



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**



**JORDAN FARES SAMPAR**

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO  
CANABIDIOL NA FACILITAÇÃO DO *STATUS*  
*EPILEPTICUS* PÓS-NATAL**

**RIBEIRÃO PRETO  
SETEMBRO/2021**

**Jordan Fares Sampar**

**O efeito da exposição pré-natal ao Canabidiol  
na facilitação do *Status Epilepticus* pós-natal.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP).

**Orientação:** Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco.

**Co-orientação:** Dr. Rui Milton Patrício da Silva Junior.

**Agência de Fomento:** CNPq 08/19 – 07/21

Ribeirão Preto  
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Ficha catalográfica

Sampar, Jordan Fares

O efeito da exposição pré-natal ao Canabidiol na facilitação do *Status Epilepticus* pós-natal.

94 p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Orientação: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Co-orientação: Dr. Rui Milton Patrício da Silva Junior.

1. Epilepsia; 2. *Status Epilepticus*; 3. Neurodesenvolvimento; 4. Canabidiol; 5. Pilocarpina.

Nome: Jordan Fares Sampar

Título: O efeito da exposição pré-natal ao Canabidiol na facilitação do *Status Epilepticus* pós-natal.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof./Prof.<sup>a</sup> Dr./Dr.<sup>a</sup>: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof./Prof.<sup>a</sup> Dr./Dr.<sup>a</sup>: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof./Prof.<sup>a</sup> Dr./Dr.<sup>a</sup>: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

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

*This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001*

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 138543/2019-4).

## Agradecimentos

Eu defendi meu Trabalho de Conclusão de Curso no dia 19 de novembro de 2018. Foi, sem dúvida alguma, o pior dia da minha vida. Após o encerramento, aprovado, cruzei o Salão Nobre do Prédio Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto decidido a não seguir com a, até então, embrionária carreira acadêmica e, também, prometendo a mim mesmo que nunca mais voltaria àquele lugar.

Em 30 de março de 2019, recebi, em uma das redes sociais, uma mensagem: “Jordan: Tudo bem? De longe vi você ontem no PC [Prédio Central]!”. Com a negativa, outra: “*Your phantom!* Estou desculpado porque era de longe.. Ou será o meu *Brain* insistindo em convidar você ao nosso Lab!”. Conheci o Professor Norberto nas aulas de Neurofisiologia, no primeiro ano de graduação de Ciências Biomédicas, curso no qual me graduei. As mensagens eram dele. Durante o intervalo entre as aulas, em um Curso Pré-Vestibular que, no momento, eu estava trabalhando, respondi: “Tenho pensado bastante no futuro, professor. Atualmente estou acompanhando alguns alunos do ensino médio, ajudando-os com as disciplinas e provas. Mas a vontade de fazer pós-graduação ainda está aqui”.

Em 24 de julho de 2019, eu estava matriculado no Mestrado, dentro do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, no Departamento de Fisiologia da FMRP/USP.

Esses agradecimentos começam a meu pai e à minha tia-materna, os quais, apesar de muitos narizes torcidos por não terem o filho/sobrinho por perto, motivaram-me a voltar à academia, para o que eles sabem que, de fato, faz os meus olhos brilharem. Obrigado pelo apoio, inclusive financeiro, para que eu chegasse até aqui, onde estou (estamos) hoje.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco por confiar e acreditar em mim, me convidar a integrar o seu grupo de pesquisa e abrir as portas do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE) para que eu fizesse o Mestrado, sob sua orientação.

Ao Professor Dr. Bruno Spinosa de Martinis e a Doutoranda Nayna Cândida Gomes, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela colaboração no estudo, permitindo deixa-lo ainda mais elegante.

Ao Dr. Rui Milton Patrício da Silva Junior pela co-orientação no Mestrado e, sobretudo, no auxílio com a técnica de imunistoquímica.

Aos Professores, convidados a comporem a Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, por aceitarem o nosso convite. Agradeço também pelas discussões e contribuições decorrentes dela.

Aos técnicos do LNNE Flávio Del Vecchio e José Antônio Cortes de Oliveira pela amizade, disponibilidade e paciência para com, na época, o membro mais caçula do laboratório. Sobretudo ao José, pela paciência e auxílio com as Análises Neuroetológicas. É – e sempre será – prazeroso e gratificante trabalhar com vocês.

Aos alunos e membros do LNNE pelas trocas científicas e, principalmente, àqueles com os quais, inesperadamente, eu desenvolvi profunda amizade: Adrieli Oliveira Raminelli, Gabriel Servilha de Menezes, Samuel Amorin Grisote e Suélen Santos Alves. Muito obrigado por proporcionarem um ambiente de trabalho espetacular. Ainda que a Pandemia tenha encurtado a nossa convivência, as memórias geradas por nós estão enraizadas em mim.

Aos funcionários da FMRP e, sobretudo, do Departamento de Fisiologia. Um agradecimento especial à Cláudia de Barcellos Vanzella por, apesar das centenas de e-mail/ligações, sempre esclarecer as minhas dúvidas da forma mais didática e acolhedora possível.

Às amigas e aos amigos que a vida me presenteou, quer em São Joaquim da Barra, Ribeirão Preto, Uberaba e Campinas, lugares pelos quais eu já passei.

Ao meu namorado e parceiro de vida, Pedro Mazzoni.

Às entidades de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento.

E, finalmente, em um ato conscientemente narcisista (e necessário), eu gostaria de agradecer ao Jordan por ter quebrado a sua própria promessa. Com esse gesto, meu querido, você deixou um recado para mim, que – dois anos após – senta para, como última modificação desse arquivo de Dissertação, escrever os agradecimentos. Você, sem imaginar, se deixou a lição de que não importa o que lhe digam, o quanto vão passar uma imagem aos olhos alheios enquanto, dentro do laboratório, você sabe que isso não é concreto. Você fez seus experimentos sozinho fisicamente, em meio a uma Pandemia, e só você sabe o quanto isso lhe reconectou à ciência. O quanto devolveu-lhe o prazer que, outrora, você mesmo abandonou por que acreditou que havia fracassado.

Não importa se vão ou não lhe desejar “boa sorte” quando você estiver, nervoso, prestes a defender o seu TCC/Mestrado/Doutorado. Você tem falhas. E sabe que são elas que levam você a continuar tentando prosperar. Você sabe também, Jordan, o amor que tem pelo que se propõe a fazer. Essa Dissertação demonstra muito o que eu quero que fique com você. Nunca duvide daquilo que faz você feliz. Nunca duvide do quão espinhoso é o caminho. Mas, por favor, nunca duvide também que você é capaz de chegar lá.

Eu sempre gostei muito de escrever.

E, tenho que admitir: as histórias que eu mais gosto de contar são as de superação.

*“If you think research is expensive, try disease”.*

*“Se você acha que a pesquisa é cara, experimente a doença”.*

Mary Woodard Lasker (1901–1994)



## RESUMO

Sampar, Jordan Fares. O efeito da exposição pré-natal ao Canabidiol na facilitação do *Status Epilepticus* pós-natal. 2021. 94 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2021.

Os componentes das plantas *Cannabis*, em especial a espécie *Cannabis sativa* (CS), são utilizados, desde a Antiguidade, para fins religiosos e terapêuticos. O Canabidiol (CBD) é um fitocanabinoide presente na CS com efeito psicoativo, mas não psicotrópico, alta tolerabilidade e baixa toxicidade, sendo, portanto, ótimo candidato ao tratamento das epilepsias, sobretudo as farmacorresistentes. A epilepsia é um distúrbio cerebral, caracterizado pela hiperexcitabilidade e hipersincronicidade elétrica. As crises duram, em média, um minuto, mas quando se alongam por, pelo menos, cinco minutos, nomeiam-se *Status Epilepticus* (SE). Uma das maneiras de mimetizá-lo, em estudos pré-clínicos, é mediante a administração de pilocarpina (PILO), agonista muscarínico M1, sistemicamente. Considerando os efeitos positivos da terapêutica com CBD, ainda que os dados sejam considerados incipientes, já que o uso ainda é limitado em janela de tempo prolongadas, muitas gestantes utilizam CS de forma recreacional e indiscriminada. Como consequência, estudos apontam prejuízos pós-natais decorrentes dessa ação, embora a literatura sobre os impactos pós-natais do uso de CBD gestacional permaneça escassa. Dessa forma, a hipótese do presente trabalho é que a pré-exposição a CBD favoreça a facilitação da gênese do SE pós-natal. 10 Ratas *Sprague-Dawley* receberam CBD subcutâneo, na dose de 25 mg/kg/dia. Os filhotes foram divididos em 10 grupos experimentais (n=8-12), de acordo com o nascimento: P0, P7, P14, P21 e P28, divididos segundo o tratamento materno, controle ou CBD. A concentração plasmática e encefálica de CBD foi quantificada pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão acoplada a massas. O tratamento não demonstrou diferenças significativas no peso dos animais filhotes, ainda que, nas mães, elevou o peso de forma estatisticamente significativa no GD7, se estendendo a GD14 e GD21. Aos 28 dias pós-natais, os filhotes expostos a CBD, frente à administração i.p. de PILO, apresentaram crises com graus maiores na escala de Racine (1972), bem como maiores índices de gravidade categorizado, e o desenvolvimento de SE, com latência média de 62 minutos. No grupo controle, o SE se fez ausente. Com a imunohistoquímica foi possível avaliar, nas regiões dorsal e ventral dos hipocampus dos animais submetidos a crises, a intensidade de marcação para o receptor canabinoide do tipo 1 (CB1R). Na subárea do corpo de Amon (CA), CA1 ventral e no hipocampo ventral total houve aumento da expressão de CB1R no grupo tratado. No giro denteado (do inglês *dentate gyrus*, DG), o hipocampo dorsal se mostrou com maior perfil de expressão para CB1R. As subáreas CA2 e CA3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A análise neuroetológica descreve detalhadamente os comportamentos de crise dos animais controle e CBD e demonstra, de forma estatisticamente significativa, a diferença entre eles.

Palavras-chave: *Cannabis sativa*; Canabidiol; neurodesenvolvimento; *Status Epilepticus*; pilocarpina; hipocampo; epilepsia.

## ABSTRACT

Sampar, Jordan Fares. The effect of prenatal exposure to Cannabidiol on facilitating postnatal *Status Epilepticus*. 2021. 94 p. Dissertation (Master in Physiology) - Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2021.

The components of *Cannabis*, especially *Cannabis sativa* (*CS*), have been used since Ancient times for religious and therapeutic purposes. Cannabidiol (CBD) is a phytocannabinoid present in *CS* with a psychoactive effect, but not psychotropic, high tolerability and low toxicity, being an excellent candidate for the treatment of epilepsies, especially drug-resistant ones. Epilepsy is a brain disorder characterized by hyperexcitability and electrical hypersynchronicity. Seizures duration is, on average, one minute, but when they last for at least five minutes, they are called *Status Epilepticus* (*SE*). One of the ways to mimic it, in preclinical studies, is by administering pilocarpine (PILO), a muscarinic M1 agonist, systemically. Considering the positive effects of CBD therapy, even though the data are considered incipient, by use is still limited in prolonged time windows, many pregnant women use *CS* in a recreational and indiscriminate way. As a result, studies point to postnatal damage resulting from this action, although the literature on the postnatal impacts of the use of gestational CBD remains scarce. Thus, the hypothesis of the present work is that pre-exposure to CBD favors the facilitation of the genesis of postnatal *SE*. 10 *Sprague-Dawley* rats received subcutaneous CBD at a dose of 25 mg/kg/day. The pups were divided into 10 experimental groups (n=8-12), according to birth: P0, P7, P14, P21 and P28, divided according to maternal treatment: control or CBD. The plasma and brain concentration of CBD was quantified by high pressure liquid chromatography coupled to masses. The treatment did not show significant differences in the weight of the offspring, although, in the mothers, it increased the weight in a statistically significant way in GD7, extending to GD14 and GD21. At 28 days postnatal, offspring exposed to CBD, facing i.p. of PILO, presented seizures with higher degrees in the Racine scale (1972), as well as higher categorized severity indexes, and the development of *SE*, with a mean latency of 62 minutes. In the control group, *SE* was absent. With immunohistochemistry, it was possible to evaluate, in the dorsal and ventral regions of the hippocampus of animals submitted to seizures, the intensity of expression of CB1R. In the subarea of *Cornus Ammonis* (*CA*), ventral CA1 and in the total ventral hippocampus, there was an increase in CB1R expression in the treated group. In the dentate gyrus (*DG*), the dorsal hippocampus showed the highest expression profile for CB1. The subareas CA2 and CA3 did not present a statistically significant difference. The neuroethological analysis describes in detail the crisis behaviors of control and CBD animals and demonstrates, in a statistically significant way, the difference between them.

**Keywords:** *Cannabis sativa*, cannabidiol; neurodevelopment; *Status Epilepticus*; pilocarpine; hippocampus; epilepsy.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1. Neurodesenvolvimento	20
1.2. Exposição pré-natal a canabinoides	22
1.3. CBD e a terapêutica das Epilepsias	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1. Animais	28
3.2. Tratamento	29
3.3. Avaliação das propriedades farmacocinéticas do CBD	30
3.3.1. Materiais	30
3.3.2. Métodos	31
3.4. Indução de <i>SE</i>	33
3.5. Registro e Análise Comportamental	34
3.6. Coleta e Processamento do Plasma	34
3.7. Coleta, Corte e Processamento dos Cérebros	34
3.8. Imunoistoquímica	35
3.9. Captura, Processamento e Análise das Imagens	36
3.11. Análise Estatística	39
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
4.1. Concentrações Plasmáticas e Cerebrais de CBD	40
4.2. Peso das Fêmeas Gestantes	50
4.3. Peso dos Filhotes	51
4.4. Má-formação	52

	12
4.5. Classificação das Crises	53
4.6. <i>Status Epilepticus</i> e Latência	55
4.7. Imunoistoquímica para CB1	57
4.8. Análise Neuroetológica	64
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
7. REFERÊNCIAS	78
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	92

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Presença do eCBS nas etapas pré-natais, pós-natais e na vida adulta. 24**
- Figura 2. Padrão de calibração para a elaboração dos Fluxogramas (Garcia-Cairasco et al., 1992). 40**
- Figura 3. Cromatograma obtido na otimização do pico do analito (CBD) e do padrão interno (THC-d3) ao analisar a solução padrão de 50 ng. 42**
- Figura 4. Cromatograma e espectro de massas obtidos da análise por GC-MS da solução padrão de CBD na concentração de 50 ng/250 ml de plasma 43**
- Figura 5. Cromatograma e espectro de massas obtidos da análise por GC-MS da solução padrão de THC-d3 na concentração de 50 ng/250 ml de plasma. 44**
- Figura 6. Cromatograma obtido da amostra de plasma “branco” fortificada com 50 ng/250 ml de plasma de CBD e THC-d3 submetida a extração líquido-líquido. 44**
- Figura 7. Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e coeficiente de correlação linear ( $r$ ) do CBD. 45**
- Figura 8. Quantificação de CBD plasmático, expresso em ng/250ml, em cinco intervalos de tempo de filhotes pré-expostos ao fitocanabinoide. 47**
- Figura 9. Quantificação de CBD encefálico, expresso em ng/250ml, em cinco intervalos de tempo de filhotes pré-expostos ao fitocanabinoide. 47**
- Figura 10. Cromatograma obtido da amostra P0 CBD fortificada com 50 ng/250 ml de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 48**
- Figura 11. Cromatograma obtido da amostra P7 CBD fortificada com 50 ng/250 ml de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 48**
- Figura 12. Cromatograma obtido da amostra P28 cbd fortificada com 50 ng/250 ml de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 49**
- Figura 13. Cromatograma obtido da amostra P14 controle CBD fortificada com 50 ng/250 ml de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 49**
- Figura 14. Cromatograma obtido da amostra P0 CBD cérebro fortificada com 50 ng/0,10 g de cérebro de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 49**

- Figura 15. Cromatograma obtido da amostra P7 CBD cérebro fortificada com 50 ng/0,21 g de cérebro de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 49**
- Figura 16. Cromatograma obtido da amostra P28 CBD cérebro fortificada com 50 ng/0,53 g de cérebro de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido. 50**
- Figura 17. Peso das mães gestantes que receberam como tratamento veículo (branco) e CBD (verde). 51**
- Figura 18. Peso dos animais P0, P7, P14, P21 E P28 dos grupos veículo (branco) e CBD (verde). 52**
- Figura 19. Filhote em idade P0 com má-formação. 53**
- Figura 20. Classificação das crises, em animais P28, segundo a Escala de Racine durante os 90 minutos de análise. 54**
- Figura 21. Índice de Gravidade Categorizado dos animais P28 veículo (n=7) e CBD (n=12), apresentando durante os 90 minutos de análise. 55**
- Figura 22. Porcentagem de desenvolvimento de SE nos animais P28 controle (n=7) e CBD (n=12), durante os 90 minutos de análise. 57**
- Figura 23. Intensidade do CB1R na sub-região CA1 das regiões ventral e dorsal do hipocampo de animais P28 veículo (n=7) e CBD (n=12). 59**
- Figura 24. Intensidade do CB1R na sub-região CA2 das regiões ventral e dorsal do hipocampo de animais P28 veículo (n=7) e CBD (n=12). 59**
- Figura 25. Intensidade do CB1R na sub-região CA3 das regiões ventral e dorsal do hipocampo de animais P28 veículo (n=7) e CBD (n=12). 60**
- Figura 26. Intensidade do CB1R no giro denteado das regiões dorsal e ventral do hipocampo de animais P28 veículo (n=7) e CBD (n=12). 61**
- Figura 27. Intensidade do CB1R no hipocampo, dividido em suas regiões dorsal e ventral, de animais P28 veículo (n=7) e CBD (n=12). 62**
- Figura 28. Imunoistoquímica para o CB1R no hipocampo dorsal de animais pré-expostos a Veículo e a CBD. 63**

- Figura 29. Imunoistoquímica para o CB1R no hipocampo ventral de animais pré-expostos a Veículo e a CBD. 65**
- Figura 30. Fluxograma da resposta comportamental de 3 crises do grupo CBD analisadas após a administração de PILO subconvulsivante. 67**
- Figura 31. Fluxograma da resposta comportamental dos grupos Controle e CBD após a administração de PILO subconvulsivante. 68**
- Figura 32. Fluxograma da resposta comportamental em três janelas temporais de um animal do grupo CBD após a administração de PILO subconvulsivante. 70**
- Figura 33. Fases do ciclo estral de ratas. 92**
- Figura 34. Esfregaço com a presença de espermatozoide. 93**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Escala de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978) para a classificação das crises epilépticas</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 2. Íons de quantificação e identificação do analito e do padrão interno</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 3. Valores de área e concentração do CBD nas amostras de plasma e cérebro</b>	<b>45</b>
<b>Tabela 4. Manifestação de <i>SE</i> e latência nos grupos P28 veículo (n=7) e CBD (n=12), durante os 90 minutos de análise</b>	<b>57</b>
<b>Tabela Complementar 1. Dicionário de alguns dos itens comportamentais seguidos de suas correspondentes siglas (Garcia-Cairasco et al., 1992) (Pereira, 2015).</b>	<b>94</b>



## LISTA DE ABREVIACÕES

NSCs – *Neural Stem Cells*

SNC – Sistema Nervoso Central

DG – Giro Denteado

SVZ – Zona Subventricular

GABA – Ácido gama-aminobutírico

CA – Corpo de Amon

CS – *Cannabis sativa*

JAMA – *Journal of the American Medical Association*

CBD – Canabidiol

THC –  $\Delta^9$ -tetraidrocanabidiol

eCBS – Sistema endocanabinoide

CB1 – Receptor canabinoide do tipo 1

CB2 – Receptor canabinoide do tipo 2

NAPE-PLD – N-acil-fosfatidiletanolamina

DAGL – Diacilglicerol lipase

MAGL – Monoacilglicerol lipase

FAAH – *Fatty acid amine hidrolase*

AEA – anandamida

2-AG – 2-aracnodoilglicerol

OPPS - *The Ottawa Prenatal Prospective Study*

MHPCD - *The Maternal Health Practices and Child Development Study*

*Gen R - The Generation R Study*

*FDA – Food and Drug Administration*

OMS – Organização Mundial da Saúde

*SE – Status Epilepticus*

PILO - Pilocarpina

CFM – Conselho Federal de Medicina

P0 – 0 dias pós-natal

P7 – 7 dias pós-natais

P14 – 14 dias pós-natais

P21 – 21 dias pós-natais

P28 – 28 dias pós-natais

GD1 – 1 dia de gestação

GD7 – 7 dias de gestação

GD19 – 19 dias de gestação

s.c. – Subcutâneo

i.p. – Intraperitoneal

*HPLC - High Pressure Liquid Chromatography*

*MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida*

PFA – Paraformolaldeído

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

*ROIs – Regions of interest*

EPM – Erro padrão da média

TRPV1 – Receptor vanilóide de potencial transitório 1

*AUC – Area under the curve*

E10.5 – Dia embrionário 10.5

NMDA - N-metil D-Aspartato

LAM – Labirinto Aquático de Morris

*BMP - Bone morphogenic protein*

*Fgf – fibrillary growth fator*

VTA – Área Tegmental Ventral

*GABRD – Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit delta*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Neurodesenvolvimento

As frases “O segredo da existência humana reside não só em viver, mas também em saber para que se vive” e “O mais feroz dos animais domésticos é o relógio da parede. Conheço um que já devorou três gerações da minha família” foram escritas por Fiódor Dostoiévski (1821 – 1881) e Machado de Assis (1839 – 1908), respectivamente. Elas possuem, ao menos, dois pontos de convergência. O primeiro está no tema abordado – a vida – expresso como o entendimento dos fenômenos biológicos que se iniciam com uma única célula e são finalizados, ainda que alguns deles se mantenham na posteridade, com a formação do indivíduo. As lacunas que este processo de finalização deixa, podem, aqui neste contexto, serem representadas como o processo de neurogênese, advindos do neurodesenvolvimento e se estendendo à vida adulta.

