** – fetos provenientes de mães expostas à fumaça de *Cannabis sativa* durante a gestação.

6.11 Análise do volume total (Vt) pulmonar dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal)

Não encontramos alterações significativas na análise do volume total (Vt) pulmonar entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 4).

6.12 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal)

O volume total das vias aéreas (mm³) mostrou-se aumentado no grupo das proles com 20 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 4 M20) (59,807143 ± 31,8851; p=0,035) quando comparado com o grupo das proles com 20 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 3 C20) (22,457143 ± 14,5042) – (Gráfico 12). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* (p=0,018).

Gráfico 12 - Representação gráfica do volume total das vias aéreas (mm³) das proles com 20 dias de idade. (n.s. – não significativo).

A densidade de volume das vias aéreas (%) mostrou-se aumentada no grupo das proles com 20 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 4 M20) ($0,145238 \pm 0,0741$; $p=0,027$) quando comparado com o grupo das proles com 20 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 3 C20) ($0,058929 \pm 0,0340$) – (Gráfico 13). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,028$).

Gráfico 13 - Representação gráfica da densidade de volume das vias aéreas totais (%) das proles com 20 dias de idade. (n.s. – não significativo).

A densidade de superfície das vias aéreas totais (mm^{-1}) mostrou-se diminuída no grupo das proles com 20 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 4 M20) ($41,0088 \pm 6,752$; $p=0,041$) quando comparado com o grupo das proles com 20 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 3 C20) ($59,2409 \pm 17,833$) – (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Representação gráfica da densidade de superfície das vias aéreas totais (mm^{-1}) das proles com 20 dias de idade.

6.13 Análise da estimativa do volume médio alveolar, densidade numérica alveolar (N_v) e do número total de alvéolos (N_t) dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20º dia pós-natal) pelo método do dissector

Não encontramos alterações significativas nos parâmetros alveolares analisados pelo método do dissector entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 4).

6.14 Análises de remodelamento tecidual dos grupos 3 (C20) e 4 (M20) (20° dia pós-natal)

6.14.1 Proporções de colágeno no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (20° dia pós-natal)

Não encontramos alterações significativas na proporção de colágeno no tecido pulmonar e nas vias aéreas entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 4).

6.14.2 Proporções de fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (20° dia pós-natal)

Não encontramos alterações significativas na proporção de fibras elásticas no tecido pulmonar e nas vias aéreas entre os grupos. Os valores de média e DP e mediana e (IQR) são apresentados na (tabela 4).

Tabela 4 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) das proles (20° dia pós-natal): grupo 3 (C20) e grupo 4 (M20).

Variáveis	Grupo 3 (C20)	Grupo 4 (M20)
Peso corporal (g)	9,0803 ± 1,69327	8,8267 ± 1,29171
Densidade de volume (Vv) do vaso (%)	0,0744 ± 0,0138	0,0732 ± 0,0199
Densidade de volume (Vv) do espaço aéreo alveolar (%)	0,5678 ± 0,1040	0,5089 ± 0,0529
Densidade de volume (Vv) do tecido conjuntivo (%)	0,0107 ± 0,0071	0,0232 ± 0,0184
Densidade de volume (Vv) do septo (%)	0,2696 (0,0741)	0,2607 (0,0741)
Volume total (Vt) pulmonar (mm ³)	384 ± 60,9524	411 ± 41,6989
Volume total (Vt) de parênquima (mm ³)	352,50 ± 25,0478	311,97 ± 49,5500
Volume total (Vt) do espaço aéreo alveolar (mm ³)	227,4750 (78,07)	209,3678 (48,43)
Volume total (Vt) do septo (mm ³)	107,5714 ± 9,09	102,6107 ± 27,72
Volume total (Vt) do vaso (mm ³)	27,9107 ± 1,8770	29,5500 ± 5,2925
Volume total (Vt) do tecido conjuntivo (mm ³)	3,8785 ± 2,1904	9,6642 ± 7,9038
Densidade de superfície (Sv) do septo (mm ⁻¹)	268,914 ± 69,917	258,356 ± 30,379
Densidade de superfície (Sv) de vaso (mm ⁻¹)	108,637 ± 24,481	105,680 ± 27,842
Área de superfície total (St) do septo (mm ²)	113065,93 (42597,06)	105450,65 (21440,83)
Área de superfície total (St) da via aérea (mm ²)	22800,15 ± 8308,85	16799,78 ± 2949,97
Área de superfície total (St) do vaso (mm ²)	42479,17 ± 14367,85	43657,31 ± 13045,72
Espessura dos septos (ATM) (mm)	0,0018 (0,0016)	0,0020 (0,0008)
Volume médio alveolar (mm ³)	0,00004 ± 0,000002	0,00003 ± 0,000005
Densidade numérica (Nv) alveolar (Nt alv/ Vt parênquima (mm ³))	20028,90 ± 1154,26	20349,44 ± 1725,43
Número total (Nt) de alvéolos (x10 ⁶)	7,0440 ± 0,35735	6,323434 ± 0,953985
Proporção de colágeno no parênquima (μm ² /μm ²)	0,0311 ± 0,0134	0,0462 ± 0,0253
Proporção de colágeno / perímetro das vias aéreas (μm ² /μm ²)	2,4347 ± 0,6878	2,7546 ± 1,1380
Proporção de colágeno / área total das vias aéreas (μm ² /μm ²)	0,2013 ± 0,0365	0,2134 ± 0,0560
Proporção de fibras elásticas no parênquima (μm ² /μm ²)	0,1107 (0,0601)	0,0984 (0,0344)
Proporção de fibras elásticas / perímetro das vias aéreas (μm ² /μm ²)	1,6311 ± 0,6072	1,6934 ± 0,7226
Proporção de fibras elásticas / área total das vias aéreas (μm ² /μm ²)	0,1503 ± 0,0615	0,1540 ± 0,0810

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). **Grupo 3 (C20)** – proles com 20 dias de idade provenientes de mães que receberam ar filtrado; **Grupo 4 (M20)** – proles com 20 dias de idade provenientes de mães expostas à fumaça de *Cannabis sativa* durante a gestação.

6.15 Análise do volume total (Vt) pulmonar dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60° dia pós-natal)

Não encontramos alterações significativas na análise do volume total (Vt) pulmonar entre os grupos. Os valores da mediana e (IQR) são apresentados na (tabela 5).

6.16 Análises morfológicas dos compartimentos pulmonares dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60º dia pós-natal)

O volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) mostrou-se aumentado no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($285,7401 \pm 64,5250$; $p=0,006$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($214,9982 \pm 51,5088$) – (Gráfico 15). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,002$).

Gráfico 15 - Representação gráfica do volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

O volume total de tecido conjuntivo (mm^3) mostrou-se diminuído no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($4,4357 (10,5429)$; $p=0,016$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo

5 C60) (15,9107 (8,7429)) – (Gráfico 16). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,038$).

Gráfico 16 - Representação gráfica do volume total de tecido conjuntivo (mm^3) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

A densidade de volume do espaço aéreo alveolar (%) mostrou-se aumentada no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($0,5796 \pm 0,0573$; $p=0,0001$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($0,4779 \pm 0,0564$) – (Gráfico 17). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,000$).

Gráfico 17 - Representação gráfica da densidade de volume do espaço aéreo alveolar (%) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

A densidade de volume dos septos alveolares (%) mostrou-se diminuída no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($0,2392 \pm 0,0388$; $p=0,006$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($0,3038 \pm 0,0616$) – (Gráfico 18). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,005$).

Gráfico 18 - Representação gráfica da densidade de volume dos septos alveolares (%) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

A densidade de volume de tecido conjuntivo (%) mostrou-se diminuída no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) (0,0107 (0,0250); $p=0,014$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) (0,0321 (0,0188) – (Gráfico 19). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,020$).

Gráfico 19 - Representação gráfica da densidade de volume de tecido conjuntivo (%) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

A densidade de superfície dos septos alveolares (mm^{-1}) mostrou-se aumentada no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($269,0018 \pm 54,5394$; $p=0,007$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($202,8515 \pm 56,7741$) – (Gráfico 20). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,004$).

Gráfico 20 - Representação gráfica da densidade de superfície dos septos alveolares (mm^{-1}) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

A área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) mostrou-se aumentada no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($133770,168 \pm 43023,116$; $p=0,011$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($91232,078 \pm 32600,264$) – (Gráfico 21). A análise two-way ANOVA evidenciou como fatores determinantes: a exposição a *Cannabis* ($p=0,002$) e o sexo (gênero) ($p=0,049$).

Gráfico 21 - Representação gráfica da área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

A espessura dos septos alveolares (mm) mostrou-se diminuída no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($0,0018 \pm 0,0006$; $p=0,004$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($0,0033 \pm 0,0013$) – (Gráfico 22). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,003$).

Gráfico 22 - Representação gráfica da espessura dos septos alveolares (mm) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

6.17 Análise da estimativa do volume médio alveolar, densidade numérica alveolar (N_v) e do número total de alvéolos (N_t) dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60° dia pós-natal) pelo método do dissector

A estimativa do número total de alvéolos ($\times 10^6$) mostrou-se aumentada no grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas a *Cannabis* (Grupo 6 M60) ($6,33791 \pm 1,47707$; $p=0,009$) quando comparado com o grupo das proles com 60 dias de idade, cujo as mães foram expostas ao ar filtrado (Grupo 5 C60) ($4,88094 \pm 1,02629$) – (Gráfico 23). A análise two-way ANOVA evidenciou como fator determinante a exposição a *Cannabis* ($p=0,005$).

Não encontramos alterações significativas para as estimativas de volume médio alveolar e densidade numérica alveolar (Nv) entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 5).

Gráfico 23 - Representação gráfica da estimativa do número total de alvéolos ($\times 10^6$) das proles com 60 dias de idade (n.s. – não significativo).

6.18 Análises de remodelamento tecidual dos grupos 5 (C60) e 6 (M60) (60° dia pós-natal)

6.18.1 Proporções de colágeno no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (60° dia pós-natal)

Não encontramos alterações significativas na proporção de colágeno no tecido pulmonar e nas vias aéreas entre os grupos. Os valores de média e DP são apresentados na (tabela 5).

6.18.2 Proporções de fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas da prole (60° dia pós-natal)

Não encontramos alterações significativas na proporção de fibras elásticas no tecido pulmonar e nas vias aéreas entre os grupos. Os valores de média e DP e mediana e (IQR) são apresentados na (tabela 5).

Tabela 5 – Resultados não significativos representados por média, DP, mediana e (IQR) das proles (60° dia pós-natal): grupo 5 (C60) e grupo 6 (M60).

Variáveis	Grupo 5 (C60)	Grupo 6 (M60)
Peso corporal (g)	21,2500 (5,44)	19,9350 (3,04)
Densidade de volume (Vv) do vaso (%)	0,0482 (0,0714)	0,0571 (0,0232)
Densidade de volume (Vv) da via aérea (%)	0,1169 ± 0,0417	0,1013 ± 0,0508
Volume total (Vt) pulmonar (mm ³)	468 (117)	468 (126)
Volume total (Vt) de parênquima (mm ³)	350,28 ± 73,93	401,49 ± 75,31
Volume total (Vt) do septo (mm ³)	119,410 (55,832)	115,714 (26,453)
Volume total (Vt) do vaso (mm ³)	29,153 ± 14,673	30,590 ± 13,019
Volume total (Vt) da via aérea (mm ³)	52,982 ± 21,155	49,361 ± 24,442
Densidade de superfície (Sv) de vaso (mm ⁻¹)	105,266 ± 39,576	99,537 ± 30,403
Densidade de superfície (Sv) da via aérea (mm ⁻¹)	54,4600 (12,2586)	48,9404 (17,5746)
Área de superfície total (St) da via aérea (mm ²)	24840,74 (7186,51)	23182,31 (6047,30)
Área de superfície total (St) do vaso (mm ²)	48048,93 ± 22664,18	48661,80 ± 16274,22
Volume médio alveolar (mm ³)	0,000056 ± 0,000011	0,000052 ± 0,0000038
Densidade numérica (Nv) alveolar (Nt alv/ Vt parênquima (mm ³))	14134,97 ± 2421,51	15687,80 ± 1695,67
Proporção de colágeno no parênquima (μm ² /μm ²)	0,03155 ± 0,01514	0,02764 ± 0,00908
Proporção de colágeno / perímetro das vias aéreas (μm ² /μm ²)	2,81904 ± 0,94834	2,20331 ± 1,26307
Proporção de colágeno / área total das vias aéreas (μm ² /μm ²)	0,15814 ± 0,02411	0,15375 ± 0,0347
Proporção de fibras elásticas no parênquima (μm ² /μm ²)	0,07801 (0,02782)	0,07737 (0,03268)
Proporção de fibras elásticas / perímetro das vias aéreas (μm ² /μm ²)	1,50127 ± 0,6911	2,05411 ± 1,0003
Proporção de fibras elásticas / área total das vias aéreas (μm ² /μm ²)	0,09651 ± 0,06485	0,14675 ± 0,06984

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). **Grupo 5 (C60)** – proles com 60 dias de idade provenientes de mães que receberam ar filtrado; **Grupo 6 (M60)** – proles com 60 dias de idade provenientes de mães expostas à fumaça de *Cannabis sativa* durante a gestação.

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que o uso recreativo da maconha durante a gestação tem potencial para provocar alterações no desenvolvimento pulmonar da prole. As alterações podem ser observadas logo ao nascimento e se mantêm até a idade adulta. Nos fetos a termo, a redução do peso fetal está acompanhada de uma redução no volume total dos pulmões e na composição volumétrica dos compartimentos pulmonares, sendo estas alterações semelhantes a um atraso no desenvolvimento para a idade gestacional. Nos jovens, as vias aéreas mostram as alterações mais significativas e na idade adulta há um desenvolvimento maior da alveolização.

Estes dados sugerem que o uso da maconha provoca uma alteração na trajetória do desenvolvimento, porém com base nos parâmetros avaliados não é possível saber se há alterações funcionais.

Nos pulmões das mães observamos que o uso da maconha provoca edema e congestão nos septos alveolares que podem sugerir uma menor disponibilidade de oxigênio para o feto (hipoxemia). Entretanto não observamos alterações no perfil inflamatório em resposta a exposição a fumaça da maconha como seria esperado no caso das exposições a fumaça de cigarro.

Os resultados referentes à análise no LBA, mostraram que não houve diferença significativa, tanto no número de células inflamatórias totais quanto na análise diferencial das células. Na literatura ainda há resultados conflitantes

quanto ao potencial inflamatório e anti-inflamatório da *Cannabis sativa*. De uma maneira geral, a inalação da fumaça proveniente da queima da *Cannabis* tem sido associada especificamente a um aumento do número de macrófagos alveolares e alterações nas funções desempenhada por estas células (Tashkin et al., 2002; Turcotte et al., 2016).