O processo neurogênico, definido como a formação de neurônios a partir de células progenitoras neurais – *Neural Stem Cells (NSCs)* – não é restrito apenas à espécie humana. Estudos demonstram este fenômeno em mamíferos roedores (Altman & Das, 1967; Cameron et al., 1993; Seki e Arai, 1993) e em primatas não-humanos (Kornack e Radic, 1999). Ao analisar a evolução do cérebro dos animais, sobretudo nos mamíferos, percebe-se a correlação entre o aumento do volume ocupado por este órgão na caixa craniana e a habilidade de realização de um maior número de tarefas finas, complexas e também dinâmicas (Kaas, 2017). O sistema nervoso central (SNC) é formado a partir do ectoderma, folheto embrionário mais dorsal dos três existentes (ectoderma, mesoderma e endoderma) a partir, em humanos, da terceira semana de gestação. À medida que as células progenitoras neuronais se diferenciam, elas se posicionam ao longo da linha média do embrião, originando a placa neural. Entre os dias embrionários oito e dez, há o surgimento de invaginações bilaterais, que são sulcos e cristas, no teto da placa neural; a fusão de ambos os lados origina o tubo neural (Gilbert, 2000).

Inicialmente, este é oco. Conforme o cérebro se expande, em tamanho e volume, com o aparecimento dos giros e sulcos, os primórdios de líquido surgem e vão preenchendo-o. Neste processo de expansão, o tubo neural sofre dilatações, originando três vesículas primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O destino final do

prosencefalo é origem do telencefalo e diencefalo; o rombencefalo se divide em metencefalo – forma o cerebelo e a ponte – e mielencefalo – o bulbo. O mesencefalo não se divide (Darnell e Gilberts, 2017).

Concomitante ao surgimento das cristas e sulcos neurais há o rápido crescimento das NSCs em áreas de formação presumida do giro denteado (DG), no hipocampo, e a zona subventricular (SVZ) no terceiro ventrículo (Darnell e Gilberts, 2017). Estas células proliferam, realizando dois tipos de divisão: 1) simétrica, para a manutenção do *pool* celular neurogênico e 2) assimétrica, originando a citoarquitetura cerebral, consequência dos processos de diferenciação, maturação e integração neuronal (Toth et al., 2016). Este processo, que corrobora o que foi exposto anteriormente, permanece na vida adulta, sendo nomeado de neurogênese adulta.

Todos estes processos são finos, complexos e extremamente orquestrados por fatores de transcrição, além da intensa plasticidade sináptica e neurotransmissão. Estudos demonstram que a disponibilidade de glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor excitatório e inibitório no cérebro neonato e de adulto, respectivamente, modulam o desenvolvimento neural (Palamisamy, 2012), influenciam a proliferação e diferenciação neuronal e GABA, *per se*, atua como um sinal de parada para a migração neuronal, além de participar, também, de sinapses excitatórias (Ben-Ari, 2002) durante o neurodesenvolvimento (Schmidt e Mirnics, 2015).

Uma estrutura encefálica na qual este processo é extremamente importante é o hipocampo. Localizado bilateralmente nos lobos temporais do cérebro, esta estrutura está contida no sistema límbico, e se faz importante para os circuitos de aprendizado, memória e navegação espacial. Apresenta as regiões dorsal e ventral e sub-regiões, nomeadas Corpo de Amon (do latim *cornu ammonis*) 1, 2 e 3 (CA1, CA2, CA3, respectivamente) e DG. Aferências provenientes do córtex entorrinal, localizado caudalmente ao córtex olfatório do *uncus*, se projetam para o DG através das vias perfurantes, fazendo sinapse com as células granulares. Estas células realizam a segunda sinapse com as células piramidais de CA3 que, por sua vez, realizam a terceira sinapse com as células piramidais de CA1 através das vias colaterais de *Shaffer*. Por fim, as células de CA1 ligam-se ao *subiculum e pro-subiculum*, retornando ao córtex entorrinal (Amaral et al., 2007; Knowles, 1992).

Dentre as várias formas de se modular esta circuitaria, sobretudo no contexto plástico do neurodesenvolvimento, destaca-se a interferência via gestação, através da interface placentária. A programação materna, definida como a exposição pré-natal a estímulos externos, apresenta significativo impacto sobre os processos fetais, uma vez que é capaz de comprometer, no encéfalo, sinalizações embrionárias presentes na sinapse, diminuindo a sua distribuição, bem como interferindo no direcionamento axonal e diminuindo a neurogênese (Maccarrone et al., 2014). Essas alterações culminam em prejuízos na formação da neuro-circuitaria, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo na vida pós-natal.

## 1.2. Exposição pré-natal a canabinoides

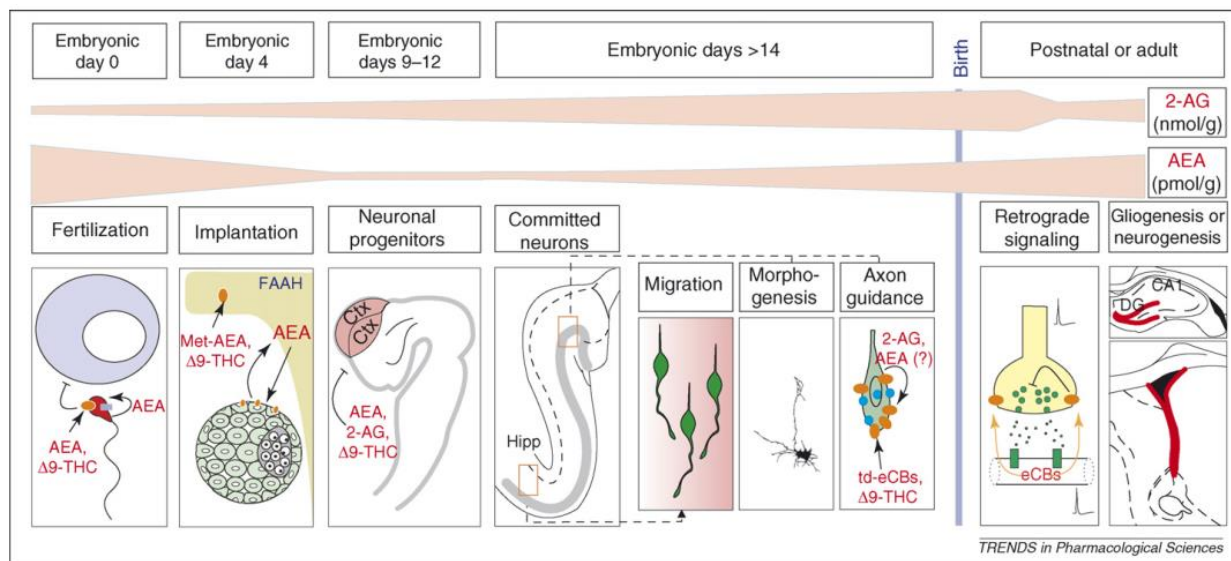
Brown e Graves (2013) demonstraram que a *Cannabis sativa* (CS), planta popularmente conhecida como maconha, é a droga de abuso mais popular entre as gestantes (Brown e Graves, 2013). O *Journal of the American Medical Association* (JAMA) aponta o aumento de 5.7% para 12.1% do uso desta planta por gestantes, sobretudo no primeiro trimestre gestacional (Corsi et al., 2019), sendo o hábito estendido, por 4-6% das mães, até a amamentação (Young-Wolff et al., 2019). Dados da *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* demonstram que o uso de *Cannabis* é estável, ao contrário do contínuo declínio de outras drogas, tais como a heroína e a cocaína, além da utilização diária da primeira pelas gestantes (El Maurroun et al., 2008). Um terço das gestantes acredita que o uso de *Cannabis sativa* não acarretará prejuízos ao feto (Bayrampour et al., 2018). O seu uso é justificado para alívio de náuseas, insônia, ansiedade e dor crônica decorrentes do processo gestacional (Sarrafpour et al., 2020). No Brasil, os dados epidemiológicos não destoam do contexto mundial. Cerca de 80% das usuárias de *Cannabis* mantem o hábito durante a gestação (Nomura et al., 2010). No Sudeste do país, 4,2% das gestantes são usuárias da planta (Mitsuhiro et al., 2006).

Embora a humanidade consuma CS desde a pré-história, seja pelas crenças espirituais e religiosas ou pelas propriedades medicinais (Correa et al., 2016), os primeiros estudos que elucidaram os fitocanabinoides, componentes da planta CS, datam de apenas há algumas décadas. Com o isolamento e caracterização dos compostos Canabidiol (CBD) (Adams et al, 1940; Mechoulam e Shvo, 1963) e do  $\Delta^9$ -

tetraidrocanabidiol (THC) (Mechoulam e Gaoni, 1965), foi possível compreender, ainda que não totalmente, a resposta fisiológica frente a eles. Com a descoberta e caracterização dos fitocanabinoides, pesquisas elucidaram a presença de um sistema endógeno canabinoide, nomeado sistema endocanabinoide (eCBS), de caráter lipídico, sinalização retrógrada e sob demanda, diferenciando-se da neurotransmissão tida como clássica (Alger, 2003).

O eCBS é composto: 1) pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1R) (Matsuda et al., 1990), localizados majoritariamente no sistema límbico, principalmente hipocampo (Marsicano e Lutz, 2006), e do tipo 2 (CB2R) (Munro et al., 1992), presente nas células do sistema imune, ainda que haja estudos que demonstrem a sua existência no hipocampo (Onaivi et al., 2006). Estes receptores se encontram amplamente expressos nos terminais pré-sinápticos, regulando a liberação de neurotransmissores, como GABA, glutamato, serotonina, acetilcolina, dopamina (Freund et al., 2003; Katona et al., 2008) e dos próprios endocanabinoides; 2) as enzimas de síntese – *N*-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e a sn-1-diacilglicerol lípase seletiva (DAG Lipase) (Di Marzo et al., 1994; Cadas et al., 1996) – e 3) degradação – monoacilglicerol lipase (MAGL) e *fatty acid amine hidrolase (FAAH)* – dos endocanabinoides (Cravatt et al., 1996) e 4) pelos endocanabinoides anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) e 2-aracnodoilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

Estudos demonstram a presença de CB1R no encéfalo de ratos a partir do 11º dia gestacional e no de humanos na 14ª semana de gestação (Psychoyos et al., 2012), ainda que outros estudos sugerem a presença do mesmo desde o sinciciotrofoblasto em humanos (Osama et al., 2008) e do blastocisto em ratos (Paria et al., 1995). Apesar desta divergência, é consenso a crescente expressão de CB1R até a vida adulta. O eCBS encontra-se presente e funcional desde as etapas iniciais do neurodesenvolvimento, contribuindo para a estruturação e maturação do sistema nervoso (Psychoyos et al., 2012), conforme a **Figura 1** demonstra.



**Figura 1. Presença do eCBS nas etapas pré-natais, pós-natais e na vida adulta.** O sistema endocanabinoide participa de processos neuroplásticos importantes para o neurodesenvolvimento, se estendendo ativamente até a vida adulta (Retirado de Harkany et al., 2007).

Devido ao caráter lipofílico, os fitocanabinoides CBD e o  $\Delta^9$ -THC são capazes de atravessarem a barreira placentária (Blackard, 1984) e, portanto, participam da composição do leite materno (Perez-Reyes e Wall, 1982), tornando-se acessíveis ao feto durante não só a embriogênese, como também em sua vida pós-natal. A biodisponibilidade fetal a canabinoides desregula o eCBS e culmina em desordens (1) pré-gestacionais – bloqueio da nidação do blastocisto e alteração na morfologia dos espermatozoides (Blackard, 1984) –, (2) gestacionais – comprometimento da morfologia e formação placentária – e (3) no próprio neurodesenvolvimento – bem como (4) na geração de abortos espontâneos (Correa et al., 2016).

No decorrer das décadas, com o aumento do uso de CS no período gestacional, estudos se fizeram necessários para o entendimento das consequências materno-fetais. Destacam-se três, clínicas, que abordam diferentes faixas de idade pós-natal: *The Ottawa Prenatal Prospective Study* (OPPS), no Canadá; *The Maternal Health Practices and Child Development Study* (MHPCD), na Pensilvânia, EUA, e *The Generation R Study* (Gen R), em Roterdã, Holanda (Jutras-Aswad et al., 2009; Calvigigioni et al., 2014; Huizink, 2014; McLemore and Richardson, 2016). Compilados, apontam a presença, até a pré-adolescência, de tremores acompanhados de alterações no ciclo sono-vigília; dificuldades nos processos de atenção e memorização; hiperatividade e impulsividade.



Na fase da adolescência, a prole apresentou problemas cognitivos e emocionais, além de transtornos psiquiátricos como depressão e comportamentos delinquentes, que se mantiveram até a vida adulta.

Estudos pré-clínicos demonstram que a exposição pré-natal a  $\Delta^9$ -THC reduz o peso e tamanho neonatal, além de promover um parto pré-termo (Dekker et al., 2012; Hayatbakhsh et al., 2012). Em embriões de galinha, a administração deste fitocanabinoide provocou alterações neurogênicas, além de comprometer a formação dos somitos e dos primórdios da medula espinal (Psychoyos et al., 2008), indicando que o eCBS participa da formação do tubo neural. Em ratas gestantes, a administração de WIN-55,212-2, agonista de receptores canabinoides, comprometeu a formação de neurônios glutamatérgicos e interneurônios GABAérgicos no córtex cerebral da prole (Saez et al., 2014). Também há relatos na literatura de desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas na vida pós-natal (Calvigione et al., 2014), quase sempre acompanhadas ao déficit de atenção, memória e planejamento (Fried, 2002), tal qual foi observado nos estudos clínicos.

Também foi demonstrado que a exposição pré-natal a CBD promove prejuízos morfológicos e motores (Carty et al., 2019; Kanyo et al., 2021) à prole, além de prejudicar a atividade neuronal e a interação social (Renard et al., 2016; Todd e Arnold, 2016). Também foi demonstrado o impacto da pré-exposição ao fitocanabinoide na fertilidade masculina (Dalterio e DeRooij, 1986) e efeitos deletérios *in vitro* (Schonhofen et al., 2018), ainda que estudos refutem estes achados (Brigante et al., 2018). Nos Estados Unidos, a *Food and Drugs Administration (FDA)* assume que não há estudos suficientes para a compreensão dos efeitos do CBD no desenvolvimento fetal, bem como na gravidez e na amamentação (FDA, 2019), necessitando-se, portanto, de uma maior investigação.

### **1.3. CBD e a terapêutica das Epilepsias**

O CBD tem se mostrado como uma droga eficaz na terapêutica das epilepsias. Definidas como distúrbios neurológicos nos quais as vias neurais se tornam hiperexcitáveis e hipersincronizadas (Fisher et al., 2014), é o segundo ponto de convergência entre Machado de Assis e Fiódor Dostoiévski, já que ambos foram acometidos por este distúrbio. O desequilíbrio abrupto entre os gatilhos dos sinais

excitatórios e inibitórios faz com que os primeiros prevaleçam, afetando as células circundantes, que iniciam o disparo de potenciais de ação disrítmicos, principalmente em regiões encefálicas como o hipocampo, no lobo temporal.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 50 milhões de pessoas são acometidas por epilepsias, sendo que 43% das crianças possuem a primeira crise no 1º ano de vida, tempo coincidente com o processo de sinaptogênese (Represa, 2019). 30% dos pacientes são farmacorresistentes (O’Connell et al., 2017), termo atribuído à não resposta terapêutica frente a dois ou mais fármacos anti-epilépticos. As crises tem duração de 1 a 2 minutos, porém podem ser contínuas por um tempo igual ou maior que cinco minutos, sem o restabelecimento da consciência. A este quadro, chama-se *Status Epilepticus (SE)* (Scharfman, 2007), nome definido durante o décimo *Marseilles Colloquium*, em 1962 (Gastaut, 1983).

O entendimento dos mecanismos do *SE* bem como das epilepsias requer estudos em modelos experimentais animais. A administração intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina (PILO), agonista de receptores muscarínicos colinérgicos, é capaz de mimetizar o *SE* nestes modelos e reproduzir as características biológicas encontradas nos seres humanos (Turski et al., 1983). A administração i.p. de PILO resulta em alta mortalidade neuronal, em múltiplas regiões cerebrais, entre elas o hipocampo (Castro et al., 2011). Dessa maneira, se faz necessária a administração prévia de metil-escopolamina, antagonista muscarínico. Devido ao grupamento metil, este fármaco não atravessa a barreira hematoencefálica e assegura a proteção dos órgãos periféricos.

Em junho de 2018, a *FDA* aprovou o uso do fitocanabinoide CBD, com o nome comercial de *Epidiolex*, para o tratamento de epilepsias refratárias, uma vez que a sua administração reduziu em 40% a incidência de crises (*FDA*, 2018). Além da epilepsia, a terapêutica envolvendo o CBD se expande a múltiplos transtornos neuropsiquiátricos, tais como ansiedade, depressão, psicose (Fogaça et al., 2018; Silote et al., 2019; Garcia-Gutiérrez et al., 2020) e esquizofrenia (McGuire et al., 2018; da Silva et al., 2020).

A eficácia do CBD no tratamento da farmacorresistência é atribuído às suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pela baixa afinidade aos receptores canabinoides (Hindocha et al., 2015) e também por não possuir efeitos cognitivos e psicoativos (Zuardi, 2008) e não provocar dependência ou ser uma droga de abuso (Schoedel et al., 2018).

Devinsky e colaboradores (2016) conduziram um estudo aberto com *Epidiolex*, em doses diárias aumentadas gradualmente até 25 mg/kg/dia. Os resultados dos primeiros 23 pacientes, cuja média de idade foi de 10 anos, demonstraram que 39% dos pacientes tiveram redução de 50% de suas crises enquanto 33% dos pacientes com Síndrome de Dravet, epilepsia refratária muito severa na infância, tiveram suas crises controladas. Os efeitos colaterais mais comuns foram sonolência, fadiga, alterações de peso, diarreia e aumento ou redução do apetite (Devinsky et al., 2016). No Brasil, 25 mg/kg/dia é a dose máxima recomendada pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) para o tratamento das epilepsias.

Um dos mecanismos de ação do CBD é a ativação, ainda que baixa, do CB1R, inibindo a neurotransmissão via bloqueio de canais voltagem-dependentes de cálcio e potássio, colaborando para a redução da excitabilidade neural, da frequência e duração das crises. Estudos demonstram a interação entre o fitocanabinoide e o eCBS. O CBD é capaz de aumentar os níveis de AEA pela inibição da FAAH (Bisogno et al., 2001), além de diminuir os níveis intracelulares de cálcio, modulando a atividade neuronal e atenuando a hiperexcitabilidade presente em pacientes com epilepsia (Gerdeman e Lovinger, 2003). Corroborando os dados, o *nocaute* de CB1R leva ao aumento da susceptibilidade às crises epiléticas, atribuída a modulação pré-sináptica pelo mesmo (Soltesz et al., 2015).

Intervenções farmacológicas que atuam direta ou indiretamente nesse sistema modulador durante a gravidez, como o CBD, THC e outras drogas, induzem um prejuízo no desenvolvimento cerebral, ao passo que prejudicam a neurogênese, alteram a migração neuronal (Palamisamy, 2012) e levam à gênese de crises epiléticas (Todd e Arnold, 2016). As poucas informações existentes na literatura científica sobre o assunto, bem como o aumento do número de países que estão descriminalizando e mesmo legalizando a CS, impõem a necessidade científica e social de entendimento dos efeitos de componentes dessa planta no período gestacional.

Frente ao exposto, acredita-se que a exposição pré-natal a CBD possa acarretar prejuízos na plasticidade neuronal, em especial no controle do balanço entre a excitação e inibição da neurotransmissão, sendo possível, dessa forma, que os animais, na vida pós-natal, tendam a ter uma facilitação na geração do *Status Epilepticus*, neste caso particular

induzido por administração sistêmica de PILO (Cavalheiro et al., 1987), hipótese desta Dissertação.