No contexto da inflamação pulmonar, os canabinóides exógenos e endógenos mostraram potencial terapêutico devido aos seus efeitos inibitórios sobre o recrutamento e funções das células imunológicas (Turcotte et al., 2016). Estudos apontam que o THC atua como imunomodulador em células T e macrófagos (Biehl e Bumham, 2015).

No estudo *in vitro* conduzido por Yuan et al. (2002) com sangue de doadores humanos, mostrou que o THC pode interagir com receptores CB2 e suprimir a ativação de células T, mediante a redução na síntese de citocinas de perfil Th1, resultando em um predomínio de fatores imunossupressores a favor de uma resposta Th2. O THC é capaz de ligar-se nos receptores CB2 expressos nos macrófagos alveolares e induzir um efeito imunossupressor. Segundo Tashkin (2013) o THC parece inibir importantes citocinas pró-inflamatórias que regulam a indução de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), prejudicando a atividade fagocitária e microbicida, podendo elevar a susceptibilidade às infecções pulmonares.

Somado ao potencial efeito imunomodulador dos canabinóides, há que se considerar que durante a gestação alterações hormonais e adaptações imunológicas ocorrem para evitar a rejeição fetal visando sucesso reprodutivo. Estas adaptações induzem às respostas potencialmente diferenciadas às

infecções e outros insultos, quando comparadas com o estado não gravídico (Raj et al., 2014). Durante a gravidez, há uma redução da atividade das células NK, diminuição de macrófagos inflamatórios, diminuição de células T *helper* de tipo 1 (Th1) e a redução da produção de citocinas inflamatórias, modulando de forma distinta as respostas inflamatórias (Robinson e Klein, 2012).

Em um estudo anterior de nosso grupo (Silva, 2018), avaliamos as alterações morfo-funcionais da placenta associadas ao uso da maconha durante a gestação neste mesmo modelo experimental e, os dados mostram que as alterações placentárias são condizentes com mecanismos de compensação a uma menor disponibilidade de oxigênio.

As placentas das fêmeas (camundongos BALB/c) expostas a fumaça proveniente da queima da maconha apresentam um aumento significativo em seu volume total decorrente do aumento no volume do labirinto (local onde as trocas materno fetais ocorrem), além disto o volume dos capilares fetais está aumentado e a barreira inter-hemal mais fina. Porém estas alterações, apesar de sugerirem um mecanismo compensatório, o crescimento fetal normal não é mantido, haja vista que o peso ao nascer é menor (Silva, 2018).

Quanto aos mecanismos envolvidos nas alterações observadas nos pulmões, podemos sugerir que a exposição *in utero* a fumaça pode ser decorrente dos inúmeros compostos presentes, incluindo os fitocanabinóides e hidrocarbonetos, por hipoxemia devido aos períodos de exposição a níveis elevados de CO, ou devido às alterações placentárias e maternas, como por exemplo, nível elevado de corticosteroides.

Embora os hormônios glicocorticoides sejam reconhecidos por sua importância na regulação da homeostase (Faria e Longui, 2006), talvez a sua principal e mais crucial função ocorre no período de desenvolvimento intrauterino participando da maturação do sistema respiratório e garantindo a sobrevivência após o nascimento (Whitsett e Matsuzaki, 2006)

O desenvolvimento dos pulmões é muito complexo e envolve uma série de vias de sinalização (Rajagopal et al., 2008). Os glicocorticoides agem em receptores específicos, e uma vez que a sinalização é ativada no pulmão em desenvolvimento, por um aumento nos níveis endógenos de glicocorticoides (durante os estágios mais avançados da gestação), induz uma série de alterações morfológicas na arquitetura pulmonar. Resumidamente, a ação dos glicocorticoides faz com que o compartimento intersticial, o tecido mesenquimal em particular, diminua consideravelmente. Esta diminuição aproxima a vasculatura subjacente dos futuros espaços aéreos alveolares (Habermehl et al., 2011). Na transição de um ambiente aquoso para um gasoso, que ocorre rapidamente ao nascimento, a distância mínima da barreira ar-sangue aumenta a capacidade dos pulmões de oxigenar o sangue e, portanto, permitir a sobrevivência do recém-nascido (Bird et al., 2015; Wallace et al., 2017).

Embora seja essencial a participação dos glicocorticoides na maturação pulmonar, o excesso de glicocorticoides durante o desenvolvimento fetal também apresenta efeitos negativos sobre a estrutura final dos pulmões. Em ratos e camundongos a exposição a níveis elevados diminui o número de alvéolos, e estes alvéolos são maiores e aparentam ser mais maduros, uma vez que a quantidade de mesênquima é menor, além disto há uma redução na

vascularização dos septos o que prejudica a formação de novos alvéolos (Tschanz et al., 1995).

Ao contrário do que esperávamos baseado nas evidências de estudos que avaliaram os efeitos do uso do tabaco por gestantes no desenvolvimento pulmonar da prole nossos resultados mostraram que o uso da maconha provocou um aumento no número de alvéolos no período mais tardio da alveolização.

Ratos expostos a dexametasona no período pré-natal apresentam pulmões menores, as taxas de proliferação celular são menores nos dois primeiros dias de vida, porém o crescimento pulmonar é maior no 6º dia pós-natal comparado aos animais controle, igualando-se ao controle no 11º dia após o nascimento (Adamson e King, 1988; Tschanz et al., 1995, 2002; Vyas e Kotecha, 1997)

A expressão de vários fatores de crescimento necessários para a alveolização normal é alterada por glicocorticoides. Como por exemplo o VEGF que é um potente indutor da proliferação das células endoteliais e, portanto, promove a vascularização. O VEGF é expresso nas células dos brônquios no início do desenvolvimento pulmonar e mais tarde no desenvolvimento sua expressão está limitada as células do epitélio alveolar. Em roedores a exposição a betametasona aumenta a expressão de VEGF alterando a vascularização e, portanto, comprometendo a formação de novos alvéolos (Bhatt et al., 2000).

Nossos dados não mostram alterações na vascularização em decorrência da exposição a fumaça da maconha em nenhuma das idades e nem no conteúdo de colágeno e elastina no parênquima pulmonar, como observado

nos estudos de Beck et al. (1981) onde a exposição pré-natal a betametasona induziu aumentos no parênquima de macacos rehsus.

Somente os efeitos no feto a termo assemelham-se aos achados de estudos realizados com a exposição de animais gestantes a fumaça do cigarro, ou seja, redução do peso ao nascer, redução do volume pulmonar e diminuição no volume de sacos aéreos (pre-alvéolos) (Collins et al., 1985), acompanhada de uma redução no volume do mesênquima.

Surpreendentemente a maior alveolização observada nos animais adultos, cujas mães foram expostas a fumaça proveniente da pirólise da maconha pode ser explicada pelo fato da maconha diminuir os efeitos do estresse nestes animais durante o período de exposição devido ao confinamento nos tubos no momento da exposição. As mães do grupo controle, foram expostas às mesmas condições, porém utilizamos um fluxo de ar filtrado ao invés da fumaça proveniente da pirólise da maconha. Embora os níveis de corticosteroides não tenham sido medidos, esta parece ser uma explicação plausível para os desfechos observados, que indica um efeito protetor ao stress e conseqüentemente a exposição fetal a corticosteroides no período pré-natal.

Nos últimos anos uma série de estudos tem mostrado a importância do período de desenvolvimento pré-natal para a saúde na vida adulta. É neste período que a vulnerabilidade a insultos externos é maior, sejam eles ambientais (agentes infecciosos, drogas, contaminantes ambientais) ou decorrentes de estresse psicossocial e doenças maternas.

Existem duas principais hipóteses para explicar a associação entre insultos no período pré-natal e a associação entre prejuízos no desenvolvimento

e a saúde no período pós-natal, sendo elas a má nutrição (Barker et al., 1993) e a exposição a níveis elevados de glicocorticoides (Edwards et al., 1993; Seckl, 2004), sendo ambas não excludentes.

A ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal é a resposta mais bem caracterizada ao estresse, e resulta na liberação do hormônio corticotrófico (CRH) pelas células neuro-secretoras do hipotálamo, que por sua vez vão estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação pela hipófise (Herman et al., 2002). O ACTH irá estimular a liberação dos glicocorticoides (corticosterona nos roedores) pelo córtex das adrenais na circulação. A função dos glicocorticoides é mobilizar as reservas de energia permitindo que o animal possa montar uma resposta apropriada ao estímulo (Pecoraro et al., 2006).

Os glicocorticoides são hormônios esteroides produzidos predominantemente pelas glândulas adrenais e são os principais mediadores da resposta ao estresse (Munck e Náray-Fejes-Tóth, 1994). Estes hormônios também são essenciais para o desenvolvimento fetal e estão envolvidos na maturação dos órgãos e tecidos, promovem a diferenciação celular e nos pulmões em desenvolvimento estimulam a produção de surfactante no final da gestação (Bird et al., 2015). Porém, a exposição a níveis elevados de glicocorticoides têm implicações negativas tais como o baixo peso ao nascer, aumento nos riscos de doenças cardio-metabólicas, alterações na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Seckl, 2004), resistência à insulina e diminuição na tolerância a glicose na vida adulta (Hales et al., 1996; Ozanne et al., 1996; Nyirenda et al., 1998).

Além disto, os estudos indicam um efeito sexo dependente, sendo os indivíduos do sexo masculino mais sensíveis, tanto em animais experimentais quanto em humanos (Clifton e Murphy, 2004; Mueller e Bale, 2008). A densidade hipotalâmica dos receptores CB1 é diferente em machos e fêmeas o que poderia explicar as diferenças nos efeitos e respostas. Não há na literatura estudos que avaliaram as diferenças na densidade de receptores canabinóides no tecido pulmonar e placentário de machos e fêmeas de camundongos (Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Craft et al., 2013).

A presença do sistema ECB nos núcleos sensíveis ao estresse no hipotálamo, assim como nas estruturas superiores do sistema límbico como por exemplo as amígdalas cerebelosas sugerem que ele possa ter um papel importante na regulação dos efeitos neuroendócrinos e comportamentais em resposta ao estresse. Segundo as evidências disponíveis na literatura a sinalização via sistema ECB está envolvida tanto na ativação quanto na inativação das respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em situações de estresse agudo ou repetido (Hill et al., 2010).

Estudos pré-clínicos e dados de estudos em humanos demonstram que a sinalização ECB / receptor CB1 é necessária para a regulação da resposta ao estresse. Estudos que utilizaram antagonistas ou a deleção genética mostram que o bloqueio do CB1r resulta em uma ativação excessiva e prolongada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal induzida pelo estresse (Patel et al., 2004; Hill et al., 2009; Hill et al., 2011; Patel e Hillard, 2006). Sendo que o uso sistemático de agonistas do receptor CB1 exerce um efeito bifásico na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo estresse, baixas doses reduzem e altas doses

aumentam os níveis de corticosteroides em roedores (Rodríguez de Fonseca, et al., 1991; Patel et al., 2004; Steiner e Wotjak, 2008). Um estudo realizado em camundongos mostrou que a exposição crônica ao canabidiol, um dos canabinoides presentes na fumaça da maconha, é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de prolactina e de corticosterona em animais estressados (Daltério et al., 1981). Outro estudo mais recente também mostra o potencial do uso do canabidiol em baixas (5 mg/kg) e moderadas doses (15 mg/kg) no bloqueio da respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal induzidas pelo estresse (Viudez-Martínez et al., 2018).

Em nosso estudo, a forma como foi realizada a exposição e a dose podem ser consideradas baixas, tanto quanto ao tempo de exposição diária (5 minutos) quanto a concentração de THC presente na amostra de *Cannabis sativa* que foi de 0,3%. As concentrações de canabinol e canabidiol não foram avaliadas até o presente momento, porém estão em andamento no núcleo de perícias da Polícia Civil de São Paulo. Isto reforça a ideia de que as exposições a fumaça agiram como um fator de proteção a exposição fetal a níveis elevados de corticosteroides.

Levando em consideração a crescente liberação e descriminalização do uso da maconha em diversos países e o uso por gestantes preocupa-nos a escassez de estudos que avaliem os impactos no desenvolvimento fetal. Até onde sabemos este é primeiro estudo a avaliar se há implicações sobre o desenvolvimento pulmonar e nossos resultados devem ser entendidos com cautela já que os animais expostos a maconha e ao ar filtrado estavam sujeitos a momentos de estresse por confinamento o que pode ter favorecido e mostrado

um potencial benéfico do uso da maconha na gestação sob esta condição. Um grupo sem nenhum tratamento é necessário para testarmos os efeitos do estresse por confinamento.

8. CONCLUSÃO

Os nossos achados não permitem saber se há implicações funcionais das alterações observadas, porém não há dúvidas de que o uso recreativo da maconha altera a trajetória normal de desenvolvimento dos pulmões, seja por um efeito direto ou indireto.

9. ANEXO

Anexo A: Auto de entrega da droga concedido através de solicitação oficial ao Delegado Seccional de Marília com fornecimento autorizado pela 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais – Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília/SP.

SECRETARIA DE ESTADO DOS NEGÓCIOS DA SEGURANÇA PÚBLICA
POLÍCIA CIVIL DO ESTADO DE SÃO PAULO
DELEGACIA DE INVESTIGAÇÕES SOBRE ENTORPECENTES - D.I.S.E.
Av. Nelson Spielmann, 549 - Centro - Fone/Fax: (14) 331-7113/331-7143
CEP: 17.409-001 - MARÍLIA/SP

AUTO DE ENTREGA

Em 12 de julho de 2010, nesta cidade de Marília, na Delegacia de Investigações sobre Entorpecentes - D.I.S.E., presente o Doutor JOSÉ CARLOS COSTA, Delegado de Polícia, como Escrivão de Polícia ao final assinado, presente Dr. JÚLIO CÉSAR ZORZETTO, RG. 8.734.405/SP, Médico Legista, residente a Rua São Jorge, 550, nesta cidade, pela mesma autoridade foi feita entrega da 1.000,00 GRAMAS DE MACONHA LACRADO SOB Nº 44818708, DO NÚCLEO DE PERÍCIAS MÉDICAS LEGAIS DO INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA DE MARÍLIA, relacionado ao IP. nº 086/2010, relativo ao processo nº 600/2010 - 3ª Vara Criminal da Comarca de Marília, conforme autorização judicial da 3ª Vara Criminal da Comarca de Marília, documentos anexos. Nada mais havendo a tratar, mandou a autoridade encerrar este auto, que depois de lido e achado conforme, vai devidamente assinado. Eu, Gertúlio T. Sato, Escrivão de Polícia que o digital.

Autoridade Policial: [Assinatura]

Recebedor: [Assinatura]

Testemunha: Gilberto Azeite Iamamura
Av. Nelson Spielmann nº 549

Testemunha: Elder Doretto Mazzini
Av. Nelson Spielmann nº 549

Anexo B: Aprovação do comitê de ética em pesquisa.