Esperamos que as informações encontradas nesse estudo acrescentem aos dados na literatura científica e possam ser utilizados para a manutenção das políticas de saúde pública vigentes no país.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o efeito da exposição pré-natal ao CBD no neurodesenvolvimento, assim como sua associação com a resposta à indução de *SE* durante a vida pós-natal.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Verificar a progressão do peso das fêmeas gestantes e dos filhotes em 5 janelas de tempo – 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós-natais (P0, P7, P14, P21 e P28, respectivamente) frente à administração de CBD durante o período pré-natal.
2. Avaliar a expressão e distribuição de CB1R hipocampais em diferentes estágios (P0, P7 e P14) da vida pós-natal.
3. Analisar a influência da exposição pré-natal ao CBD na geração de *SE* aos 28 dias pós-natais (P28), frente a administração de uma dose subconvulsivante de PILO.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Todos os procedimentos e condutas propostos nessa Dissertação foram submetidos ao Comitê de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal da FMRP/USP e aprovados com o número de protocolo 201/2019.

Foram utilizadas 10 fêmeas *Sprague-Dawley* primíparas, com idade média de 8 semanas e peso entre 200-250 g, provenientes do Serviço de Biotério do Campus Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério de ratos, localizado nas dependências do Departamento de Fisiologia, no Prédio Central da FMRP/USP, em condições ambientais controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura  $\pm 21^{\circ}\text{C}$  e acesso *ad libitum* à água e ração. Os animais foram acomodados e mantidos em caixas de polietileno transparentes de dimensões 40,5 x 33,5 x 21 cm, com tampa de ferro cromado, em número máximo de 3 a cada caixa.

Foi realizado o esfregaço vaginal diário nas fêmeas e apenas aquelas que apresentaram ciclo estral de 4 dias foram utilizadas para o estudo (**Material Suplementar – Figura 33**). Na fase de estro, considerada fértil, as fêmeas foram colocadas para o acasalamento, que se deu da seguinte forma: ao fim da tarde, em caixas separadas, com as mesmas características das previamente descritas, 2 fêmeas foram colocadas na presença de 1 macho, *Sprague-Dawley*, 10 semanas, 350-380 g. Na manhã seguinte, por volta das 6 h30 – 7 h, foi realizado o esfregaço vaginal. Quando se detectou a presença de espermatozoides, foi considerado o dia gestacional 1 (GD1) (**Material Suplementar – Figura 34**) e o tratamento das fêmeas iniciou-se.

As ninhadas foram reduzidas a um tamanho padrão de 10 filhotes, divididos em 5 machos e 5 fêmeas, considerando 24 horas após o nascimento. Os animais mantiveram-se com a mãe para a amamentação até os 21 dias pós-natais. Os dez grupos experimentais se fizeram em um número amostral médio de 8 animais/grupo, sendo 4 machos e 4 fêmeas, retirados de mães distintas nos espaços de tempo: ao nascimento, 7, 14, 21 e 28 dias após o mesmo (P0, P7, P14, P21 e P28, respectivamente), somado aos seus respectivos grupos controles.

### 3.2. Tratamento

O CBD (pureza de 99.6%; *BSPG-Pharm – Sandwich*, UK) foi preparado sempre minutos antes da administração. Sua diluição se deu em solução salina 0,9% contendo

*Tween 80* (0,2% v/v). As fêmeas gestantes foram inoculadas, via subcutânea (s.c.), com a dose única e diária de 25 mg/kg de CBD, valor este definido a partir da dosagem máxima recomendada pelo Conselho Federal de Medicina para o tratamento das epilepsias. O tratamento foi mantido até o dia do nascimento. Os animais do grupo controle receberam a solução veículo, constituída por solução salina 0,9% acrescido de *Tween 80* (0,2% v/v).

### **3.3. Avaliação das propriedades farmacocinéticas do CBD**

Para avaliar as propriedades farmacocinéticas, foram determinadas as concentrações plasmáticas e cerebrais de CBD nas proles (P0, P7, P14, P21 e P28) das fêmeas gestantes. Para tal, utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta pressão (do Inglês *High Pressure Liquid Chromatography, HPLC*) acoplado a massas, análises realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Bruno Spinosa de Martinis e a Doutoranda Nayna Cândida Gomes, ambos do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP). O protocolo de execução desse experimento está descrito imediatamente abaixo.

#### **3.3.1. Materiais**

O padrão CBD e o padrão interno THC-d3 foram adquiridos da *Cerilliant – Sigma-Aldrich*, EUA. O solvente utilizado foi o éter de petróleo (*Sigma-Aldrich*, EUA) grau *HPLC*.

##### **3.3.1.1. Equipamentos e Acessórios**

Para realização das análises foi utilizado cromatógrafo em fase gasosa modelo 7890 A (*Agilent*) acoplado a espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo, modelo 5975 C (*Agilent*) e equipado com amostrador automático, modelo 7693 (*Agilent*); coluna capilar de sílica fundida HP 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) da *Agilent* (EUA); cilindro de gás hélio 5.0 analítico da *White Martins*

(Brasil); seringa de injeção líquida de volume 10  $\mu\text{L}$  (*Agilent*, EUA); concentrador de amostras *Caliper LifeScience Turbo Vap (LP)*, (EUA); cilindro de nitrogênio 4.0 (*Air Liquide*, Brasil); agitador TE 140 (*Tecnal*, Brasil); vórtex AP-56 (*Phoenix*, EUA) e balança analítica BL 1500S (*Sartorius*, EUA); *dry block* (*Tecnal*, Brasil).

### 3.3.1.2. Preparo de Soluções

A solução-padrão de referência de CBD foi obtida em uma concentração inicial de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e foi diluída para as concentrações de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  seguindo uma diluição seriada.

A solução de padrão interno THC-d3 foi preparada na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para tanto, foram pipetados  $100 \mu\text{L}$  da ampola de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em um balão volumétrico de 10 mL e o volume final foi completado com metanol, originando a solução de concentração  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Todas as soluções preparadas foram devidamente identificadas, armazenadas no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em frascos de vidro com tampa rosqueável e envolvidos por papel alumínio.

## 3.3.2. Métodos

### 3.3.2.1. Procedimento Experimental

Para o preparo das amostras de plasma foi utilizado a extração líquido-líquido. No procedimento,  $250 \mu\text{L}$  de plasma foram pipetados em um tubo de vidro de fundo cônico de 9 mL e foram fortificados com 50 ng ( $200 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) do padrão interno (THC-d3). Em seguida, foram adicionados 2 mL de diclorometano. Esse tubo foi submetido a agitação no vórtex por 1 minuto e, em seguida, à agitação horizontal por 20 minutos a 240 rpm. Posteriormente, foi centrifugado por 5 min a 1800 rpm. Feito isso, 2 mL da fase orgânica foram transferidos para outro tubo de vidro de fundo cônico de 15 mL. O extrato foi

evaporado a 38°C no concentrador de amostras sob fluxo de nitrogênio (N<sub>2</sub>), ressuspensão com 35 µL de acetato de etila e foi transferido para o vial. Em seguida foi realizada a etapa de derivatização em que foram adicionados 25 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) e aquecido por 30 minutos a 65 °C. Foi injetado 1 µL no GC-MS.

As amostras de cérebro também foram preparadas utilizando a extração líquido-líquido, porém inicialmente foram pesadas separadamente, em seguida, foram transferidas para tubos de vidro de fundo cônico de 9 mL. Foram trituradas e o procedimento experimental foi prosseguido igual ao realizado com as amostras de plasma.

### 3.3.2.2. Condições Cromatográficas

Foi desenvolvido o método para determinação de CBD em amostra de plasma empregando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A separação foi realizada em coluna capilar de sílica fundida HP 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme). O injetor foi operado à 270 °C no modo *splitless* e o volume de injeção foi de 1 µL. O hélio foi utilizado como gás de arraste num fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

A temperatura inicial do forno foi de 90 °C, posteriormente, foi elevada à 200 °C a uma taxa de aquecimento de 25 °C.min<sup>-1</sup>. Em seguida, a temperatura foi elevada à 300 °C a uma taxa de aquecimento de 30 °C.min<sup>-1</sup>, permanecendo por 4 minutos, totalizando 11,733 minutos de análise.

O espectrômetro de massas com analisador de massa quadrupolo foi utilizado inicialmente no modo de operação *full scan*, com seleção de massas de 50 a 400 m/z e, após verificar os íons de quantificação e de identificação dos analitos, este analisador foi operado no modo SIM. O modo de ionização utilizado foi o de elétrons. A temperatura utilizada no MS interface, fonte e quadrupolo foi de 250, 230 e 150 °C, respectivamente.



### 3.4. Indução de *SE*

Foi administrada via intraperitoneal (i.p.), nos animais nascidos há 28 dias (P28), a dose de 240 mg/kg de PILO, agonista colinérgico que age em receptores muscarínicos. Esse valor é considerado, pelos trabalhos prévios do laboratório, subconvulsivante (Garcia-Cairasco et al, 2004; Donatti, 2015). Os animais do grupo controle receberam salina 0,9%, i.p.

Para reduzir os efeitos periféricos da PILO, foi administrada, também i.p., 30 minutos antes, N-metil-escopolamina na dose de 2 mg/kg. O início do *SE* foi definido a partir de uma primeira crise comportamental de classe 5 na escala de Racine (1972), adaptada por Pinel e Rovner (1978) ou crises tônico-clônicas sustentadas por mais de 5 minutos. Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados e, após a completa certificação deste processo, eutanasiados, com a imediata retirada dos cérebros para as análises.

**Tabela 1** – Escala de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978) para a classificação das crises epiléticas.

Classe 1	Automatismos faciais
Classe 2	Mioclonia de cabeça
Classe 3	Mioclonia de patas anteriores
Classe 4	Elevação
Classe 5	Elevação e queda
Classe 6	Mais de uma crise classe 5
Classe 7	Corridas e pulos
Classe 8	Convulsão tônico-clônica generalizada

### 3.5. Registro e Análise Comportamental

Os animais foram colocados em caixas de acrílico de dimensões 30 x 30 x 30 cm imediatamente após a administração de PILO. Para esse processo, utilizou-se a câmera DCR-HC40 Sony registrando-os durante 90 minutos.

A avaliação comportamental está descrita em Pinel e Rovner (1978), a qual adiciona ao Índice de Gravidade de Crises Límbicas sugerido por Racine (1972), alguns eventos que descrevem comportamentos tipicamente evocados pela ativação de estruturas do sistema límbico (até classe 5), outros associados a repetição de classes 5 (classe 6) e aqueles evocados por recrutamento de estruturas do tronco cerebral (classe 7 e 8). Estes índices foram paulatinamente adaptados para avaliação de *SE* (Leite et al., 2002; Tilelli et al., 2003; Tilelli et al., 2005).

### 3.6. Coleta e Processamento do Plasma

Dois filhotes pré-expostos ao CBD de cada um dos grupos P0, P7, P14, P21 e P28, totalizando 10 animais (n=10) e 1 filhotes pré-exposto ao Veículo dos grupos P14, P21 e P28, totalizando 3 animais (n=3) foram corretamente anestesiados com Isoflurano 4% e, após a verificação da ausência de sensação de estímulos dolorosos, decapitados. O sangue foi coletado em tubos *ependorfs* de 1.5 mL previamente colocados no gelo.

Após o fim da coleta, os tubos foram centrifugados a 4°C e 14.000 rotações por minuto (rpm) por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo *ependorf* e armazenado, até a análise, a -80°C.

### 3.7. Coleta, Corte e Processamento dos Cérebros

Para a análise das concentrações encefálicas de CBD foram utilizadas um animal de cada um dos cinco grupos P0, P7, P14, P21 e P28, pré-expostos ao CBD, totalizando 5 filhotes (n=5). Do grupo pré-exposto ao Veículo, foi utilizado um cérebro (n=1) do grupo P21.

Essa diferença na quantidade de amostras tanto plasmáticas quanto encefálicas se deve a um erro de cálculo do experimentador e pelas limitações que a Pandemia de COVID-19 impôs, uma vez que foi impossibilitado o pedido de novos animais e dado que a análise, conforme supracitado, foi feita em colaboração com outro laboratório.

Após coletados, os cérebros foram lavados em solução PBS 1x, com o excesso de água retirado cuidadosamente e armazenados em tubos *eppendorfs*, até a análise, a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para a imunistoquímica, os animais P28 foram eutanasiados, decapitados e os cérebros foram removidos e fixados pelo método de imersão em paraformaldeído (PFA) (4% em PBS 100 mM; pH 7.4) por 2 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, para a crioproteção do material biológico, os cérebros foram transferidos para tubos *falcons* contendo solução de sacarose 30% diluída em PBS.

Os mesmos foram mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$  até a precipitação do material e, finalmente, foram levados ao criostato (*Microm HM-5005-E, Microm International, Walldorf, Germany*), com temperatura variando de  $-22^{\circ}\text{C}$  a  $-18^{\circ}\text{C}$ , localizado na Sala de Histologia do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP, para o congelamento.

Este mesmo aparelho foi utilizado para a execução dos cortes na região hipocampal  $-2,12\text{ mm}$  até  $-6,3\text{ mm}$  com relação ao bregma (Paxinos and Watson, 2005), feitos em uma espessura de  $40\text{ }\mu\text{m}$  e colocados em lâminas previamente gelatinizadas, as quais foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio de imunistoquímica.

### **3.8. Imunoistoquímica**

A imunistoquímica para o CB1R foi executada segundo descrito em Tsou et al., 1998, McDonald and Mascagni, 2001 e Lazarini-Lopes et al., 2020.

Inicialmente, as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7.4) por três vezes de cinco minutos. Em seguida, foram permeabilizadas, por vinte minutos, com Triton X-100 0,3% em PBS (v/v) e, em seguida, por quinze minutos, os aldeídos livres foram bloqueados com 0,1 M Glicina em PBS. Duas outras lavagens com PBS, durante o mesmo tempo, foram realizadas e a atividade de peroxidases endógenas foi bloqueada com a imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 4.5% (v/v) por trinta minutos. Em

seguida, para o bloqueio de sítios inespecíficos, as mesmas foram incubadas em solução de bloqueio (albumina bovina – BSA – 2% (m/v) e 0,05% Triton X-100 (v/v)) por duas horas em temperatura ambiente. Finalizado este tempo, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-CB1 (1:500; *Ab23703, lot. GR3239384-2, Abcam*), diluído em solução de bloqueio e aplicado nos cortes, ficando estes incubados, *overnight* (12-16 horas), à temperatura de 4°C

No dia seguinte, as lâminas foram novamente lavadas por três vezes de cinco minutos cada com PBS e incubadas, por duas horas à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário biotilado *goat anti-rabbit IgG* (1:500; *BA-1000, lot. Zb0318, Vector*) diluído em solução de bloqueio. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e Tris-HCl (0,05 M; pH 7,6) e os sítios antigênicos imunorreativos foram visualizados usando a 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

As lâminas foram montadas, colocando-se a lamínula sob os cortes, utilizando-se o meio de montagem *Permount* (*Sigma, EUA*).

### **3.9. Captura, Processamento e Análise das Imagens**

O ensaio de imunoistoquímica foi realizado nos animais com 28 dias pós-natal, divididos nos grupos Controle (n=7) e CBD (n=12). Uma média de 6 cortes (12 hipocampos) foram analisados por animal.

As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio Olympus BX61VS com a objetiva de aumento de 20x. Todos os parâmetros foram mantidos durante a aquisição das imagens.

A intensidade de CB1R foi analisada utilizando-se o *software ImageJ* ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)) com *Fiji* (Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012). Para as sub-regiões hipocampais, 3 áreas retangulares padronizadas (*regions of interest, ROIs*) com 2.500  $\mu\text{m}^2$  foram medidas aleatoriamente. O valor médio da *Integrated Density* (produto da área e o valor médio de cinza) foi calculado utilizando-se o valor médio de 3 *ROIs* em cada estrutura de cada corte, e ao fim foi gerado um valor médio representado pela média de todos os cortes analisados por animal. Para análise da área total, foi utilizado um *ROI*

manual, cobrindo toda a extensão da estrutura analisada, afim de avaliar a *Integrated Density*.

Também visando a análise da expressão de intensidade de CB1, foi elaborado um *heatmap*, usando o *software ICY Biomage*. As imagens foram previamente invertidas e convertidas em escalas de cinza. O modelo de mapa de cores foi aplicado usando o modelo *Morgenstemning* como *template*. A barra de escalas de cor foi gerada com o *pluguin Color Bar 1.0.1.0* desenvolvido por Stephane Dallongeville e disponível em <http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/color-bar/>. A barra de escala de cores gerada representa os valores médios de intensidade com uma variação do mínimo 0 (preto) ao máximo 255 (branco).

### **3.10. Análises Neuroetológicas**

O método de análise neuroetológico baseia-se no princípio de que a avaliação de sequências comportamentais é mais consistente do que medidas comportamentais isoladas, como uma abordagem à chamada gramática do movimento e seus princípios de temporalidade e organização hierárquica (Fentress e Stilwell, 1973; Norton, 1977; Garcia-Cairasco et al., 1996; Garcia-Cairasco, 2002).

Garcia-Cairasco e colaboradores utilizam a avaliação neuroetológica desde 1983 para o estudo comportamental e sua correlação neurofisiológica (neuroetologia) em modelos experimentais de epilepsia (Garcia-Cairasco e Sabbatini, 1983; Garcia-Cairasco et al., 1992; Garcia-Cairasco et al., 1996; Rosseti et al., 2006).

No presente trabalho, para avaliação de crises límbicas, utilizou-se a escala de Racine (1972) modificada por Pinel e Rovner (1978). Na ocorrência de crises que dependem do tronco cerebral, o índice de gravidade de crises mesencefálico, desenvolvido por Garcia-Cairasco et al. (1996), foi utilizado.

Para a análise mais detalhada das sequências comportamentais, determinaram-se períodos de observação de 300 segundos (5 minutos), denominadas janelas de tempo fixo. Todo comportamento apresentado em uma determinada janela de tempo foi registrado, segundo a segundo, de acordo com um dicionário de itens comportamentais (Garcia-

Cairasco et al., 1992). Para esse procedimento, reproduziram-se os vídeos várias vezes, retrocedendo-os e adiantando-os quantas vezes fossem necessárias.

Uma vez obtidos os dados e codificados de acordo com o dicionário, foi utilizado o programa *ETHOMATIC* (Garcia-Cairasco et al., 1992) para a análise estatística. Esse programa exibe a frequência média e duração média de cada item comportamental na janela de observação fornecida. O programa realiza as análises estatísticas, verificando associações significativas entre pares de itens comportamentais (díades), calculando o valor de  $\chi^2$ , quando  $p < 0.05$ ;  $\log \chi^2 \geq 0.25$ .

Fluxogramas foram construídos para a representação gráfica de todos os dados estatisticamente significativos. Para tal, utilizou-se o programa Microsoft Power Point 2016. No fluxograma, cada retângulo representa um comportamento. A altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência enquanto sua base representa a duração média do comportamento durante a observação. As cores identificam qualitativamente classes relacionadas ao comportamento, sendo 1) o **azul** comportamentos não-epilépticos, 2) o **verde**, comportamentos límbicos; 3) o **amarelo**, *wild running* (fase procursiva: giros, pulos e queda atônicas) e início de comportamentos mesencefálicos e 4) o **vermelho**, crises tônico-clônicas.

O padrão de calibração está expresso na **Figura 2**.



**Figura 2. Padrão de Calibração para a elaboração dos fluxogramas (Garcia-Cairasco et al., 1992).** Cada retângulo representa um comportamento. A altura dos retângulos simboliza a frequência de ocorrência enquanto a base, a duração média comportamental durante a observação. As setas representam valores estatísticos ( $\chi^2 \geq 3,841$ ;  $\log \chi^2 \geq 0.25$ ;  $p < 0.05$ ). A cor do retângulo identifica qualitativamente a classe comportamental e a cor das setas, o ponto de partida das mesmas, acompanhando a cor do retângulo que origina a interação entre pares comportamentais (Pereira, 2015)

### 3.11. Análise Estatística

Os resultados obtidos estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM). *One-way ANOVA* seguido de *post-hoc* de *Dunnet* quando a variável “tratamento” foi analisada. *Two-way ANOVA* seguida por *pos-hoc Sidak* foi empregado quando duas variáveis (região hipocampal e tratamento / tratamento e idade) estavam sendo analisadas. Teste t de *Student* pareado foi empregado para verificar se houve diferença estatística na latência para o desenvolvimento de *SE*. Teste t de *Student* não-pareado para a análise do índice de gravidade categorizado (Rossetti et al., 2006). Teste de qui-quadrado para as análises neuroetológicas. Todos os testes estatísticos acima citados foram realizados com

auxílio do software estatístico *GraphPad Prism* 8. Valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

Em decorrência da Pandemia de COVID-19, declarada pela Organização Mundial da Saúde em março de 2020, as atividades das Universidades de todo o mundo foram interrompidas. Por esse motivo, não foi possível a execução das técnicas para a verificação das subpopulações neuronal, astrocitária e de micróglia. O peso das fêmeas gestantes tratadas com veículo e CBD foi mensurado, bem como de sua prole, nos intervalos de tempo previamente citados. Também foram analisados o padrão comportamental e o teste para estabelecimento de *SE* nos animais P28. Essa também foi a idade escolhida para a avaliação da expressão de CB1R hipocampal. Foram feitos todos os esforços para que na época da defesa para a obtenção deste título de Mestre não fosse excluída, em hipótese alguma, a execução de experimentos que ficaram pendentes, mas sempre dentro do contexto de segurança que o panorama universitário e social no país permitisse.

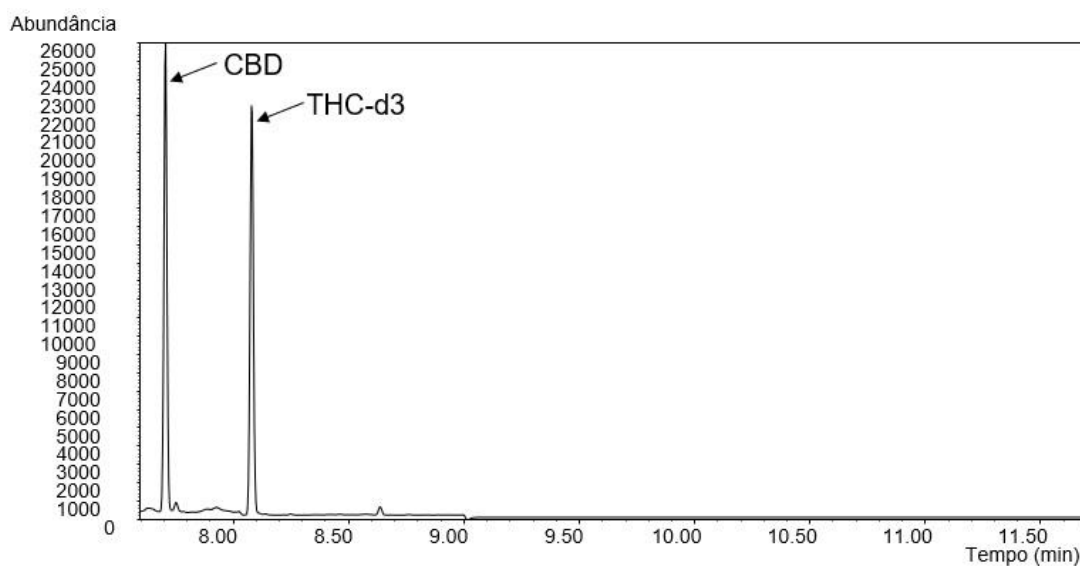
### 4.1. Concentrações Plasmáticas e Cerebrais de CBD

Para estabelecer as condições dessa análise, iniciou o desenvolvimento do método com a análise da solução padrão de CBD e do padrão interno THC-d3. Na **Tabela 2** estão descritos os íons de quantificação e qualificador (íons de identificação) monitorados para o analito (CBD) e o padrão interno. O cromatograma obtido a partir dessa análise está expresso na **Figura 3**.

**Tabela 2.** Íons de quantificação e identificação do analito e do padrão interno.

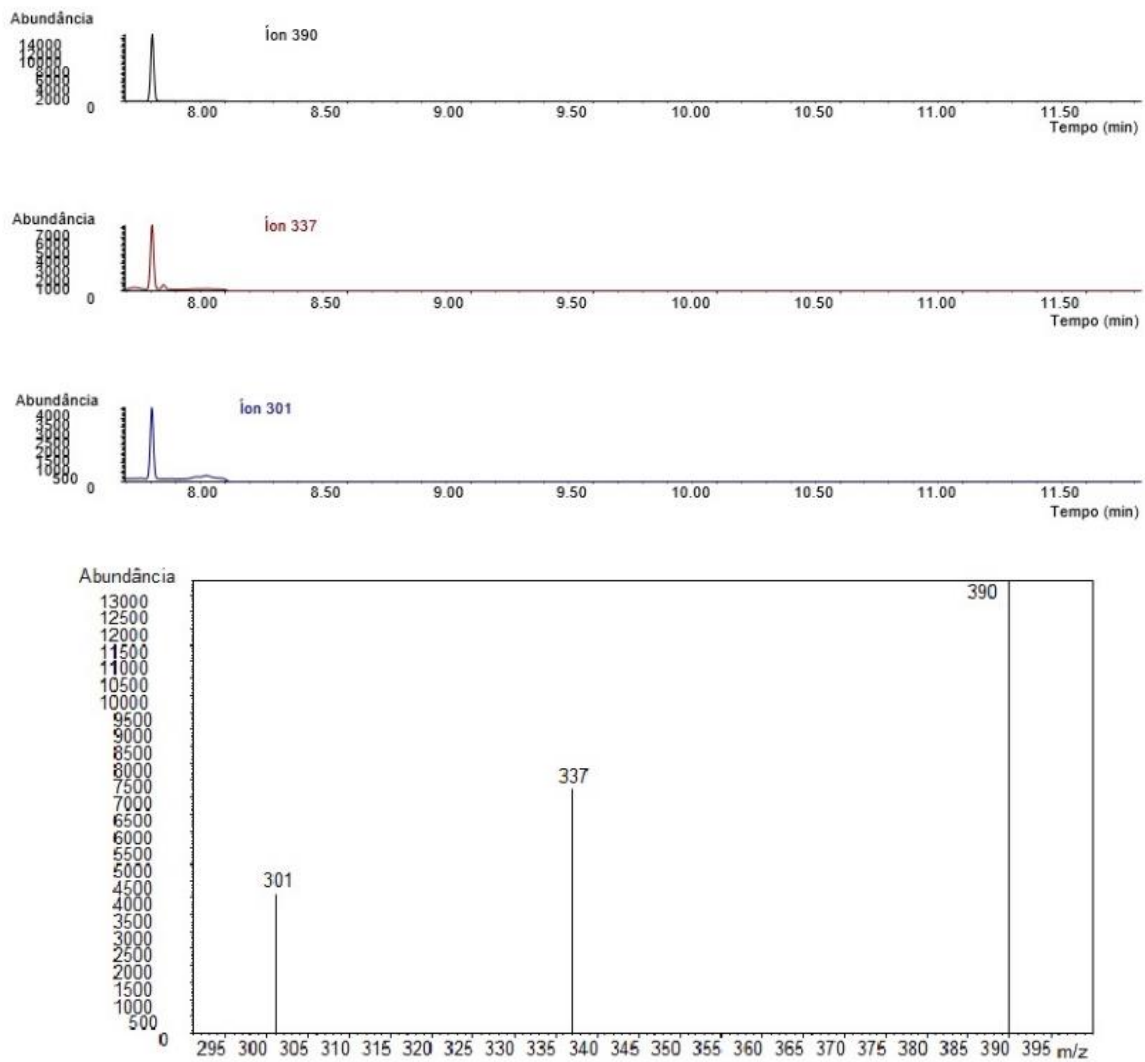


Analito	Íon de quantificação (m/z)	Íon qualificador (m/z)	Tempo de retenção (min)
<b>CBD</b>	390	337, 331	7,701
<b>THC-d3</b>	374	389, 306	8,076

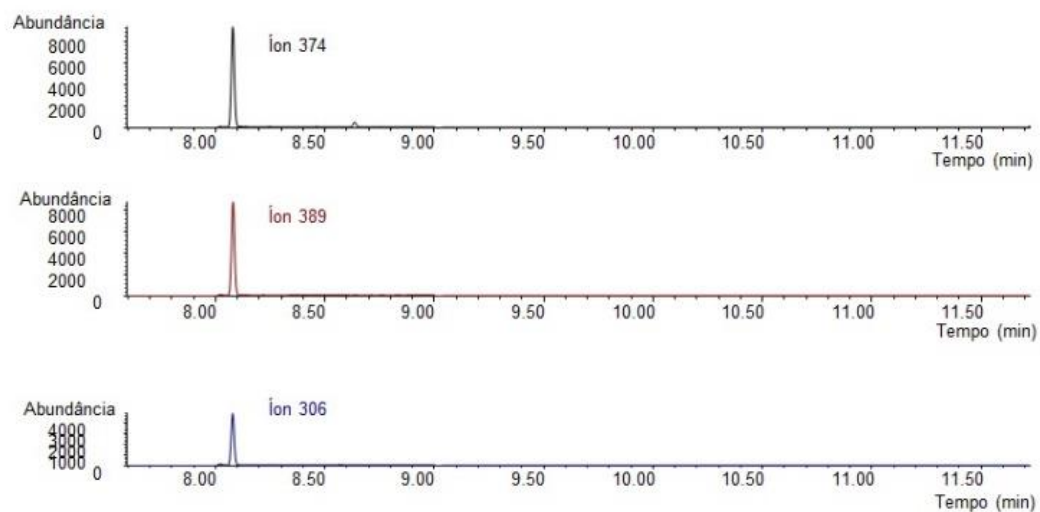


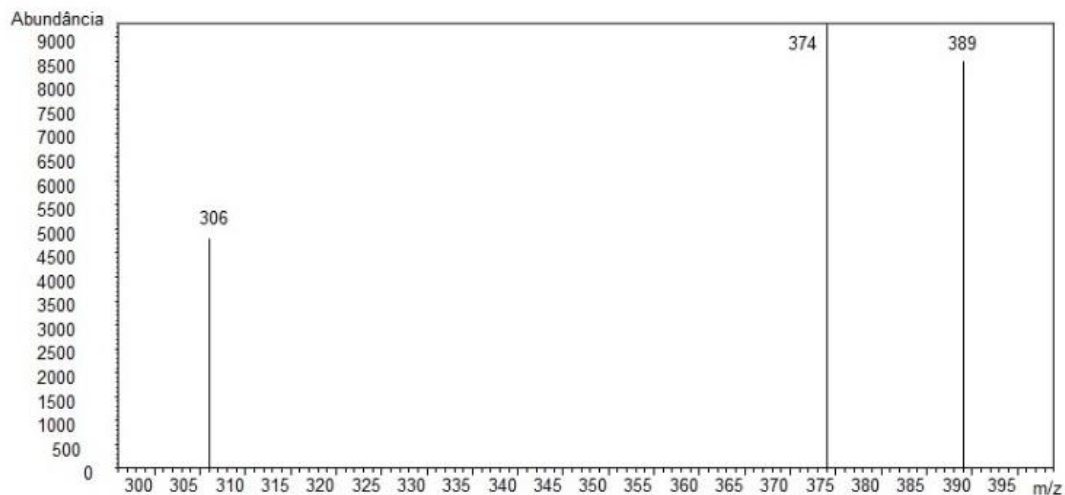
**Figura 3.** Cromatograma obtido na otimização do pico do analito (CBD) e do padrão interno (THC-d3) ao analisar a solução padrão de 50 ng.

Nas **Figuras 4 e 5** estão apresentados os cromatogramas e espectros de massas de cada analito, com as abundâncias de cada íon selecionado.



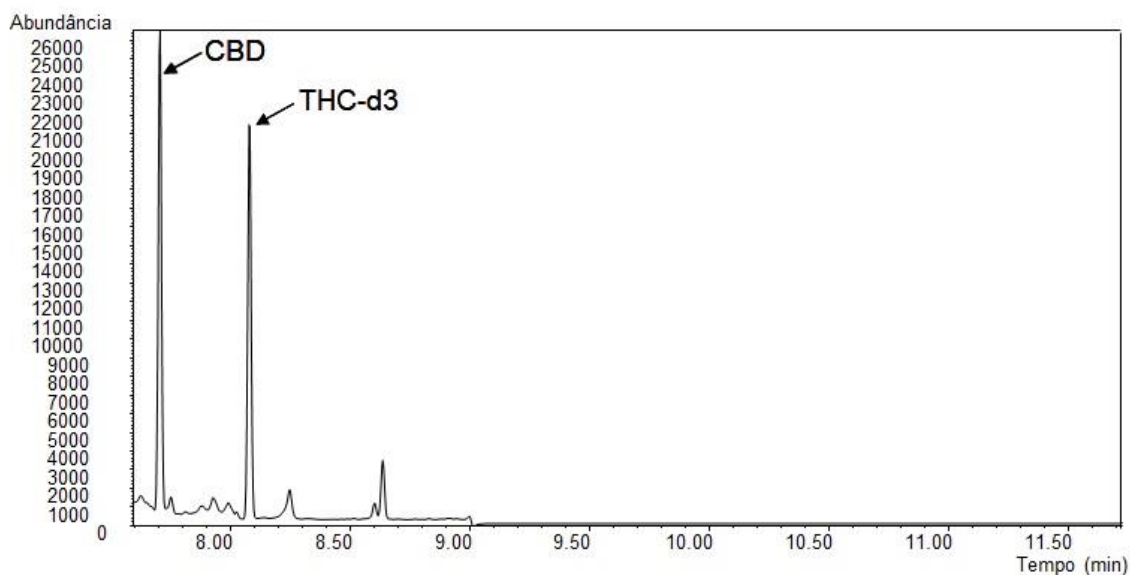
**Figura 4.** Cromatograma e espectro de massas obtidos da análise por GC-MS da solução padrão de CBD na concentração de 50 ng/250 mL de plasma.





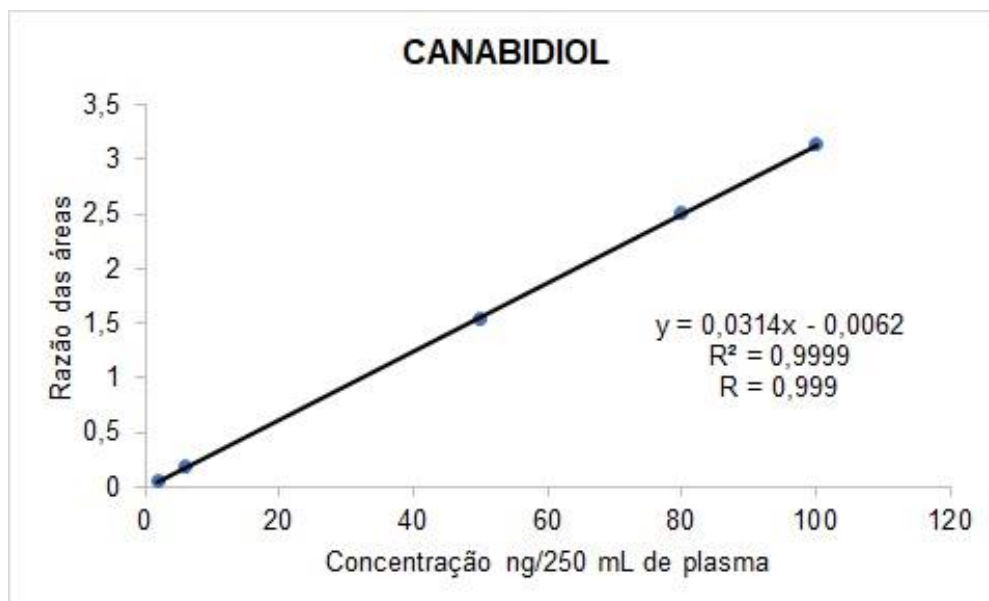
**Figura 5.** Cromatograma e espectro de massas obtidos da análise por GC-MS da solução padrão de THC-d3 na concentração de 50 ng/250 mL de plasma.

Foi realizada a extração líquido-líquido, nas amostras de plasma e cérebro, utilizando o éter de petróleo como solvente extrator (**Figura 6**).



**Figura 6.** Cromatograma obtido da amostra de plasma “branco” fortificada com 50 ng/250 mL de plasma de CBD e THC-d3 submetida a extração líquido-líquido.

O método foi considerado linear na faixa de concentração de 2 a 100 ng/250 mL de plasma para o CBD e o coeficiente de correlação linear foi de 0,999 (**Figura 7**). O limite de detecção foi de 1 ng/250 mL de plasma.



**Figura 7.** Curva de calibração, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação linear ( $R$ ) do CBD.

As amostras de plasma e cérebro foram submetidas à extração líquido-líquido. No grupo CBD, foram selecionadas duas amostras de plasma e 1 cérebro para cada grupo, totalizando 10 amostras do primeiro e 5 amostras do segundo. Foram selecionadas também 3 amostras de plasma e 1 cérebro do grupo controle, ainda que a ausência da detecção do fitocanabinoide fosse assegurada.

Os resultados dessa análise demonstram que a concentração plasmática de CBD, expressa em ng/250 mL, é maior nos períodos P0 e P7, com o pico de concentração no último, decaindo a níveis indetectáveis em P14 e P21. Em P28, a concentração plasmática de CBD volta a ser detectável, porém em valores mais baixos do que os períodos iniciais da análise.

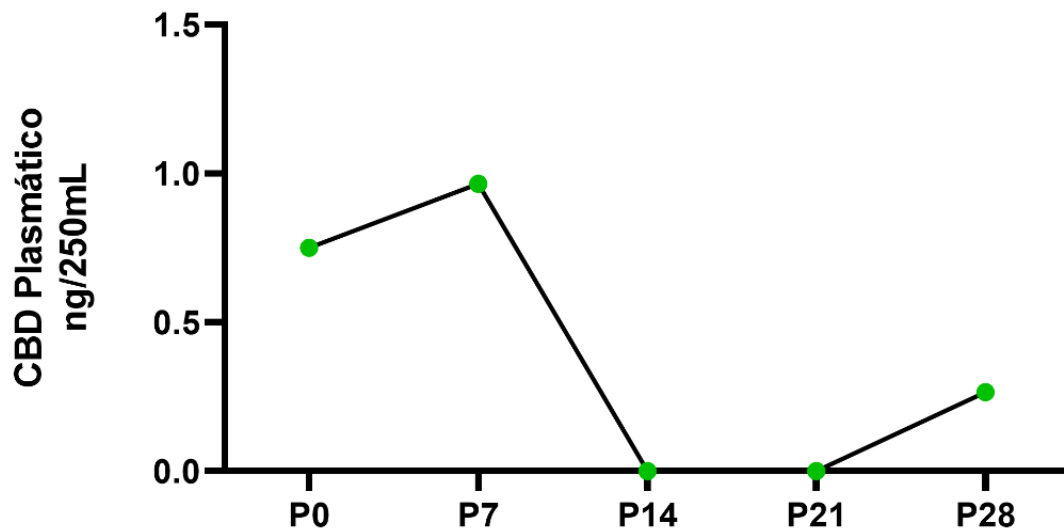
As concentrações encefálicas desse mesmo fitocanabinoide corroboram as análises plasmáticas, demonstrando a alta concentração de CBD no cérebro dos filhotes recém-nascidos (P0) e a detecção, ainda que em valores muito menores, aos 7 dias pós-natais. Tal qual a análise plasmática, nos períodos de 14 e 21 dias pós-natais não houve a detecção de CBD encefálico; em P28, há a detecção deste, em concentrações próximas ao observado em P7.

Os resultados dessa análise estão dispostos na **Tabela 3 e nas Figuras 8 e 9.**

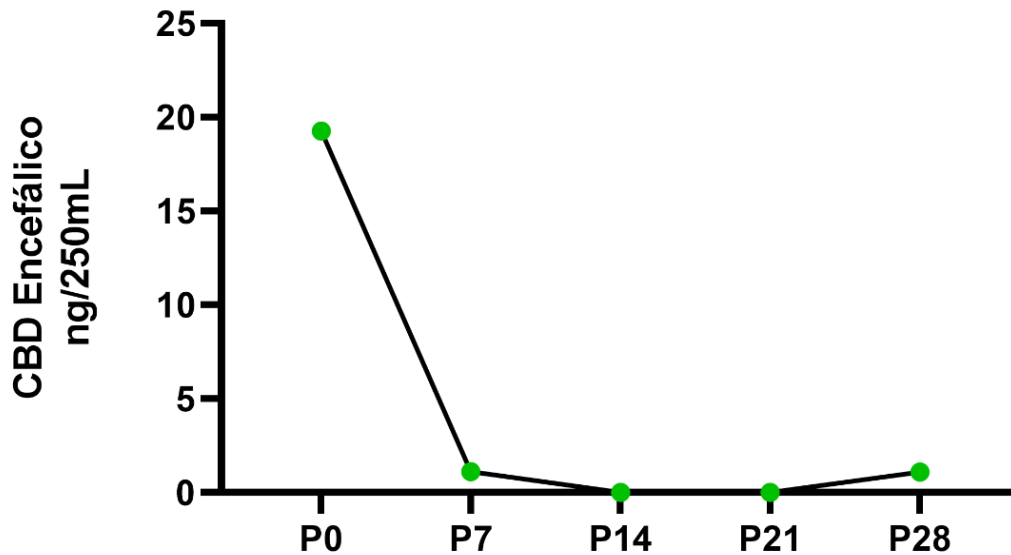
**Tabela 3.** Valores de área e concentração do CBD nas amostras de plasma (branco) e cérebro (cinza).