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **043/15** intitulado: **“Efeitos do uso da Cannabis sativa durante a gestação sobre o desenvolvimento pulmonar: estudo experimental em camundongos”** que utilizará **material coletado**, apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Mariana Matera Veras

Pesquisador (a) Executante: Luciano Belotti

CEUA-FMUSP, 25 de Março de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo C: Resultados significativos representados em tabelas.

Variáveis	Mães AF (C18)	Mães MA (M18)	P (<0,05)
Volume total (Vt) pulmonar (mm ³)	522 ± 76,36	662,40 ± 49,94	0,009
Proporção vt pulmonar (mm ³) pelo peso corpóreo (g)	13,97 (4,38)	17,94 (1,54)	0,009
Volume total (Vt) do septo alveolar (mm ³)	185,37 ± 27,54	227,76 ± 22,28	0,028
Volume total (Vt) do espaço aéreo alveolar (mm ³)	250,91 ± 53,77	341,13 ± 27,28	0,010
Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR)			

Variáveis	Grupo 1 (C18)	Grupo 2 (M18)	P (<0,05)	Two-way ANOVA P (<0,05)
Peso dos pulmões (g)	0,03042 ± 0,005600	0,02210 ± 0,007978	0,010	N.S.
Volume total (Vt) pulmonar (cm ³)	0,028718 ± 0,0052859	0,020849 ± 0,0075268	0,009	N.S.
Proporção (Vt) pulmonar (cm ³) pelo peso corpóreo (g)	0,027642 ± 0,0045026	0,020530 ± 0,0057978	0,010	Exposição: p=0,029
Volume total (Vt) dos sacos alveolares (cm ³)	0,004739 ± 0,0014876	0,002784 ± 0,0015226	0,006	Exposição: p=0,034
Volume total (Vt) de mesênquima (cm ³)	0,020846 ± 0,0041040	0,015670 ± 0,0054074	0,019	N.S.
Densidade de volume (Vv) dos sacos alveolares (%)	0,16406 ± 0,039078	0,12327 ± 0,048693	0,041	N.S.
Densidade de volume (Vv) de mesênquima (%)	0,71833 (0,049)	0,75567 (0,073)	0,048	Interação: p=0,046
Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). N.S. – Não significativo				

Variáveis	Grupo 3 (C20)	Grupo 4 (M20)	P (<0,05)	Two-way ANOVA P (<0,05)
Volume total (Vt) das vias aéreas (mm ³)	22,457143 ± 14,5042	59,807143 ± 31,8851	0,035	Exposição: p=0,018
Densidade de volume (Vv) das vias aéreas (%)	0,058929 ± 0,0340	0,145238 ± 0,0741	0,027	Exposição: p=0,028
Densidade de superfície (Sv) das vias aéreas (mm ⁻¹)	59,2409 ± 17,833	41,0088 ± 6,752	0,041	N.S.
Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). N.S. – Não significativo				

Variáveis	Grupo 5 (C60)	Grupo 6 (M60)	P (<0,05)	Two-way ANOVA P (<0,05)
Volume total (Vt) do espaço aéreo alveolar (mm ³)	214,9982 ± 51,5088	285,7401 ± 64,5250	0,006	Exposição: p=0,002
Volume total (Vt) de tecido conjuntivo (mm ³)	15,9107 (8,7429)	4,4357 (10,5429)	0,016	Exposição: p=0,038
Densidade de volume (Vv) do espaço aéreo alveolar (%)	0,4779 ± 0,0564	0,5796 ± 0,0573	0,0001	Exposição: p=0,000
Densidade de volume (Vv) dos septos alveolares (%)	0,3038 ± 0,0616	0,2392 ± 0,0388	0,006	Exposição: p=0,005
Densidade de volume (Vv) de tecido conjuntivo (%)	0,0321 (0,0188)	0,0107 (0,0250)	0,014	Exposição: p=0,020
Densidade de superfície (Sv) dos septos alveolares (mm ⁻¹)	202,8515 ± 56,7741	269,0018 ± 54,5394	0,007	Exposição: p=0,004
Área de superfície total (St) dos septos alveolares (mm ²)	91232,078 ± 32600,264	133770,168 ± 43023,116	0,011	Exposição: p=0,002 e Gênero = 0,049
Espessura dos septos (ATM) (mm)	0,0033 ± 0,0013	0,0018 ± 0,0006	0,004	Exposição: p=0,003
Número total (Nt) de alvéolos (x10 ⁶)	4,88094 ± 1,02629	6,33791 ± 1,47707	0,009	Exposição: p=0,005

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (IQR). N.S. – Não significativo

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice). Committee Opinion No. 637: Marijuana Use During Pregnancy and Lactation. *Obstet Gynecol.* 126(1):234-8. doi: 10.1097/01.AOG.0000467192.89321.a6. 2015.

Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction.* 91(11):1585-614. 1996.

Adamson IY, King GM. Postnatal development of rat lung following retarded fetal lung growth. *Pediatr Pulmonol.* 4 (4): 230-6. 1988.

Akhtar MT, Shaari K, Verpoorte R. Biotransformation of Tetrahydrocannabinol. *Phytochem Rev* 15: 921. doi:10.1007/s11101-015-9438-9. 2016.

Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol.* 68(4):247-86. 2002.

Alger BE. Getting high on the endocannabinoid system. *Cerebrum.* 1;2013:14. eCollection 2013.

Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. Front Plant Sci. 4;7:19. doi:10.3389/fpls.2016.00019. 2016.

Araújo-Jorge TC, Cotta-de-Almeida V, Olivieri BP, Henriques-Pons A. Preparo de Células para Avaliação de Parâmetros Inflamatórios e Imunológicos. Em: Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Fiocruz p. 253. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/cdbjg/pdf/araujo-9788575413937.pdf>. 2000.

Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. Br J Psychiatry. 178:101-6. 2001.

Baldwin GC, Tashkin DP, Buckley DM, Park AN, Dubinett SM, Roth MD. Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. Am J Respir Crit Care Med. 156(5):1606-13. 1997.

Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. Lancet. 10;341(8850):938-41. 1993.

Basavarajappa BS. Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr Neuropharmacol.* 5(2):81-97. 2007.

Bechtold J, Simpson T, White HR, Pardini D. Chronic adolescent marijuana use as a risk factor for physical and mental health problems in young adult men. *Psychol Addict Behav.* 29(3):552-63. doi: 10.1037/adb0000103. Epub 2015 Aug 3. 2015.

Beck JC, Mitzner W, Johnson JW, Hutchins GM, Foidart JM, London WT, Palmer AE, Scott R. Betamethasone and the rhesus fetus: effect on lung morphometry and connective tissue. *Pediatr Res.* 15(3):235-40. 1981.

Benevenuto SGM, Belotti L, Costa NSX, Dolhnikoff M, Ribeiro Junior G, Lourenço DT, Veras MM. Impacts of recreational use of Cannabis sativa on gestational and developmental outcomes in mice: Preliminary results. *Placenta*, Volume 36, Issue 4, Page 498. 2015.

Benevenuto SG, Domenico MD, Martins MA, Costa NS, de Souza AR, Costa JL, Tavares MF, Dolhnikoff M, Veras MM. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: An experimental study in mice. *Toxicology.* 376:94-101. doi: 10.1016/j.tox.2016.05.020. Epub 2016 May 24. 2017.

Bhatt AJ, Amin SB, Chess PR, Watkins RH, Maniscalco WM. Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung. *Pediatr Res*. 47 (5): 606-13. 2000

Biehl JR, Burnham EL. Cannabis Smoking in 2015: A Concern for Lung Health? *Chest*. 148(3):596-606. doi: 10.1378/chest.15-0447. 2015.