Nº Amostra	Área CBD	Área PI	Razão CBD/PI	[CBD ng/250mL]
P0 CBD – Plasma 1	62	3553	0,017	0,75
P0 CBD – Plasma 1.1	73	4213	0,017	0,75
P7 CBD – Plasma 1	101	4414	0,023	0,93
P7 CBD – Plasma 1.1	130	5188	0,025	1,00
P14 CBD – Plasma 1	ND	7111	ND	ND
P14 CBD – Plasma 1.1	ND	7818	ND	ND
P21 CBD - Plasma 1	ND	7411	ND	ND
P21 CBD – Plasma 1.1	ND	7643	ND	ND
P28 CBD – Plasma 1	15	7788	0,002	0,26
P28 CBD – Plasma 1.1	17	7813	0,002	0,27
P14 Controle – Plasma	ND	8867	ND	ND
P21 Controle – Plasma	ND	7832	ND	ND
P28 Controle – Plasma	ND	10608	ND	ND
P21 Controle Cérebro	ND	7603	ND	ND
P0 Cérebro CBD	4756	7945	0,599	19,26
P7 Cérebro CBD	253	8782	0,029	1,11
P14 Cérebro CBD	ND	4009	ND	ND
P21 Cérebro CBD	ND	8450	ND	ND
P28 Cérebro CBD	116	4157	0,028	1,09

\*ND: não detectado.

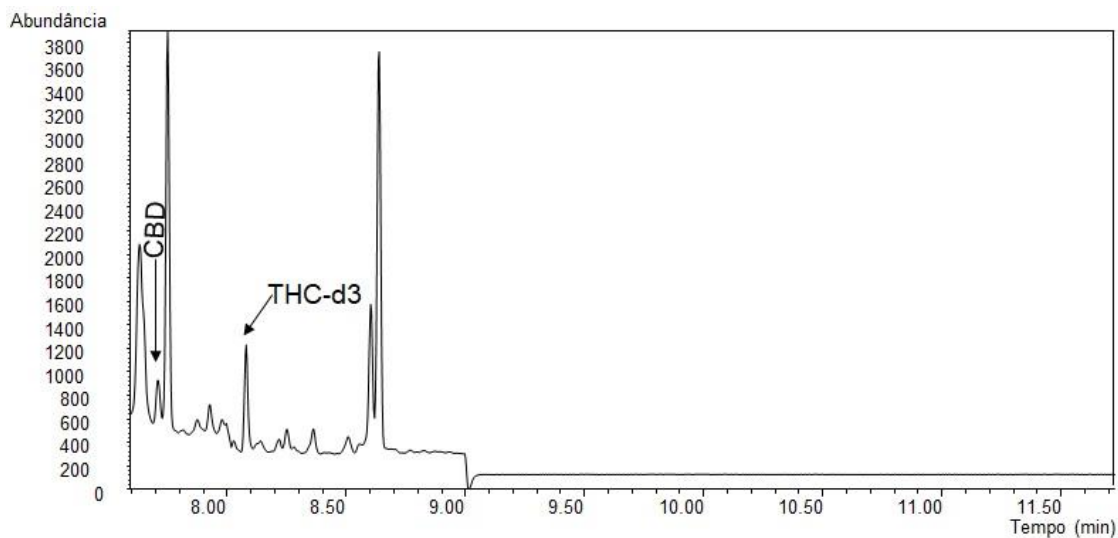


**Figura 8.** Quantificação de CBD plasmático, expresso em ng/250mL, em cinco intervalos de tempo de filhotes pré-expostos ao fitocanabinoide.

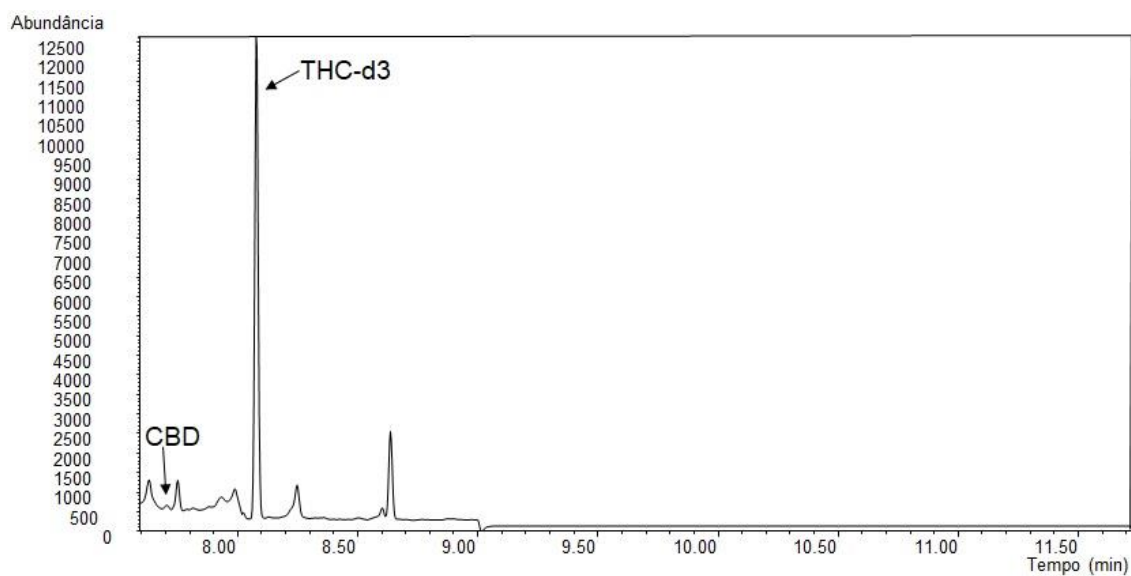


**Figura 9.** Quantificação de CBD encefálico, expresso em ng/250mL, em cinco intervalos de tempo de filhotes pré-expostos ao fitocanabinoide.

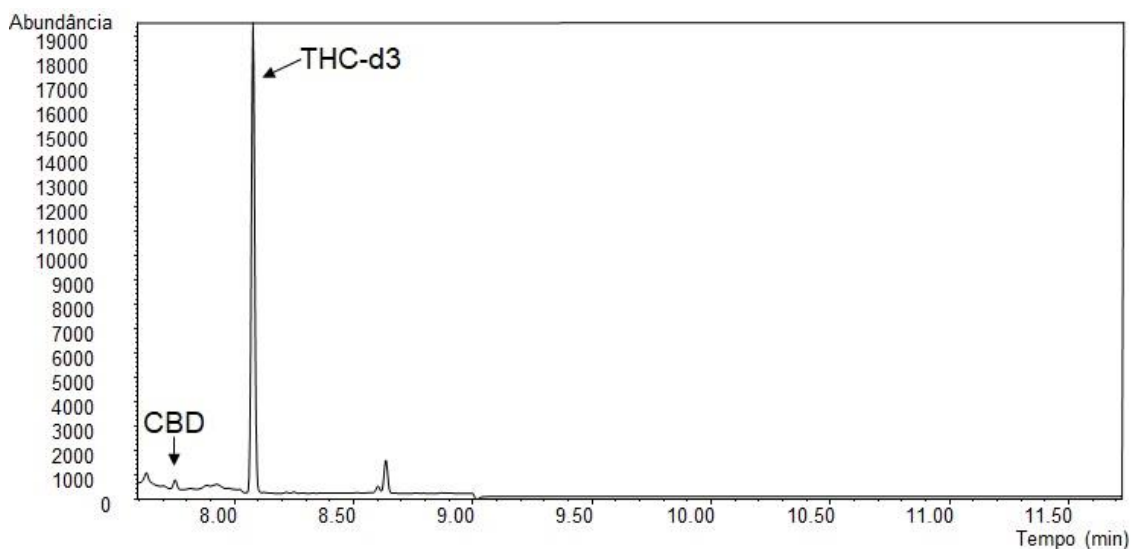
Os cromatogramas obtidos das amostras plasmáticas de CBD nas idades P0, P7 e P28 estão reproduzidos nas **Figuras 10, 11 e 12**, respectivamente.



**Figura 10.** Cromatograma obtido da amostra P0 CBD fortificada com 50 ng/250 mL de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.

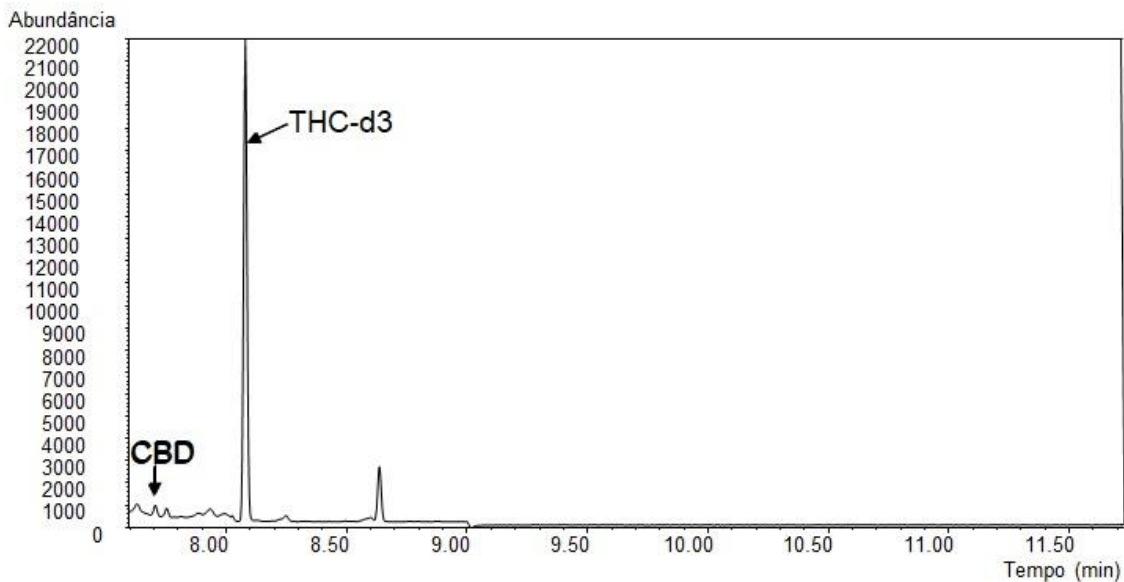


**Figura 11.** Cromatograma obtido da amostra P7 CBD fortificada com 50 ng/250 mL de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.



**Figura 12.** Cromatograma obtido da amostra P28 CBD fortificada com 50 ng/250 mL de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.

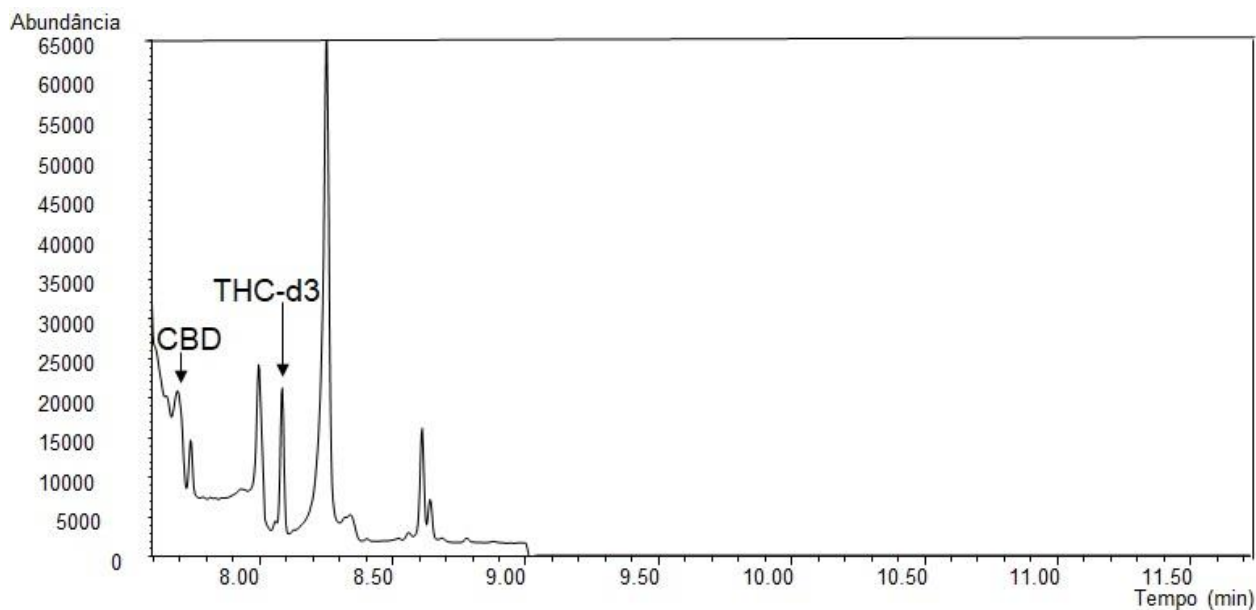
A **Figura 13** demonstra o cromatograma obtido da amostra plasmática de CBD do grupo Controle aos 14 dias pós-natal (P14).



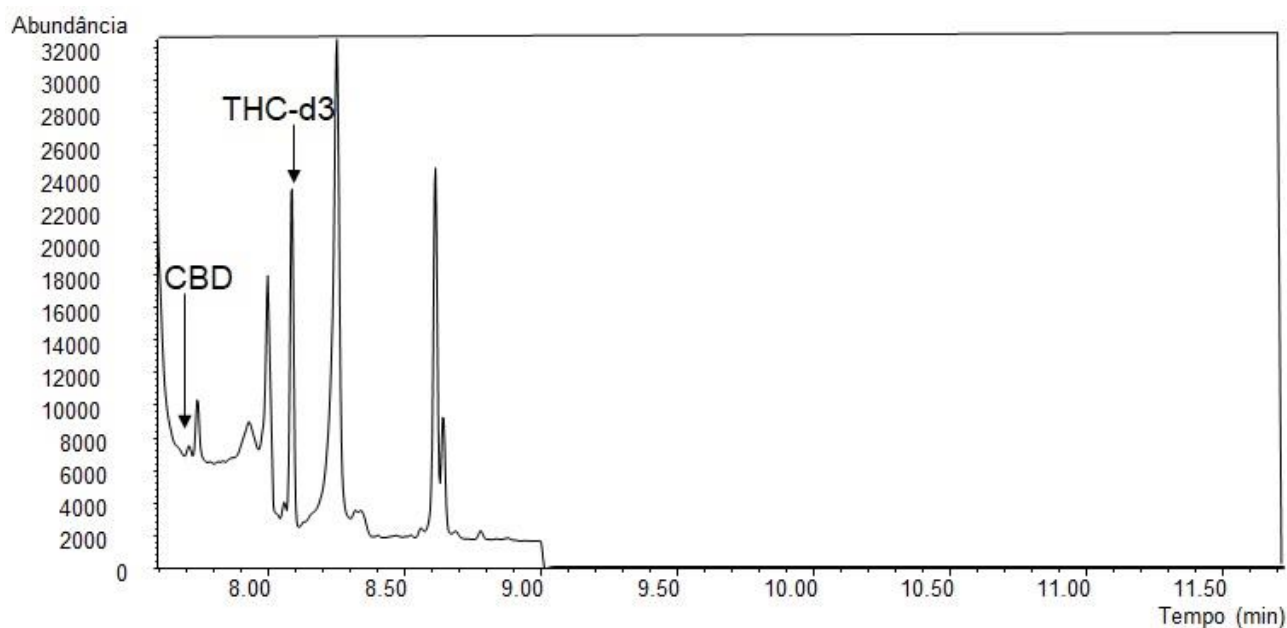
**Figura 13.** Cromatograma obtido da amostra P14 controle CBD fortificada com 50 ng/250 mL de plasma de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.

Na sequência das análises, as **Figuras 14, 15 e 16** demonstram os cromatogramas obtidos das amostras cerebrais de CBD nas idades P0, P7 e P28, respectivamente.

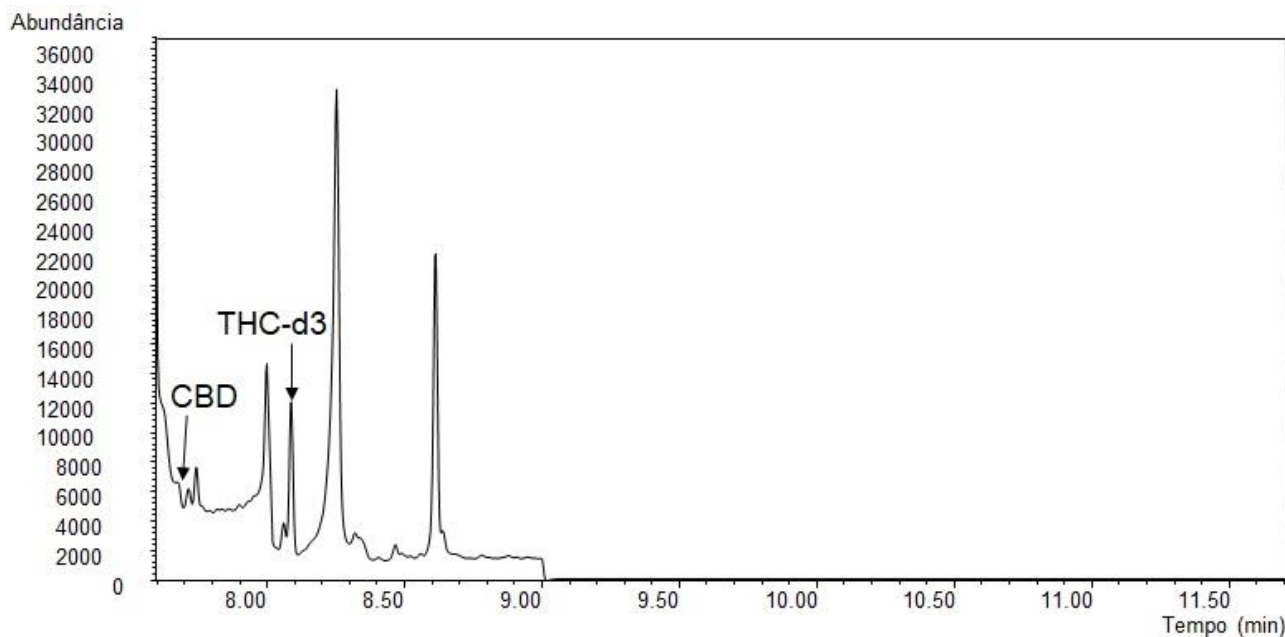




**Figura 14.** Cromatograma obtido da amostra P0 CBD cérebro fortificada com 50 ng/0,10 g de cérebro de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.



**Figura 15.** Cromatograma obtido da amostra P7 CBD cérebro fortificada com 50 ng/0,21 g de cérebro de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.

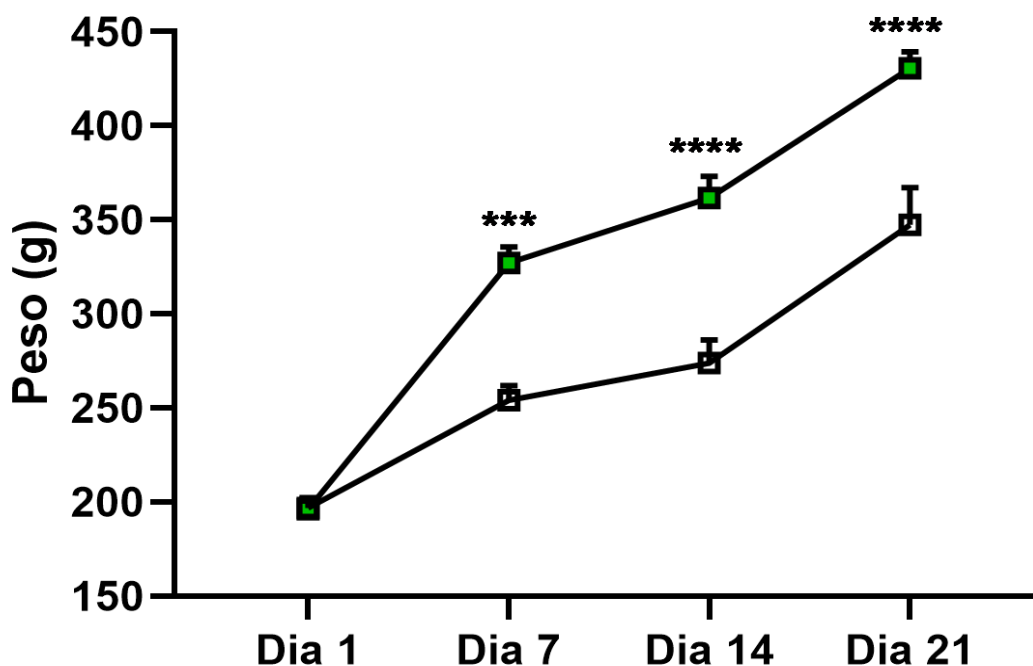


**Figura 16.** Cromatograma obtido da amostra P28 CBD cérebro fortificada com 50 ng/0,53 g de cérebro de THC-d3 e submetida a extração líquido-líquido.

## 4.2. Peso das Fêmeas Gestantes

As 10 fêmeas gestantes, após o acasalamento, foram divididas em dois grupos, de acordo com o tratamento administrado, sendo eles Veículo (n=5) e CBD (n=5). As ratas, no GD1, período correspondente ao início do tratamento, apresentaram um peso médio de 200g. Os animais foram pesados a cada 7 dias, conforme a **Figura 17** demonstra. No sétimo dia de gestação (GD7), as fêmeas CBD apresentaram diferença estatisticamente significativamente de peso quando comparadas às fêmeas Veículo. Diferença esta que se manteve aos 14 e 21 dias de gestação, sendo o último o período de nascimento dos filhotes. Em todos os resultados expressos nessa seção, a cor branca representa o grupo Veículo e a verde, o grupo CBD.

Foi verificada a diferença estatística entre os grupos no parâmetro “tempo” ( $p < 0,0001$ ) e “tratamento” ( $p = 0,0005$ ). A interação entre ambos apresentou  $p < 0,0001$ .



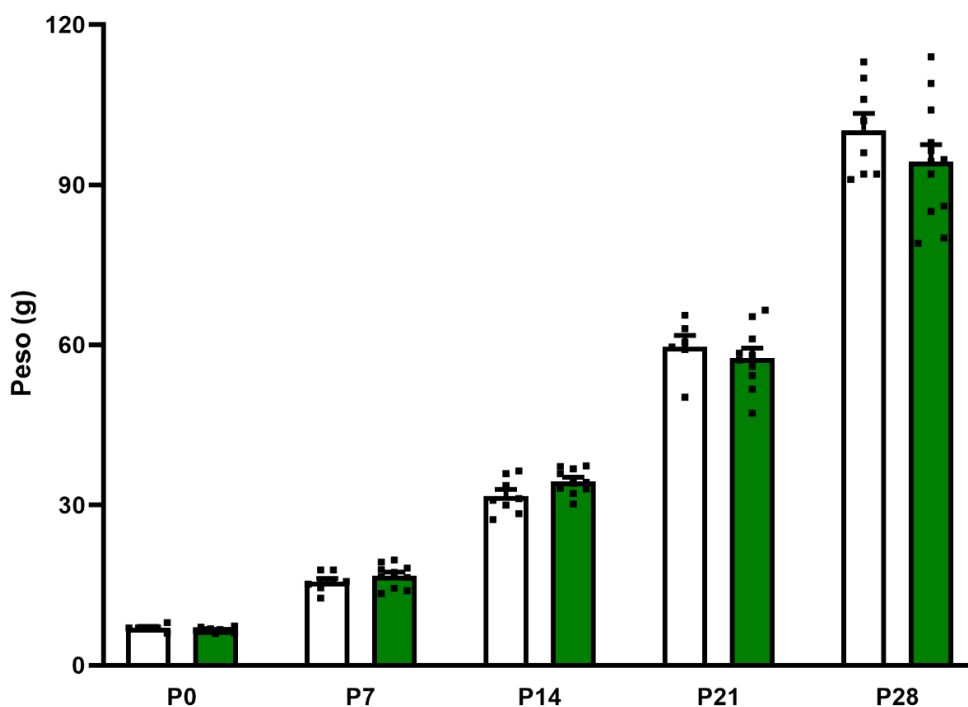
**Figura 17. Peso das mães gestantes que receberam como tratamento Veículo (branco) e CBD (verde).** Mensuração da massa, expressa em gramas, de animais fêmeas divididos segundo o tratamento, sendo eles Veículo (n=5) e CBD (n=5). Diferenças significativas para os parâmetros tempo ( $F_{(3, 24)} = 179,2$ ;  $p < 0.0001$ ) e tratamento ( $F_{(1, 8)} = 31,08$ ;  $p = 0.0005$ ). *Two-way ANOVA*, medidas não-repetidas, *post-hoc Sidak*. \*\*\* $p = 0,0001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 4.3. Peso dos Filhotes

Os 87 animais, proles provenientes da gestação das fêmeas tratadas com Veículo ou CBD, foram pesados de acordo com os grupos experimentais, feitos a partir de seus nascimentos: P0 Veículo (n=6) e CBD (n=10), P7 Veículo (n=8) e CBD (n=10), P14 Veículo (n=8) e CBD (n=10), P21 Veículo (n=6) e CBD (n=10) e P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12).

Verificou-se a progressão dos valores de peso de ambos os grupos, algo natural e esperado visto o desenvolvimento embrionário dos vários sistemas e do aumento do tamanho dos animais. Percebe-se a diferença significativa entre os grupos no parâmetro “idade” ( $p < 0.0001$ ), que não se estende para o parâmetro “tratamento” ( $p = 0.4987$ ).

Este dado demonstra que o tratamento das fêmeas, durante a gestação, com CBD parece não influenciar o peso da prole até os 28 dias pós-natais, ainda que a literatura demonstre achados neste sentido (vide discussão, abaixo). A interação entre os parâmetros idade e tratamento apresentou um valor de  $p$  de 0,1807 (**Figura 18**).



**Figura 18. Peso dos animais P0, P7, P14, P21 e P28 dos grupos Veículo (branco) e CBD (verde).** Mensuração da massa, expressa em gramas, de animais divididos em dias pós-natais para o grupo Veículo ( $n=6$ ;  $n=8$ ;  $n=8$ ;  $n=6$  e  $n=7$ , respectivamente) e para o grupo CBD ( $n=10$ ;  $n=10$ ;  $n=10$ ;  $n=10$  e  $n=12$ , respectivamente). Diferenças significativas para o parâmetro idade ( $F_{(4, 60)} = 813,5$ ,  $p < 0.0001$ ), mas não para o parâmetro tratamento ( $F_{(1, 18)} = 0,4767$ ;  $p = 0.4987$ ). *Two-way ANOVA*, medidas não-repetidas, *post-hoc Turkey*.

#### 4.4. Má-formação

Foi notado, ainda que em um único filhote P0 proveniente de uma fêmea tratada com CBD, a má formação no membro inferior esquerdo e na região presumida da cauda, conforme as setas vermelhas apontam (**Figura 19**)

Ainda, das cinco fêmeas tratadas com CBD, uma apresentou quadro abortivo, sendo percebido ao fim da gestação, no 19º dia (GD19) dos 21 dias assumidos, em média, para

esse processo. No grupo Veículo, do qual cinco fêmeas também foram submetidas ao tratamento, todas deram à luz a seus filhotes, que nasceram a termo.



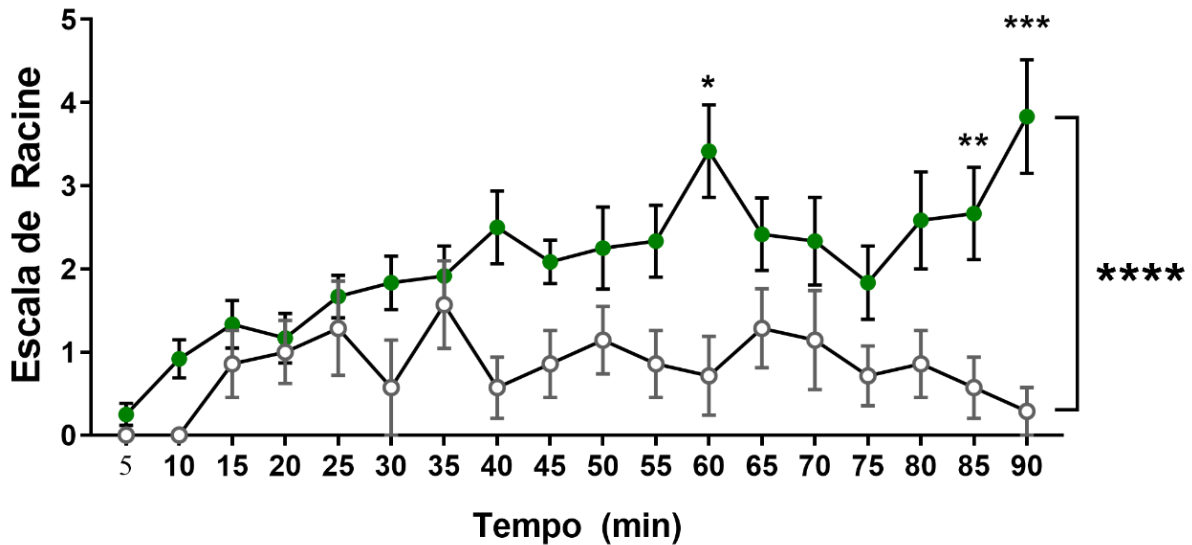
**Figura 19. Filhote em idade P0 com má-formação.** O membro inferior esquerdo e no lugar presumido da cauda foram detectadas alterações (setas vermelhas).

#### 4.5. Classificação das Crises

Após a mensuração do peso foi realizado, aos 28 dias pós-natais, utilizando-se 19 animais, o teste comportamental para avaliar o grau máximo de crise dos animais nos grupos Veículo (n=7) e CBD (n=12), segundo a Escala de Racine (1972), adaptada por Pinel e Rovner (1978), bem como da verificação da facilitação ao *SE*, hipótese deste presente trabalho.

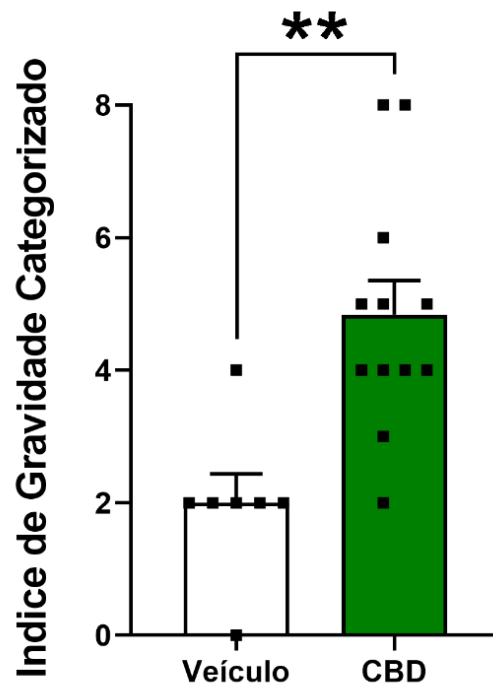
Após a avaliação dos 90 minutos de observação comportamental, percebe-se a diferença estatisticamente significativa entre os grupos no parâmetro “tratamento” ( $p < 0,0077$ ), “tempo” ( $p < 0,0001$ ) e na interação entre ambos ( $****p < 0,0001$ ). A prole exposta ao CBD apresenta crises com maior gravidade, sobretudo no intervalo de 60

minutos ( $p=0,0007$ ), 85 minutos ( $p=0,0246$ ) e 90 minutos ( $p<0,0001$ ), conforme mostra a **Figura 20**.



**Figura 20. Classificação das crises, em animais P28, segundo a Escala de Racine durante os 90 minutos de análise.** Administração de PILO provoca crises com classes maiores em animais pré-expostos a CBD ( $n=12$ ) (verde) quando comparados aos tratados com Veículo ( $n=7$ ) (branco). Diferenças estatísticas para o parâmetro tempo ( $F_{(17,289)} = 4,006$ ,  $p<0,0001$ ) e tratamento ( $F_{(1,17)} = 9,127$ ,  $p<0,0077$ ). *Two-way ANOVA*, medidas não-repetidas, *post-hoc Sidak*. \* $p=0,0007$  vs controle; \*\* $p=0,0246$ ; \*\*\* $p<0,0001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$

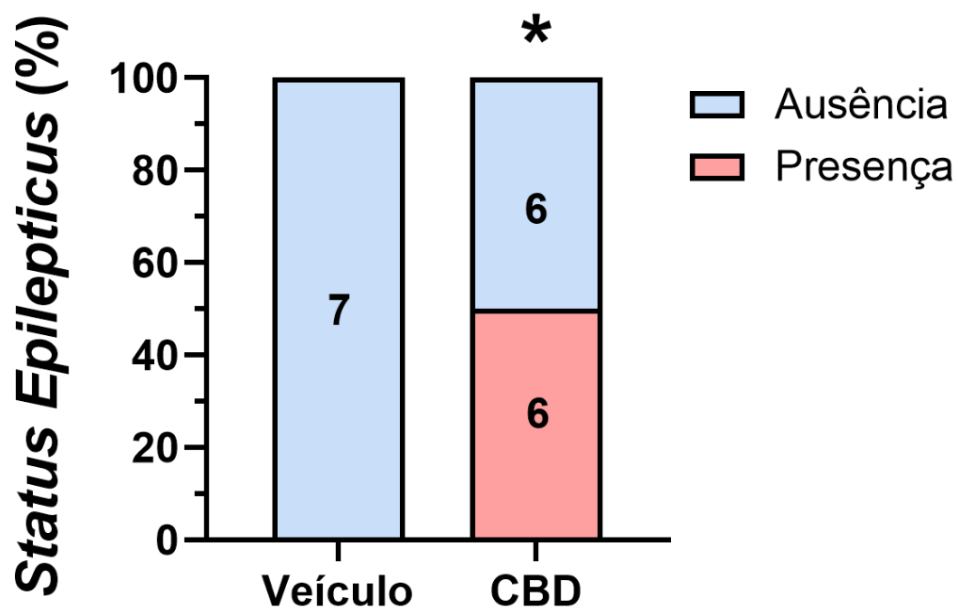
De posse destes resultados, foi plotado o gráfico com o Índice de Gravidade Categorizado para os mesmos animais, com os mesmos tratamentos (**Figura 21**). Verificou-se que os animais do grupo CBD apresentaram crises com Índice médio no valor de 5 enquanto os do grupo Veículo o fizeram no valor médio de 2.



**Figura 21.** Índice de gravidade categorizado dos animais P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12), apresentando durante os 90 minutos de análise. Administração de PILO provoca crises com classes maiores em animais pré-expostos a CBD (verde) quando comparados aos pré-expostos a Veículo (branco). Diferenças estatísticas para o parâmetro tratamento. Teste-t não pareado. ( $F_{(6,11)} = 2.432$ ;  $**p=0.0017$ ).

#### 4.6. *Status Epilepticus* e Latência

Também nos animais P28, quando avaliado o efeito do tratamento pré-natal a CBD, verificou-se que 6 dentre 12 animais (50%) tratados com o fitocanabinoide desenvolveram *SE*, com latência de 62 minutos, enquanto os animais do grupo Veículo não desenvolveram esse fenômeno e, conseqüentemente, a latência se fez ausente (**Figura 22 e Tabela 4**).



**Figura 22. Porcentagem de desenvolvimento de SE nos animais P28 controle (n=7) e CBD (n=12), durante os 90 minutos de análise.** Administração de PILO leva à gênese deste fenômeno em 50% dos pré-expostos a CBD enquanto não provoca em nenhum dos pré-expostos ao veículo. A cor azul marca a ausência para o fenômeno enquanto o rosa, a presença deste. Diferenças estatísticas para o parâmetro tratamento. Teste exato de Fisher. ( $\chi^2 = 66.67$ , \* $p < 0.0001$ ).



**Tabela 4. Manifestação de SE e latência nos grupos P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12), durante os 90 minutos de análise.** Administração de PILO leva à gênese deste fenômeno em 50% dos animais cujas mães receberam CBD com a latência média de 62 minutos enquanto não provoca em nenhum da prole de mães que receberam Veículo e, conseqüentemente, não desenvolvem latência.

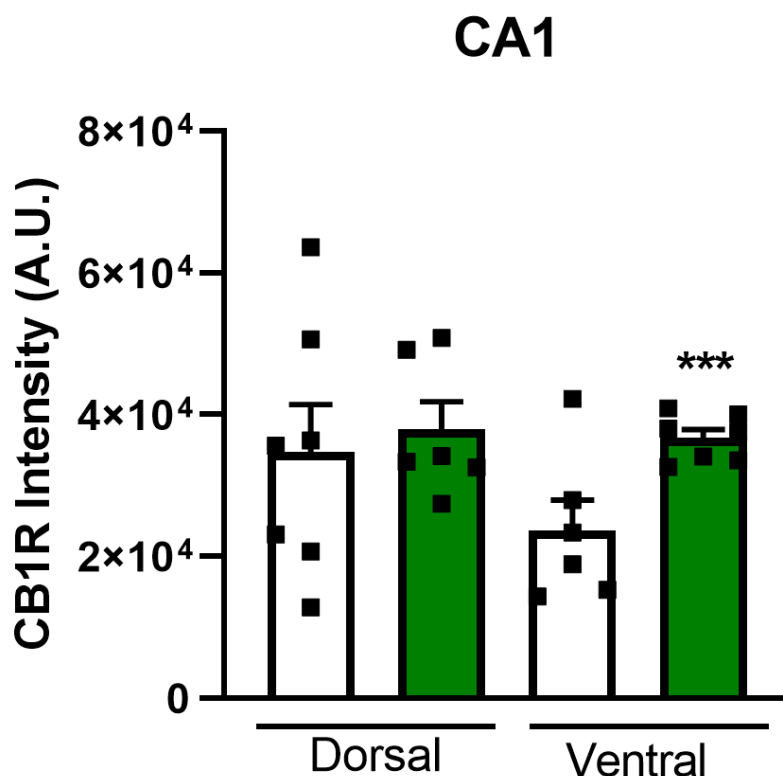
Grupo	SE	
	Presença	Latência (min)
Veículo	Não	-
	Não	-
	Não	-
	Não	-
	Não	-
	Não	-
	Não	-
Total (%)	0/7 0%	
Média		-
CBD (25mg/kg)	Sim	90
	Não	-
	Sim	50
	Não	-
	Não	-
	Não	-
	Sim	65
	Não	-
	Sim	64
	Não	-
	Sim	35
	Sim	69
Total (%)	6/12 50%	
Média		62,16

#### 4.7. Imunoistoquímica para CB1

Foi realizada a imunoistoquímica no hipocampo dos animais P28, os mesmos submetidos ao teste comportamental para o desenvolvimento de SE e medida a

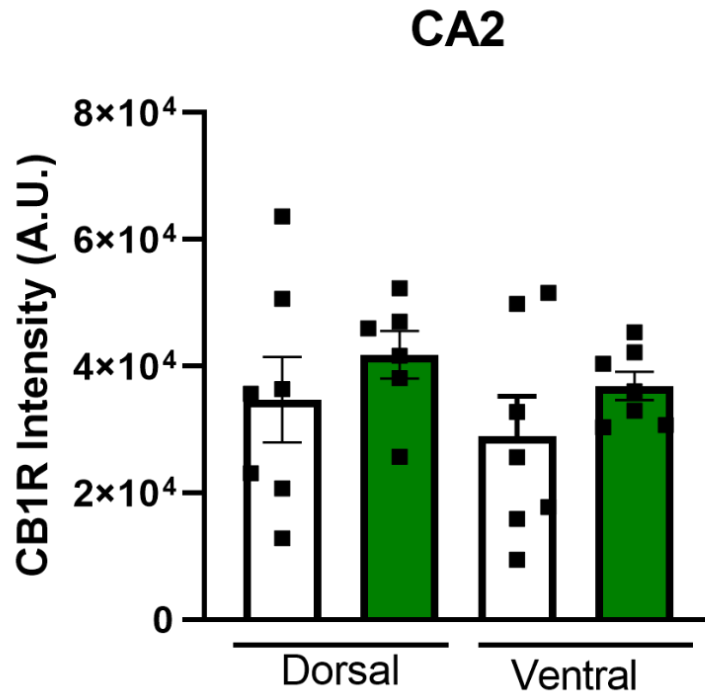
intensidade de marcação para CB1R. Foram analisadas as regiões dorsal e ventral do hipocampo (total), bem como nas sub-regiões, CA1, CA2, CA3 e DG.

Na sub-região CA1, o tratamento com CBD promove aumento na intensidade de CB1R na região ventral, em comparação ao Veículo, dado não reproduzido na região dorsal ( $F_{(3,22)} = 1.913$ ,  $p=0.9272$ ) (**Figura 23**). A interação para o parâmetro “tratamento” é de  $p=0.1569$ .



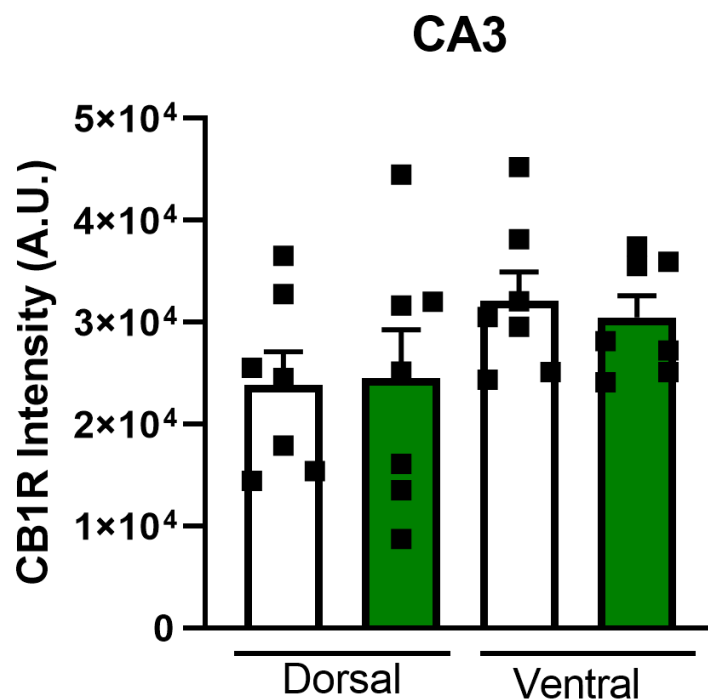
**Figura 23. Intensidade do CB1R na sub-região CA1 das regiões ventral e dorsal do hipocampo de animais P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12).** Na região ventral, o tratamento com CBD (verde) aumenta a intensidade de CB1R quando comparado ao controle (branco). O mesmo não é reproduzido na região dorsal. Diferença estatística para o parâmetro tratamento. *One-way ANOVA*. Medidas não repetidas ( $F_{(3,22)} = 1.913$ ,  $**p=0.003$  vs controle).