Bird AD, McDougall ARA, Seow B, Hooper SB, Cole TJ. Minireview: Glucocorticoid Regulation of Lung Development: Lessons Learned From Conditional GR Knockout Mice. *Mol Endocrinol*. 29(2): 158–171. 2015.

Boyce A, McArdle P. Long-term effects of cannabis. *Paediatrics and Child Health* 18:1, 37–41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.paed.2007.10.006>. 2008.

Brenneisen R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. In: Elsohly M (ed.). *Marijuana and the Cannabinoids*. Humana Press: Totowa, NY, pp. 17–49. 2007.

Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate*. 89(4):313-22. Epub 2006 Jun 1. 2006.

Calignano A, Kátóna I, Désarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, Freund TF, Piomelli D. Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature*. 408(6808):96-101. 2000.

Cardoso WV, Kotton DN. Specification and patterning of the respiratory system. 2008 Jul 16. In: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27021/> doi: 10.3824/stembook.1.10.1

Cardoso WV. Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol*. 63:471-94. 2001.

Cascini F, Aiello C, Di Tanna G. Increasing delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) content in herbal cannabis over time: systematic review and meta-analysis. *Curr Drug Abuse Rev*. 5(1):32-40. 2012.

Chasteen, JC. Getting high: Marijuana through the ages. The Rowman & Littlefield Publishing Group, Inc. Distributed National Book Network. ISBN 978-1-4422-5470-1 (electronic). London, United Kingdom. 2016.

Collins MH, Moessinger AC, Kleinerman J, Bassi J, Rosso P, Collins AM, James LS, Blanc WA. Fetal lung hypoplasia associated with maternal smoking: a morphometric analysis. *Pediatr Res*.19:408–412. 1985.

Clarke RC, Merlin M D. Cannabis: Evolution and ethnobotany. Berkeley: University of California. p6-10. eISBN: 9780520954571. 2013.

Clifton VL, Murphy VE. Maternal asthma as a model for examining fetal sex-specific effects on maternal physiology and placental mechanisms that regulate human fetal growth. *Placenta*.25 Suppl A:S45-52. 2004.

Craft RM, Marusich JA, Wiley JL. Sex differences in cannabinoid pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life Sci*. 19;92(8-9):476-81. doi: 10.1016/j.lfs.2012.06.009. Epub 2012 Jun 20. 2013.

Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of Neuroimmunology* 166; 3 – 18. 2005.

Dalterio SL, Michael SD, Macmillan BT, Bartke A. Differential effects of cannabinoid exposure and stress on plasma prolactin, growth hormone and corticosterone levels in male mice. *Life Sci*. 16;28(7):761-6. 1981.

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 34(5):605-13. 1988.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 18;258(5090):1946-9. 1992.

Di Marzo V, Stella N, Zimmer A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat Rev Neurosci*. 16(1):30-42. doi: 10.1038/nrn3876. 2015.

Downey LA, Verster JC. Cannabis Concerns: Increased Potency, Availability and Synthetic. *Current Drug Abuse Reviews*. Vol. 7, No. 2, 67-68. 2014.

Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*. 6;341(8841):355-7. 1993.

EISohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences* 78. 539 – 548. 2005.

Emery RL, Gregory MP, Grace JL, Levine MD. Prevalence and correlates of a lifetime cannabis use disorder among pregnant former tobacco smokers. *Addict Behav.* 54:52-8. doi: 10.1016/j.addbeh.2015.12.008. 2016.

Faria CDC, Longui CA. Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticóides. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50(6), 983-995. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v50n6/a03v50n6.pdf>. Acesso em 01 de março de 2019. 2006.

Fitzgerald KT, Bronstein AC, Newquist KL. Marijuana poisoning. *Top Companion Anim Med.* 28(1):8-12. doi: 10.1053/j.tcam.2013.03.004. 2013.

Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochem Rev* 7:615–639 DOI 10.1007/s11101-008-9094-4. 2008.

Fride E. Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol.* 20 Suppl 1:75-81. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01670.x. 2008.

Ganapathy VV, Prasad PD, Ganapathy ME, Leibach FH. Drugs of abuse and placental transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 38(1):99-110. 1999.

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86 (8), pp 1646–1647. DOI: 10.1021/ja01062a046. 1964.

Garry A, Rigourd V, Amirouche A, Fauroux V, Aubry S, Serreau R. Cannabis and breastfeeding. *J Toxicol.* 2009:596149. doi: 10.1155/2009/596149. 2009.

Gray TR, Eiden RD, Leonard KE, Connors GJ, Shisler S, Huestis MA. Identifying prenatal cannabis exposure and effects of concurrent tobacco exposure on neonatal growth. *Clin Chem.* 56(9):1442-50. doi: 10.1373/clinchem.2010.147876. 2010.

Greydanus DE, Hawver EK, Greydanus MM, Merrick J. Marijuana: current concepts. *Front Public Health.* 10;1:42. doi: 10.3389/fpubh.2013.00042. 2013.

Grotenhermen F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 42 (4): 327-360. 2003.

Gundersen HJ, Boyce RW, Nyengaard JR, Odgaard A. The Conneulor: unbiased estimation of connectivity using physical disectors under projection. *Bone.* 14(3):217-22. 1993

Gunn JK, Rosales CB, Center KE, Nuñez A, Gibson SJ, Christ C, Ehiri JE. Prenatal exposure to cannabis and maternal and child health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ. Open.* 5;6(4):e009986. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009986. 2016.

Habermehl D, Parkitna JR, Kaden S, Brügger B, Wieland F, Gröne HJ, Schütz G. Glucocorticoid Activity during Lung Maturation Is Essential in Mesenchymal and Less in Alveolar Epithelial Cells. *Mol Endocrinol.* 25(8): 1280–1288. 2011.

Hales CN, Desai M, Ozanne SE, Crowther NJ. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.* 24(2):341-50. 1996.

Hall W. What has research over the past two decades revealed about the adverse health effects of recreational cannabis use? *Addiction.* 110(1):19-35. doi: 10.1111/add.12703. Epub 2014 Oct 7. 2015.

Hayatbakhsh MR, Flenady VJ, Gibbons KS, Kingsbury AM, Hurrion E, Mamun AA, Najman JM. Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy. *Pediatr Res.*;71(2):215-9. doi: 10.1038/pr.2011.25. Epub 2011 Dec 21. 2012.

Hazekamp A. Cannabis review. Leiden University, Leiden, Netherlands.
<https://www.oregon.gov/pharmacy/Imports/Marijuana/StaffInfo/CannabisReview.pdf>. Acesso em 08/09/2016. 2009.

Hegewald MJ, Crapo RO. Respiratory physiology in pregnancy. Clin Chest Med. 32(1):1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2010.11.001>. 2011.

Herman JP, Cullinan WE, Ziegler DR, Tasker JG.. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. Eur J Neurosci.16(3):381-5. 2002.

Hill MN, McLaughlin RJ, Morrish AC, Viau V, Floresco SB, Hillard CJ, Gorzalka BB. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuropsychopharmacology. ;34(13):2733-45. doi: 10.1038/npp.2009.114. Epub 2009 Aug 26. 2009.

Hill MN¹, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu QS, Gorzalka BB, Hillard CJ. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. J Neurosci. 20;31(29):10506-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0496-11.2011. 2011.

Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci.* 10;30(45):14980-6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4283-10.2010. 2010.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54(2):161-202. 2002.

Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER; ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med.* 181(4):394-418. 2010.

Huang WJ, Chen WW, Zhang X. Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). *Mol Med Rep.* 14(4):2899-903. doi: 10.3892/mmr.2016.5585. 2016.

Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers.* 4(8):1770-804. 2007.

Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol.* 16(5):276-82. 1992.

Huizink AC. Prenatal cannabis exposure and infant outcomes: overview of studies. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 52, 45–52. 2014.

Hutchings DE, Martin BR, Gamagaris Z, Miller N, Fico T. Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. *Life Sci.* 44(11):697-701. 1989.

Iber D, Menshykau D. The control of branching morphogenesis. *Open Biol.* 4;3(9):130088. doi: 10.1098/rsob.130088. 2013.

ICRP – International Commission on Radiological Protection. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. A report of age- and gender-related differences in the anatomical and physiological characteristics of reference individuals. ICRP Publication 89. *Ann ICRP.* 2002;32(3-4):95-96. 2002.

Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 93(1):25-9. 1999.

Johns A. Psychiatric effects of cannabis. *Br J Psychiatry.* 178:116-22. 2001.

Joshi M, Joshi A, Bartter T. Marijuana and lung diseases. *Curr Opin Pulm Med.* 20(2):173-9. doi: 10.1097/MCP.0000000000000026. 2014.

Karila L, Roux P, Rolland B, Benyamina A, Reynaud M, Aubin HJ, Lançon C. Acute and long-term effects of cannabis use: a review. *Curr Pharm Des.* 20(25):4112-8. 2014.

Khosho FK, Kaufmann RC, Amankwash KS. A simple and efficient method for obtaining urine samples from rats. *Lab. Anim. Sci.* 35 (5), 513–514. 1985.

Knust J, Ochs M, Gundersen HJ, Nyengaard JR. Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs. *Anat Rec (Hoboken).* 292(1):113-22. doi: 10.1002/ar.20747. 2009.

Lambert DM, Fowler CJ. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem.* 11;48(16):5059-87. 2005.

Le Gouez A, Benachi A, Mercier FJ. Fever and pregnancy. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 35 Suppl 1:S5-S12. doi: 10.1016/j.accpm.2016.06.007. Epub 2016 Jul 5. 2016.

Lee JJ, Huang KL, Yu YY, Chen MS. Laboratory retention of vapor-phase PAHs using XAD adsorbents. *Atmos. Environ.* 38 (36), 6185–6193. doi:10.1016/j.atmosenv. 2004.07.024. 2004.

Lee MH, Hancox RJ. Effects of smoking cannabis on lung function. *Expert Rev Respir Med.* ;5(4):537-46; quiz 547. doi: 10.1586/ers.11.40. 2011.

Li, H. An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China." *Economic Botany* 28, no. 4: 437-48. <http://www.jstor.org/stable/4253540>. 1974.

Li, H. Hallucinogenic Plants in Chinese Herbals. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 25(6), 161-181. <http://www.jstor.org/stable/41762784>. 1977.

Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, Zimmer A, Göke B, Sharkey KA, Storr M. A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology*.71:255-63. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.029. 2013.

Ligresti A, De Petrocellis L, Di Marzo V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol Rev*. 96(4):1593-659. doi: 10.1152/physrev.00002.2016. 2016.

Loflin M, Earleywine M. No smoke, no fire: What the initial literature suggests regarding vapourized cannabis and respiratory risk. *Can J Respir Ther*. Winter;51(1):7-9. 2015.

LoMauro A, Aliverti A. Respiratory physiology of pregnancy: Physiology masterclass. *Breathe (Sheff)*. 11(4):297-301. doi: 10.1183/20734735.008615. 2015.

Lutchmansingh D, Pawar L, Savici D. Legalizing Cannabis: A physician's primer on the pulmonary effects of marijuana. *Curr Respir Care Rep*. 3(4):200-205. 2014.

Manzanares J, Julian MD, Carrascosa A. Role of the Cannabinoid System in Pain Control and Therapeutic Implications for the Management of Acute and Chronic Pain Episodes. *Current Neuropharmacology*, 4, 239-257. 2006.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 9;346(6284):561-4. 1990.

McCormack MC, Wise RA. Respiratory physiology in pregnancy. Pulmonary problems in pregnancy. Humana Press. 19-26. 2009.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanuš L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 29;50(1):83-90. 1995.

Mechoulam R, Hanuš L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and Physics of Lipids* 108(1-2):1–13. 2000.

Miller MD, Marty MA. Impact of environmental chemicals on lung development. *Environ Health Perspect.* 118(8):1155-64. doi: 10.1289/ehp.0901856. Epub 2010 May 5. 2010.

Moir D, Rickert WS, Levasseur G, Larose Y, Maertens R, White P, Desjardins S. A Comparison of Mainstream and Sidestream Marijuana and Tobacco Cigarette Smoke Produced under Two Machine Smoking Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2):494–502. 2008.

Morean ME, Kong G, Camenga DR, Cavallo DA, Krishnan-Sarin S. High School Students' Use of Electronic Cigarettes to Vaporize Cannabis. *Pediatrics.* 136(4):611-6. doi: 10.1542/peds.2015-1727. 2015.

Morris CV, DiNieri JA, Szutorisz H, Hurd YL. Molecular mechanisms of maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment. *Eur J Neurosci.* 34(10):1574-83. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07884.x. 2011.

Mueller BR, Bale TL. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci.* 3;28(36):9055-65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1424-08.2008. 2008.

Munck A, Náray-Fejes-Tóth A. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Ann N Y Acad Sci.* 30;746:115-30; discussion 131-3. 1994.

Mund SI, Stampanoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung. *Dev Dyn.* 237(8):2108-16. doi: 10.1002/dvdy.21633. 2008.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 2;365(6441):61-5. 1993.

Musshoff F, Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit.* 28(2):155-63. 2006.

Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest.* 5;101(10):2174-81. 1998.

Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J, Gundersen HJ. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1;169(1):120-4. Epub 2003 Sep 25. 2004.

Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol*. 270(4 Pt 1):E559-64. 1996.

Paria BC, Dey SK. Ligand- receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem. Phys. Lipids*. 108 (1), 211–220. 2000.

Patel S, Hillard CJ. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther*. 318(1):304-11. Epub 2006 Mar 28. 2006.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 145(12):5431-8. Epub 2004 Aug 26. 2004.

Pecoraro N, Dallman MF, Warne JP, Ginsberg AB, Laugero KD, la Fleur SE, Houshyar H, Gomez F, Bhargava A, Akana SF. From Malthus to motive: how the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. *Prog Neurobiol* 79(5-6):247-340. Epub 2006 Sep 18. 2006.

Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol*. 31(3):363-73. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.12.055. Epub 2011 Jan 20. 2011.

Pickett T, Lancaster K, Canaday M, Woods A, Callaway J. Marijuana: Not Just Blowing Smoke - Global Research and Development - Research Bulletin. 2015. <http://www.rgare.com/docs/default-source/default-document-library/marijuana-research.pdf?sfvrsn=0>. Acesso em 13/12/2016.

Pouwels-Fry S, Tillie-Leblond I, Wallaert B. Pulmonary Complications of Collagen Vascular Disease in Pregnancy. *Respiratory Medicine*, DOI 10.1007/978-1-59745-445-2_17 © Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC. 2009.

Raj RS, Bonney EA, Phillippe M. Influenza, immune system, and pregnancy. *Reprod Sci*. 21(12):1434-51. doi: 10.1177/1933719114537720. Epub 2014 Jun 4. 2014.