Em CA2, o tratamento com CBD não apresentou significância estatística sobre a intensidade de CB1R nas regiões dorsal ( $F_{(3,23)} = 1.007$ ,  $p=0.7823$ ) e ventral ( $F_{(3,23)} = 1.007$ ,  $p=0.6991$ ) do hipocampo de ratos P28, quando comparados aos seus respectivos Controles (**Figura 24**). A interação para o parâmetro “tratamento” é  $p=0.4074$ .



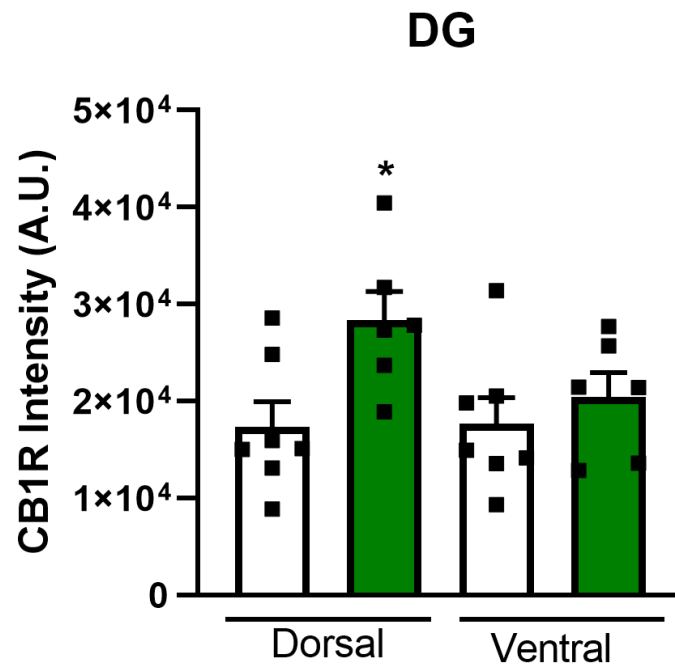
**Figura 24.** Intensidade do CB1R na sub-região CA2 das regiões ventral e dorsal do hipocampo de animais P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12). Em ambas regiões, o tratamento com CBD (verde) não exerce efeitos estatisticamente significativos sob a intensidade de CB1R, quando comparado aos respectivos controle (branco).

O mesmo se estende a CA3, em ambas as regiões dorsal ( $F_{(3,24)} = 1.543$ ,  $p=0.3262$ ) e ventral ( $F_{(3,23)} = 1.543$ ,  $p=0.5979$ ) do hipocampo de ratos P28, quando comparados aos seus respectivos Controles (**Figura 25**). A interação para o parâmetro “tratamento” é  $p=0.2292$ .



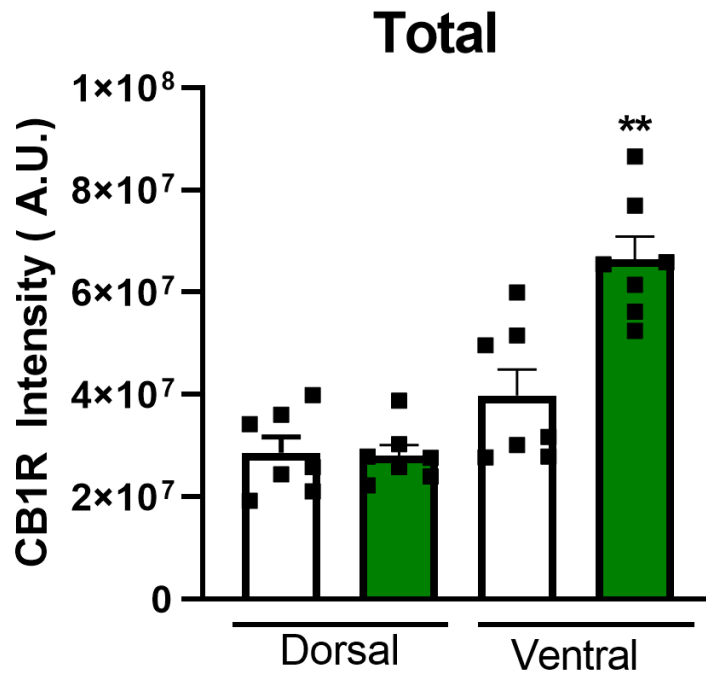
**Figura 25.** Intensidade de CB1R na sub-região CA3 das regiões ventral e dorsal do hipocampo de animais P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12). Em ambas regiões, o tratamento com CBD (verde) não exerce efeitos estatisticamente significativos sob a intensidade de CB1R, quando comparado aos respectivos controle (branco).

No GD, o tratamento com CBD promove aumento na intensidade de CB1R na região dorsal do hipocampo (**Figura 26**) mas não na região ventral ( $F_{(3,22)} = 3.432$ ,  $p=0.8872$ ). A interação para o parâmetro “tratamento” é  $p=0.0347$ .



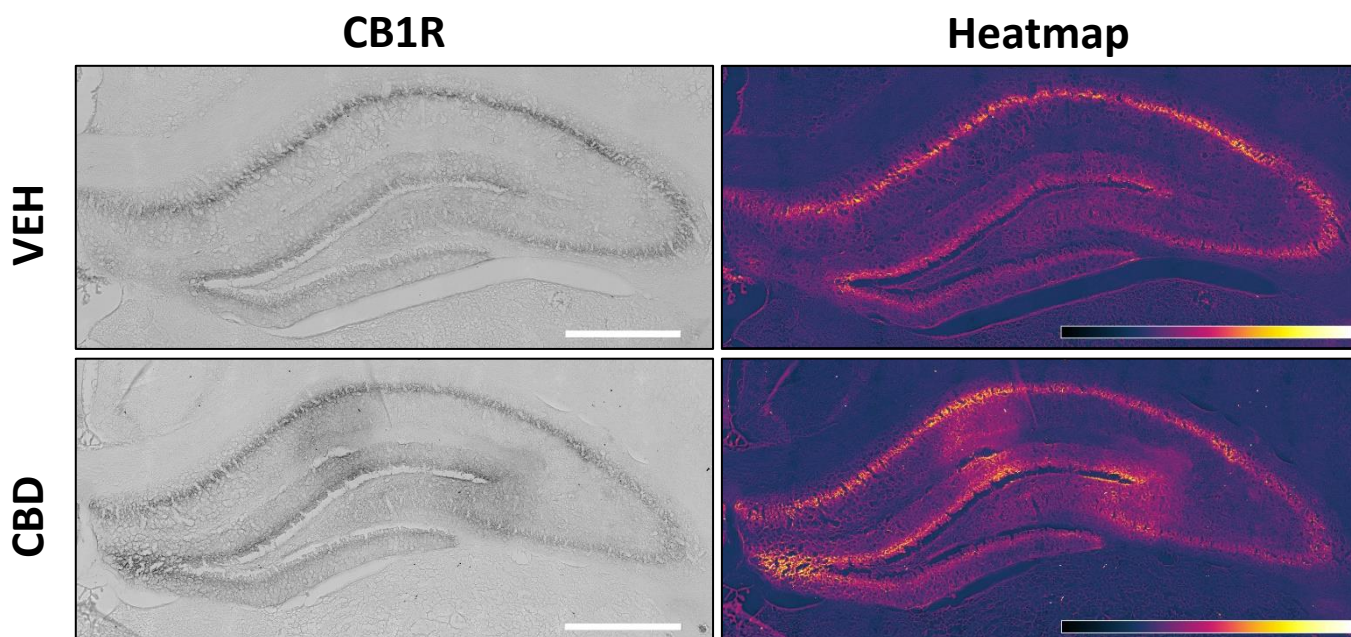
**Figura 26.** Intensidade do CB1R no giro denteado das regiões dorsal e ventral do hipocampo de animais P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12). Na região dorsal, o tratamento com CBD (verde) aumenta a intensidade de CB1R quando comparado ao controle (branco). O mesmo não é reproduzido na região ventral. Diferença estatística para o parâmetro tratamento. *One-way* ANOVA. Medidas não repetidas ( $F_{(3,22)} = 3.432$ ,  $*p=0.0425$  vs controle).

Finalmente, foi avaliada a distribuição de CB1R na totalidade das regiões dorsais e ventrais do hipocampo. O tratamento com CBD promove aumento estatisticamente significativo na intensidade de CB1R no hipocampo ventral, não estendido à região dorsal ( $F_{(3,24)} = 21.75$ ,  $p=0.9996$ ) (**Figura 27**). A interação para o parâmetro “tratamento” é  $p<0.0001$ .

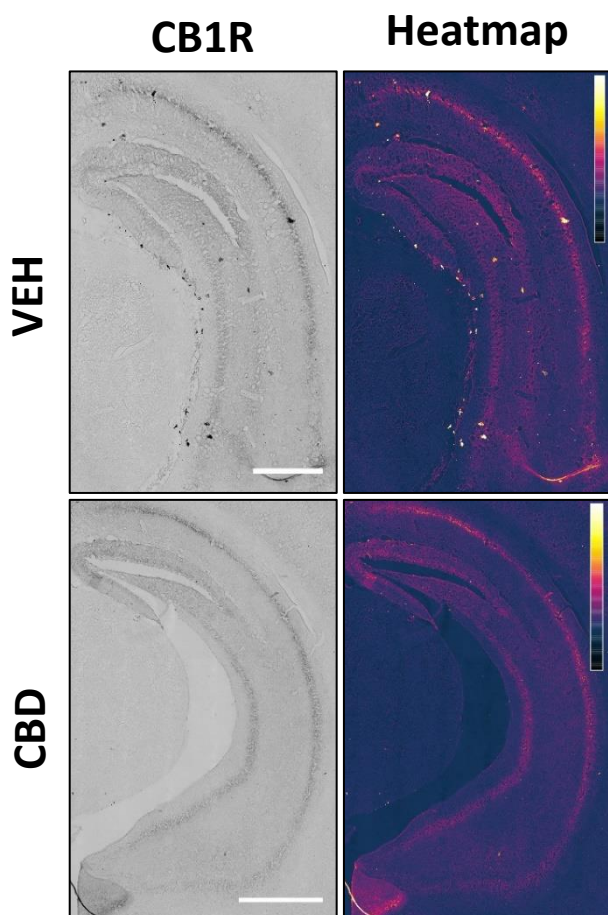


**Figura 27. Intensidade do CB1R no hipocampo, dividido em suas regiões dorsal e ventral, de animais P28 Veículo (n=7) e CBD (n=12).** Na região dorsal, o tratamento com CBD (verde) não apresentou significativas diferenças na intensidade de CB1R. O mesmo não foi reproduzido na região ventral. O tratamento com CBD (verde) levou ao aumento da intensidade deste receptor quando comparado ao Veículo (branco). Diferença estatística para o parâmetro tratamento. *One-way ANOVA*. Medidas não repetidas ( $F_{(3,24)} = 21.75$ ,  $**p < 0.0003$  vs controle).

Para a melhor verificação da intensidade da expressão de CB1R, foi realizado o *heatmap* das imagens representativas nas regiões dorsal (**Figura 28**) e ventral (**Figura 29**) dos hipocampus dos animais Veículo e tratados com CBD.



**Figura 28.** Imunoistoquímica para o CB1R no hipocampo dorsal de animais pré-expostos a Veículo e a CBD. Imagens representativas da imunoistoquímica (esquerda) e o *heatmap* a partir delas (direita) nos animais pré-expostos a Veículo e a CBD.



**Figura 29. Imunoistoquímica para o CB1R no hipocampo ventral de animais pré-expostos a Veículo e a CBD.** Imagens representativas da imunoistoquímica (esquerda) e o *heatmap* a partir delas (direita) nos animais pré-expostos a Veículo e a CBD.

#### 4.8. Análise Neuroetológica

Na **Figura 30** estão expressas as respostas comportamentais de 3 crises induzidas pela administração de PILO no grupo CBD. Os círculos e quadrados **azuis** demonstram os comportamentos não-epilépticos e destacam-se “cheirar-exploratório” (CHP), “caminhar” (CM), “parar” (PR), “mastigar” (MT), “pivotear a cabeça” (PIV1), “pisar os olhos” (POLH), “girar sobre o eixo longitudinal esquerdo” (BRL) e “endireitar” (END).

Percebe-se que todos os comportamentos neste *cluster* apresentam a mesma duração e a frequência dos comportamentos “mastigação”, “cheirar-exploratório” e “caminhar” é o dobro dos demais presentes nesse conjunto. Além disso, nota-se a forte interação entre os comportamentos de “cheirar-exploratório” e “caminhar”, demonstrando a associação entre eles.

Os círculos e quadrados **verdes** apontam os comportamentos límbicos, dentre os quais destacam-se as “mioclonias dos membros anteriores” (MIO1), “de orelha” (MIOo), “de cabeça” (MIOc) e “generalizada” (MIOg), além dos comportamentos de “queda” (QUED) e “elevação” (ELE). Os comportamentos de “mioclonia de cabeça”, “mioclonia dos membros anteriores” e “elevação” apresentam o triplo da frequência dos demais comportamentos do *cluster* e apresentam interação entre si, com a maior entre “elevação” e “mioclonia dos membros anteriores” e entre “mioclonia de cabeça” e “mioclonia dos membros anteriores”, com a primeira apresentando o dobro de interação em relação à segunda.

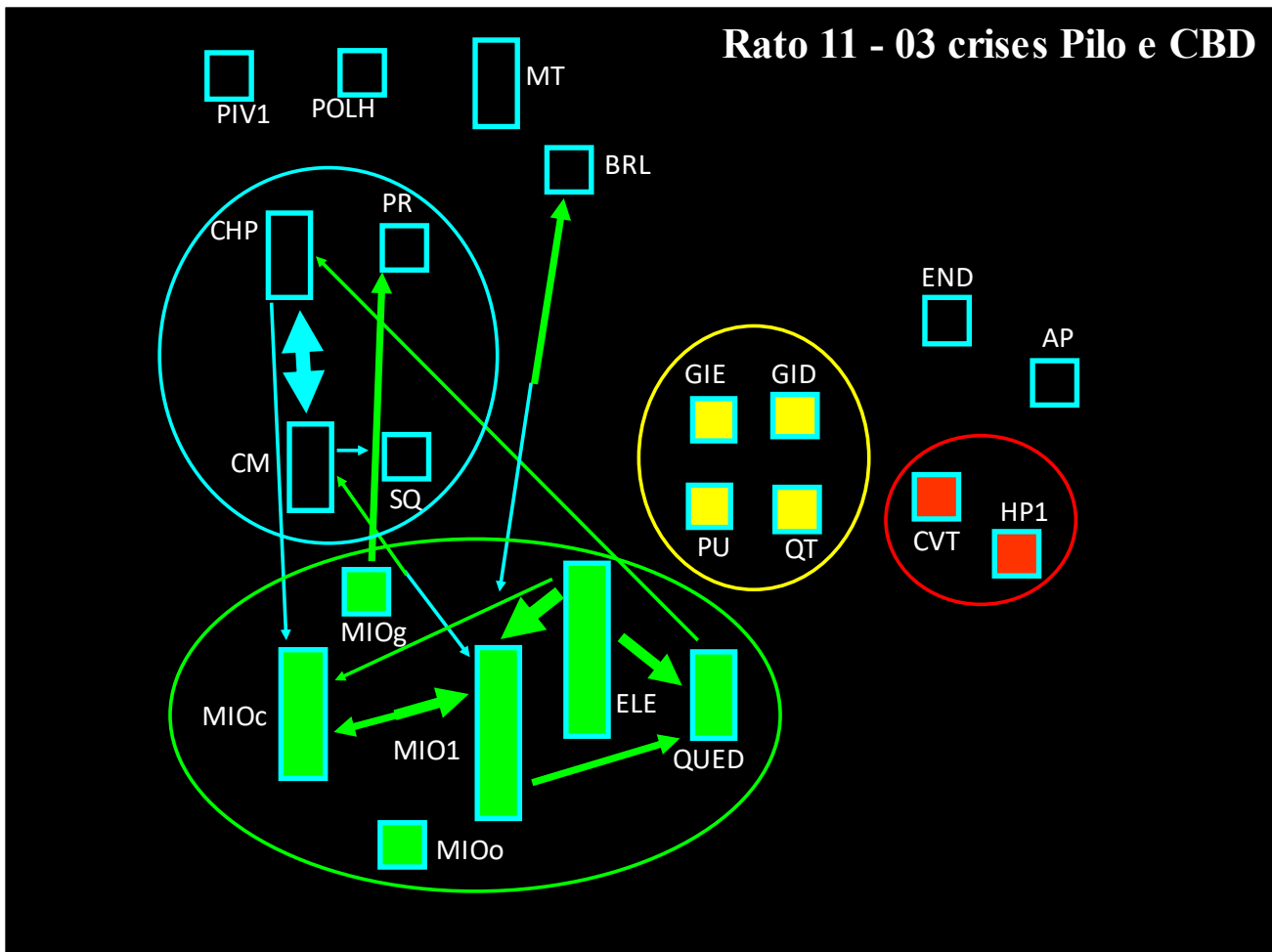
O comportamento de “queda” apresenta o dobro de frequência com relação aos “mioclonias generalizadas” e “mioclonia de orelha” e está associado com os comportamentos de “elevação” e “mioclonia dos membros anteriores”. Ainda, há interação entre os comportamentos “cheirar-exploratório” e “mioclonia de cabeça” e entre “girar sobre o eixo longitudinal esquerdo” e “mioclonia dos membros anteriores”, com este apresentando o dobro de interação quando comparado àquele.



O *cluster* de comportamentos **amarelo** indica o recrutamento inicial de estruturas mesencefálicas. Destacam-se os comportamentos “girar para a esquerda” (GIE), “girar para a direita” (GID), “pular” (PU) e “queda atônica” (QT). São comportamentos semelhantes à denominada “fase procursiva” nas epilepsias audiogênicas (Garcia-Cairasco et al., 1996). Esses comportamentos apresentam a mesma frequência e duração e não apresentam interação com os demais comportamentos, dentro do próprio *cluster* ou de outros.

Os comportamentos apresentados em **vermelho** descrevem as crises tônico-clônicas. São mostrados no fluxograma da **Figura 30** os comportamentos “convulsão tônico-clônica” (CVT) e “hiperextensão dos membros anteriores” (HP1). Ambos apresentam a mesma duração e frequência e, como os do *cluster* mesencefálico, não apresentam interação entre si e também com os demais.

Nota-se a presença do comportamento “apnéia” (AP), pertencente aos comportamentos não-epilépticos, que demonstra a causa da morte do animal em questão.



**Figura 30. Fluxograma da resposta comportamental de 3 crises do grupo CBD analisadas após a administração de PILO subconvulsivante.** Nota-se a presença de comportamentos como CHP, CM, MT, PR (azul); MIOc, MIOg, MIO1, MIOo, ELE, QUED (verde); GIE, GID, PU, QT (amarelo) e CVT e HP1 (vermelho). Também são expressas as interações estatísticas (setas) presente entre dois comportamentos. Retas, setas e cores estão explicadas na **Figura 2** e as siglas, na **Tabela Complementar 1**.

Foi expresso também o fluxograma para a análise comportamental dos grupos Veículo e CBD frente à administração de PILO, conforme da **Figura 31** demonstra. Percebe-se a presença de dois *clusters* no grupo Veículo, o de comportamentos não-epilépticos e o de comportamentos que recrutam estruturas límbicas.