Rajagopal J, Carroll TJ, Guseh JS, Bores SA, Blank LJ, Anderson WJ, Yu J, Zhou Q, McMahon AP, Melton DA. Wnt7b stimulates embryonic lung growth by coordinately increasing the replication of epithelium and mesenchyme. *Development*. 135(9):1625-34. doi: 10.1242/dev.015495. 2008.

Reece AS. Chronic toxicology of cannabis. Clin Toxicol (Phila). 47(6):517-24. 2009.

Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. Horm Behav. 62(3):263-71. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.023. Epub 2012 Mar 3. 2012.

Rodríguez de Fonseca F, Cebeira M, Ramos JA, Martín M, Fernández-Ruiz JJ. Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. Life Sci. 54(3):159-70. 1994.

Rodríguez de Fonseca F, Fernández-Ruiz JJ, Murphy L, Eldridge JC, Steger RW, Bartke A. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol exposure on adrenal medullary function: evidence of an acute effect and development of tolerance in chronic treatments. Pharmacol Biochem Behav. 40(3):593-8. 1991.

Rosenthal M, Bush A. The growing lung: normal development, and the long-term effects of pre-and postnatal insults." European Respiratory Monograph 7: 1-24. 2002.

Roth MD, Arora A, Barsky SH, Kleerup EC, Simmons M, Tashkin DP. Airway inflammation in young marijuana and tobacco smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 157(3 Pt 1):928-37. 1998.

Roth MD, Baldwin GC, Tashkin DP. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on human immune function and host defense. *Chem Phys Lipids*. 31;121(1-2):229-39. 2002.

Sarafian T, Habib N, Mao JT, Tsu IH, Yamamoto ML, Hsu E, Tashkin DP, Roth MD. Gene expression changes in human small airway epithelial cells exposed to Delta9-tetrahydrocannabinol. *Toxicol Lett*. 158(2):95-107. Epub 2005 Apr 26. 2005.

Sarafian TA, Kouyoumjian S, Khoshaghideh F, Tashkin DP, Roth MD. Delta 9-tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284(2):L298-306. Epub 2002 Oct 25. 2003.

Schultes R, Klein W, Plowman T, Lockwood T. Cannabis: An example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 23(9), 337-367. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41762285>. 1974.

Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol.* 151 Suppl 3:U49-62. 2004.

Silasi M, Cardenas I, Kwon JY, Racicot K, Aldo P, Mor G. Viral infections during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 73(3):199-213. doi: 10.1111/aji.12355. Epub 2015 Jan 13. 2015.

Silva IAN. Efeitos da exposição gestacional à fumaça decorrente da queima de Cannabis sativa na placenta murina [Internet]; Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-02082018-154946/>. 2018.

Sirikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, Ishikawa Y, Morimoto S, Shoyama Y. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.* 46(9):1578-82. Epub 2005 Jul 15. 2005.

Steiner MA, Wotjak CT. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Brain Res.* 170:397-432. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00433-0. 2008.

Swarr DT, Morrissey EE. Lung endoderm morphogenesis: gasping for form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31:553-73. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125249. Epub 2015 Sep 10. 2015.

Tan EK, Tan EL. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 27(6):791-802. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2013.08.001. Epub 2013 Sep 4. 2013.

Tashkin DP. Effects of marijuana smoking on the lung. *Ann Am Thorac Soc.* 10(3):239-47. doi: 10.1513/AnnalsATS.201212-127FR. 2013.

Tashkin DP, Baldwin GC, Sarafian T, Dubinett S, Roth MD. Respiratory and immunologic consequences of marijuana smoking. *J Clin Pharmacol.* 42(11 Suppl):71S-81S. 2002.

Taylor DR, Hall W; Thoracic Society of Australia and New Zealand. Respiratory health effects of cannabis: position statement of the Thoracic Society of Australia and New Zealand. *Intern Med J.*; 33(7):310-3.2003.

Touw M. The Religious and Medicinal Uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs.* Vol. 13(1). 1981.

Tschanz SA, Damke BM, Burri PH. Influence of postnatally administered glucocorticoids on rat lung growth. *Biol Neonate*. 68(4):229-45. 1995.

Tschanz SA, Haenni B, Burri PH. Glucocorticoid induced impairment of lung structure assessed by digital image analysis. *Eur J Pediatr* . 161 (1):26-30. 2002.

Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. Impact of Cannabis, Cannabinoids, and Endocannabinoids in the Lungs. *Front Pharmacol*. Sep 15;7:317. eCollection. 2016.

Vasconcellos PC, Souza DZ, Sanchez-Ccoyllo O, Bustillos JO, Lee H, Santos FC, Nascimento KH, Araújo MP, Saarnio K, Teinilä K, Hillamo R. Determination of anthropogenic and biogenic compounds on atmospheric aerosol collected in urban, biomass burning and forest areas in São Paulo, Brazil. *Sci Total Environ*. 408(23):5836-44. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.08.012. Epub 2010 Sep 16. 2010.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res*. 109(5):536-43. 2009.

Viudez-Martínez A, García-Gutiérrez MS, Manzanares J. Cannabidiol regulates the expression of hypothalamus-pituitary-adrenal axis-related genes in response to acute restraint stress. *J Psychopharmacol.* 32(12):1379-1384. doi: 10.1177/0269881118805495. Epub 2018 Oct 16. 2018.

Vyas J, Kotecha S. Effects of antenatal and postnatal corticosteroids on the preterm lung. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 77 (2): F147-50. 1997.

Wallace MJ, Hooper SB, Harding R. Physiologic Mechanisms of Normal and Altered Lung Growth Before and After Birth. *Fetal and Neonatal Physiology*, 646–657.e4. doi:10.1016/b978-0-323-35214-7.0006. 2017.

Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89(3-4):112-9. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2008.12.002. 2009.

Wachtel, SR, ElSohly, MA, Ross, SA, Ambre, J, de Wit, H. Comparison of the subjective effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and marijuana in humans *Psychopharmacology* 161, 331–339. 2002.

Warburton D, El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, De Langhe S, Kemp PJ, Riccardi D, Torday J, Bellusci S, Shi W, Lubkin SR, Jesudason E. Lung organogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 90:73-158. doi: 10.1016/S0070-2153(10)90003-3. 2010.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 12:131-55. 1963.

Whitsett JA, Matsuzaki Y. Transcriptional regulation of perinatal lung maturation. *Pediatr Clin North Am.* 53(5):873-87, viii. 2006.

Wu CS, Jew CP, Lu HC. Lasting impacts of prenatal cannabis exposure and the role of endogenous cannabinoids in the developing brain. *Future Neurol.* 1;6(4):459-480. 2011.

Yamaori S, Kushihara M, Yamamoto I, Watanabe K. Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem Pharmacol.* 1;79(11):1691-8. doi: 10.1016/j.bcp.2010.01.028. 2010.

Yuan M, Kiertscher SM, Cheng Q, Zoumalan R, Tashkin DP, Roth MD. Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J Neuroimmunol.* 133(1-2):124-31. 2002.

Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis S. The neuroprotective role of endocannabinoids against chemical-induced injury and other adverse effects. *J Appl Toxicol.* 33(4):246-64. doi: 10.1002/jat.2828. 2013.

Zuckerman B, Frank DA, Hingson R, Amaro H, Levenson SM, Kayne H, Parker S, Vinci R, Aboyage K, Fried LE, Cabral H, Timperi R, Bauchner H. Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. *N. Engl. J. Med.* 320 (12), 762–768. doi:<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198903233201203>. 1989.