O primeiro *cluster* apresenta comportamentos como “mastigar” (MT), “caminhar” (CM), ambos com mesma frequência e duração, “cheirar-exploratório” (CHP) e “esquadrinhar” (SQ), que apresentam o dobro da frequência que os demais comportamentos, e “parar” (PR), que apresenta o triplo da frequência e da duração dos demais comportamentos dos *cluster*. Nota-se a forte interação entre os comportamentos

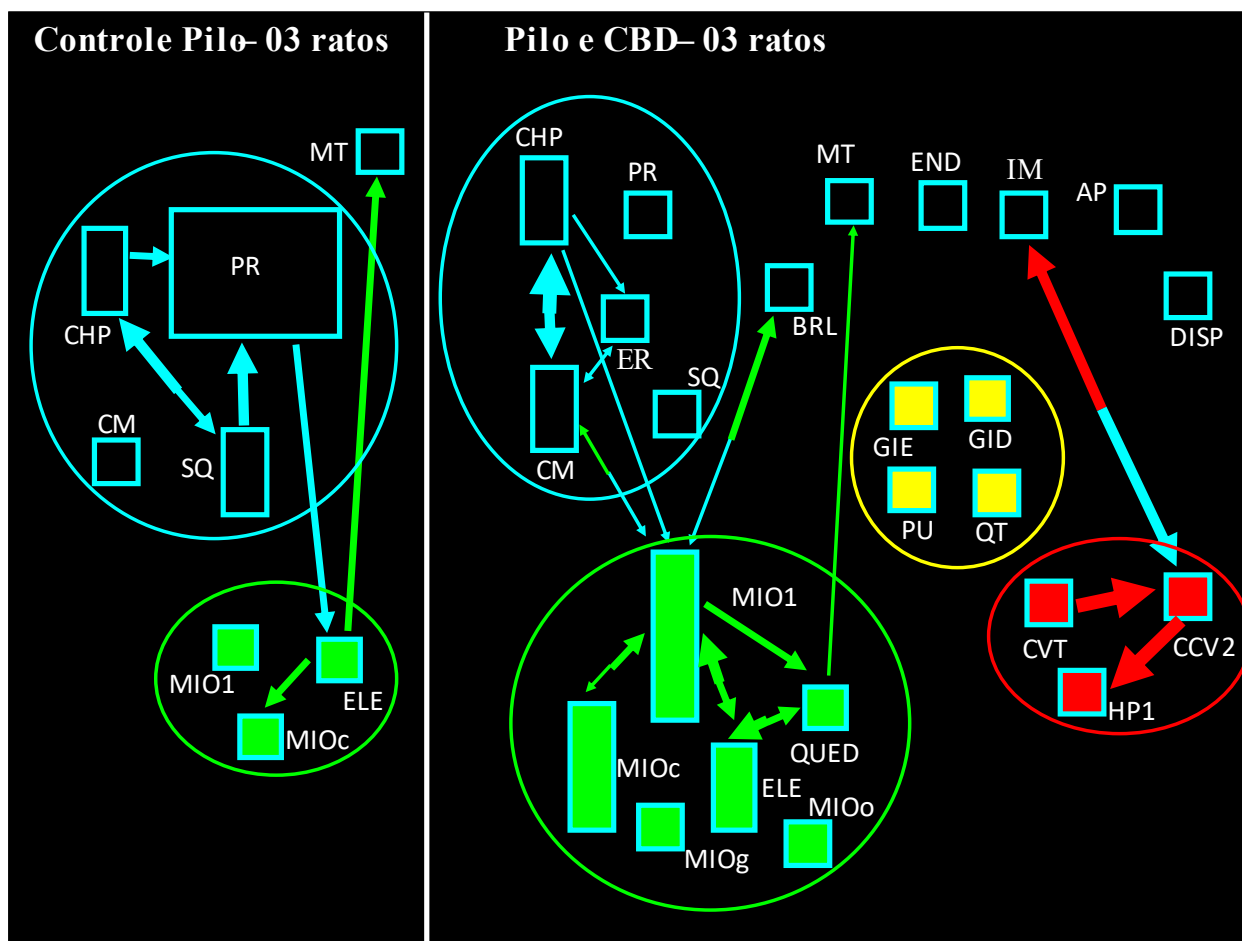
SQ e PR, SQ e CHP, com este apresentando a interação mais forte quando comparado àquele, e entre CHP e PR.

Há também a presença do *cluster* de comportamentos límbicos, no qual estão presentes as “mioclonias de membros anteriores” (MIO1) e “mioclonias de cabeça” (MIOc) e a “elevação” (ELE). Os 3 comportamentos apresentam igual intensidade e duração. Percebe-se a interação entre os comportamentos ELE e MIOc e, também, com o comportamento MT.

Nos 3 animais cujas mães receberam CBD, o fluxograma construído demonstra a presença dos 4 *clusters*, previamente descritos. Há a presença dos comportamentos CHP e MT em igual duração e frequência quando comparados ao grupo Controle. Os comportamentos PR e SQ se fizeram em menor frequência e, para o primeiro, em menor duração em comparação ao Controle, porém o comportamento CM no grupo pré-exposto a CBD se mostrou com o dobro de duração. Ainda, no *cluster* de comportamentos não-epilépticos, há a presença dos comportamentos “ereto” (ER) e “girar sobre o eixo longitudinal esquerdo” (BRL).

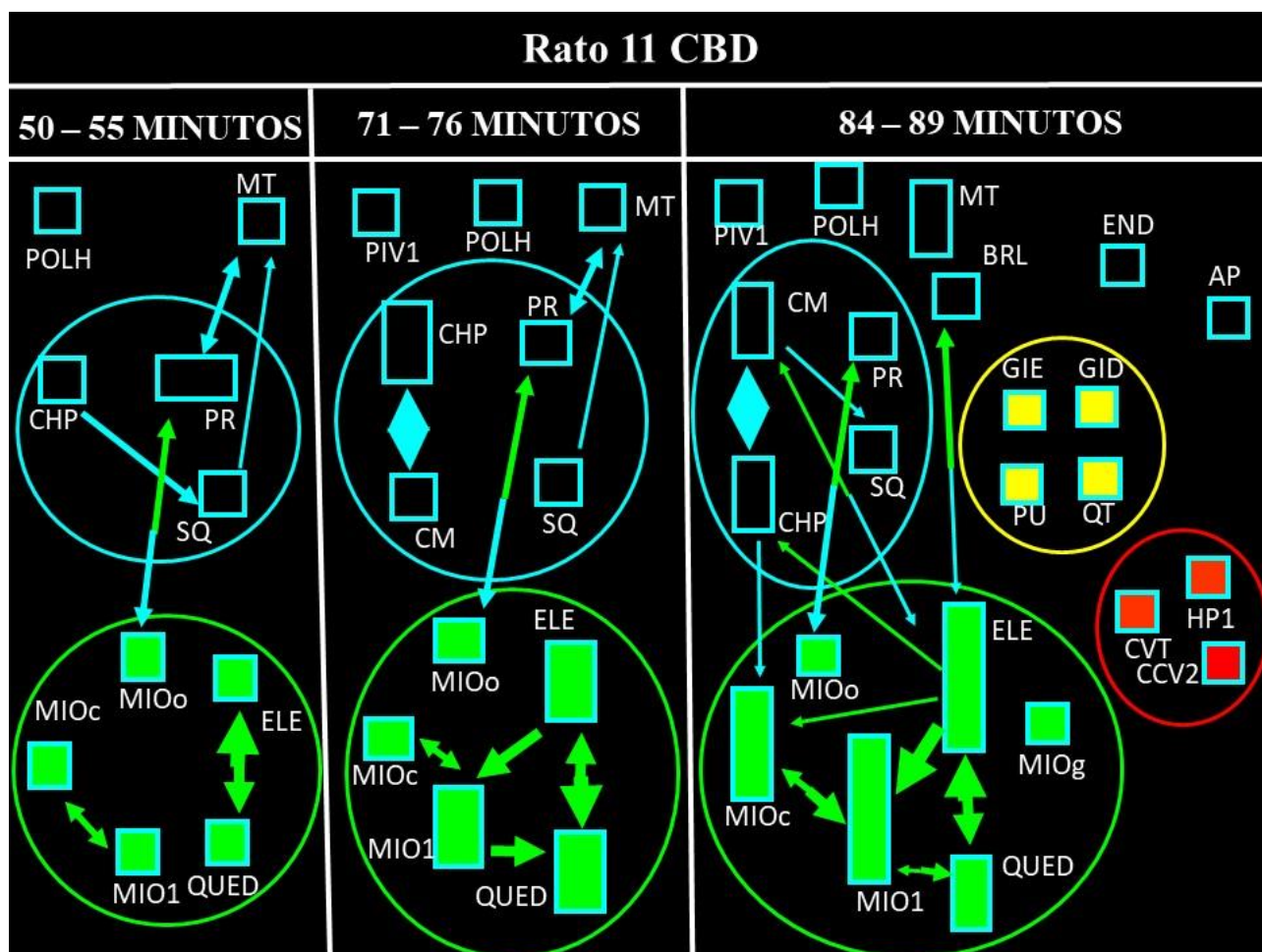
No *cluster* dos comportamentos límbicos, há o aumento da frequência dos comportamentos MIO1, MIOc e ELE, ainda que a duração dos mesmos seja a mesma em relação ao grupo Controle. Há a presença dos comportamentos “mioclonia de cabeça” (MIOc), “generalizada” (MIOg), “de orelha” (MIOo) e “queda” (QUED). Há uma forte associação entre estes comportamentos, sobretudo na interação entre QUED e ELE, entre ELE e MIO1 e entre MIOc e MIO1.

Em semelhança ao expresso na **Figura 30**, há a presença dos mesmos comportamentos mesencefálicos – GIE, GID, PU e QT – que não apresentam interação com nenhum outro comportamento do próprio ou de outros *clusters*. Nos comportamentos tônico-clônicos, há a presença da CVT e HP1, previamente descritos na figura anterior e o comportamento de “convulsão clônica sincrônica pata posterior” (CCV2). Nesse *cluster* há uma forte interação entre os comportamentos, indicando a presença do *SE*, bem como de comportamentos, como “imobilidade” (IM), “dispneia” (DISP) que, juntando-se aos comportamentos de AP, provocaram a morte de 2 dos 3 animais analisados.



**Figura 31. Fluxograma da resposta comportamental dos grupos Controle e CBD após a administração de PILO subconvulsivante.** Nota-se a presença de comportamentos como CHP, CM, MT, PR (azul); MIOc, MIOg, MIO1, MIOo, ELE, QUED (verde); GIE, GID, PU, QT (amarelo) e CVT e HP1 (vermelho). Também são expressas as interações estatísticas (setas) presente entre dois comportamentos. Retas, setas e cores estão explicadas na **Figura 2** e as siglas, na **Tabela Complementar 1**.

A **Figura 32** demonstra três janelas de tempo, de 5 minutos cada, de um animal do grupo CBD. Nessa análise, é possível analisar a evolução dos comportamentos, bem como o aparecimento de *clusters* mediante o recrutamento de estruturas límbicas, mesencefálicas e do tronco cerebral. Esse resultado reforça o encontrado nas **Figuras 21 e 22**.



**Figura 32. Fluxograma da resposta comportamental em três janelas temporais de um animal do grupo CBD após a administração de PILO subconvulsivante.** É possível perceber, nas três janelas de cinco minutos cada, a evolução dos comportamentos, bem como as suas interações, ao recrutar estruturas límbicas, mesencefálicas e o tronco cerebral (expressos nos *clusters* de cor verde, amarelo e vermelho, respectivamente).

## 5. Discussão

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que o tratamento pré-natal com CBD, na dose de 25 mg/kg/dia, é capaz de facilitar o desenvolvimento de *SE* por PILO aos 28 dias pós-natais. Mediante os resultados apresentados, evidenciou-se que 50% dos

animais P28, prole das mães tratadas com o fitocanabinoide CBD, apresentaram *SE* no teste comportamental, o que confirma a hipótese deste trabalho. Além disso, os animais pré-expostos ao CBD apresentaram crises com índices de severidades maiores, demonstrado em detalhes pelos fluxogramas resultantes das análises neuroetológicas.

Conforme apresentado, o eCBS está presente desde a fertilização (Friedrich et al., 2016), se estendendo aos períodos fetal, perinatal, infância, adolescência e a vida adulta (Sarrafpour et al., 2020). No contexto do neurodesenvolvimento, fenômeno altamente plástico no encéfalo, o eCBS apresenta contribuições para a gliogênese, mielinização e refinamento da circuitaria sináptica (Sagredo et al., 2018), além da manutenção do *pool* de *NSCs*, altamente relevante para a proliferação, diferenciação, maturação e integração sináptica dos neurônios emergentes da neurogênese embrionária e adulta (Maccarrone et al., 2014). Portanto, interferências nesse sistema, como a pré-exposição fetal a CBD, acarreta consequências pós-natais, como os resultados deste estudo demonstram.

O CBD é o segundo componente mais abundante na *Cannabis sativa*, correspondendo a um percentual de 40% (Grlic, 1976). A ampla diversidade de alvos moleculares nos quais o CBD interage, ainda que não estejam completamente elucidados, é demonstrada por vários estudos. CBD é agonista inverso de CB1R e CB2R (Pertwee, 2008), ainda que a sua ação nestes seja discutida como modulação alostérica negativa não-competitiva (Laprairie et al., 2015; Martínez-Pinilla et al., 2017); é agonista do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1) (Ross, 2003) além de exercer interação em receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos e purinérgicos (Almeida e Devi, 2020). No contexto do eCBS, CBD inibe a ação da *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) (De Petrocellis et al., 2011), aumentando, indiretamente, os níveis de anandamida (AEA), que atua como agonista CB1R, CB2 e TRPV1 (Pertwee e Ross, 2002). Ainda que o mecanismo não esteja completamente elucidado, CBD modula a atividade da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), aumentando a concentração de 2-AG no neurônio pré-sináptico (De Petrocellis et al., 2011; Elmes et al., 2015).

Devido à sua lipofilicidade, o CBD se acumula no tecido adiposo e é liberado em pequenas doses (Gunasekaran et al., 2009). Mechoulam e colaboradores (2002), em revisão sistemática de 24 estudos, demonstraram a farmacocinética de CBD em variedades de indivíduos e rotas de administração. A biodisponibilidade oral foi de 13-19% enquanto a inalatória, 11-45% (Mechoulam et al., 2002). A diferença se justifica

pelo metabolismo de primeira passagem que a droga sofre por via oral, no fígado. A meia-vida mais curta foi via oral, de 5 h, enquanto a inalatória foi a mais longa, 31 h. A via intravenosa apresentou a meia-vida de 24 h. Deiana e colaboradores (2012), em estudos pré-clínicos, demonstram a alta concentração plasmática e encefálica de CBD (120 mg/kg) pela administração intraperitoneal, em comparação à oral, algo esperado uma vez a ausência, como supracitado, do metabolismo de primeira passagem.

Para avaliar a concentração do fitocanabinoide frente às duas rotas de administração, o estudo utilizou-se da taxa de concentração cérebro/plasma (Deiana et al., 2012), mensurando a área abaixo da curva (do inglês, *Area under the curve – AUC*), integral definitiva que descreve, para a farmacocinética, a variação de concentração de determinada droga em função do tempo (Endrenyi e Yan, 1991), determinando, portanto, o tempo de exposição da mesma no plasma e/ou nos tecidos.

Apesar da administração i.p. apresentar maior concentração plasmática em relação à oral (14.3 vs. 2.2 µg/ml), a segunda a atinge na metade do tempo em relação à primeira (60 vs. 120 min). No cérebro, entretanto, a concentração via i.p. leva 1/6 do tempo, em relação à oral, para atingir a concentração máxima. A taxa de concentração cérebro/plasma via oral e i.p. foram de 0.84 e 0.51, respectivamente. Esses valores sugerem, apesar das diferentes concentrações plasmáticas, uma penetração similar da droga no tecido encefálico (Deiana et al., 2012).

Os resultados advindos das quantificações plasmática e cerebrais de CBD via s.c. dessa Dissertação, inéditos para a literatura científica, permite-nos traçar, também, a taxa cérebro/plasma. Em P0, esse valor é de 25.68 e, em P7, 1.15. O alto valor encontrado em filhotes recém-nascidos, que demonstra a concentração encefálica de CBD sendo 25 vezes maior que a plasmática pode ser explicado pela alta lipofilicidade do fitocanabinoide, que permite sua associação ao cérebro. Uma semana após, em P7, percebe-se a diminuição deste valor, praticamente equiparando as concentrações em ambos territórios (encefálico e plasmático). Tal achado por ser justificado pelas 1) taxas de meia-vida (horas, conforme citado previamente) e de eliminação da droga, que contribuem para o decréscimo da concentração de CBD e 2) pela acumulação de CBD, ainda pela lipofilicidade, no leite materno, já que estudos demonstram tal deposição (Moss et al., 2021).

Hložek e colaboradores (2017), no único estudo pré-clínico com a análise da administração s.c. de CBD, demonstram que essa via de administração leva ao surgimento de dois picos de concentração plasmática e cerebral de CBD, sendo o primeiro até a primeira hora e o segundo 4 horas após a administração (Hložek et al., 2017). Uma explicação que o estudo apresenta é o modelo de farmacocinética de dois compartimentos, no qual os canabinoides são, inicialmente, liberados para o sangue por mecanismos de transporte imediatamente após a administração, ao mesmo tempo em que são depositados na pele e no tecido adiposo branco, dos quais são posteriormente liberados (Hložek et al., 2017).

P14 e P21 não apresentaram concentrações detectáveis pela Espectrometria de Massas. Em P28, porém, há a aparente recuperação das concentrações plasmáticas e cerebrais do fitocanabinoide, sendo a segunda 4.11 vezes maior do que a primeira (taxa cérebro/plasma = 4.11). Esse fenômeno possivelmente pode ser explicado pela teoria dos compartimentos da farmacocinética, permitindo o duradouro acúmulo do fitocanabinoide e sua lenta distribuição para a corrente sanguínea, seguido de sua lenta eliminação.

São sabidos alguns dos impactos pós-natais decorrentes da pré-exposição fetal a CBD. Os resultados apresentados nessa Dissertação corroboram as informações presentes na literatura, contribuindo, ao mesmo tempo, com novas descobertas sobre o assunto. Incluem-se, como exemplos, a facilitação à gênese de crises, com maiores índices de gravidade, e a manifestação de *SE* aos 28 dias pós-natais.

Chan e colaboradores (2013) demonstram que pequenas alterações nas concentrações de AEA e 2-AG podem afetar o sucesso da nidação e retardar o desenvolvimento embrionário fetal (Chan et al., 2013). Além disso, prejuízos na sinalização endocanabinoide são cruciais para o processo de epileptogênese (Cheung et al., 2019). A interferência do CBD nesse sistema acarreta a desregulação dos processos de geração, migração, sobrevivência, maturação e integração neuronal (Aguado et al., 2005; Cheung et al., 2019; Luján e Valverde, 2020), sendo este um possível mecanismo da gênese das epilepsias observadas nos animais P28, quanto na facilitação do desenvolvimento do *SE*. Ainda que o eCBS esteja presente em processos anteriores ao neurodesenvolvimento (Correa et al., 2016), a enzima FAAH tem a sua expressão aumentada na 9<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> semana de gestação em humanos (Helliwell et al., 2004), sendo o *checkpoint* metabólico da atividade do eCBS.



Foram demonstradas, em humanos, a presença e participação dos endocanabinoides desde o primeiro trimestre gestacional (Helliwell et al., 2004) e, em ratos, a partir do dia embrionário 10.5 (E10.5) (Fride, 2008). Neste modelo, há o aumento nos níveis de 2-AG, mantidos até a vida adulta, e a expressão menor de AEA, mantida estática até a vida adulta (Fride, 2008). Em convergência com esses achados, a interação CBD-eCBS eleva os níveis de AEA, em um mecanismo contrário ao fisiológico, tornando o cérebro mais susceptível à gênese das crises, uma vez que, corroborando o exposto anteriormente, o *nocaut* de FAAH, além de aumentar as concentrações de AEA, provoca a diminuição da migração celular, comprometendo a circuitaria neural em desenvolvimento (Cravatt et al., 2001).

Outro alvo molecular da AEA é o receptor TRPV1, localizado nos terminais pós-sinápticos. O acoplamento AEA-TRPV1 provoca o influxo de cálcio, exercendo citotoxicidade (Cernak et al., 2004), que é reforçada pela administração de CBD, agonista TRPV1, facilitando a neurotransmissão glutamatérgica (Mussella et al., 2009). Um terceiro componente que pode corroborar tal citotoxicidade é a administração i.p. de PILO, agonista muscarínico M1, levando à ativação de receptores do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA), envolvidos na neurotransmissão glutamatérgica, sendo este um possível mecanismo de geração, reforço e sustentação das crises epiléticas (Hamilton, et al. 1997; Lee, et al. 2017; Nirwan et al., 2018), participando, também, da facilitação ao *SE*.

Em ratos nos quais a epilepsia foi induzida pela administração i.p. de PILO, Wallace e colaboradores (2002) sugerem o envolvimento dos endocanabinoides na regulação da duração das crises através da modulação de CB1R (Wallace et al., 2002). Os endocanabinoides atuam no controle das crises, aumentando o limiar de disparo de potencial de ação nas células do hipocampo (Gloss e Vickrey, 2014) e por diminuírem a síntese de glutamato no SNC (Devinsky et al., 2014). Durante a crise, há o súbito aumento de 2-AG, assim como a expressão de CB1R (Wallace et al., 2003), ainda que a literatura científica demonstre, em hipocampos de pacientes acometidos por epilepsias, a menor expressão da enzima diacilglicerol lipase- $\alpha$  (DAGL- $\alpha$ ), responsável pela síntese de 2-AG a partir de ácidos graxos poliinsaturados, bem como do CB1R (Cheung et al., 2019).

O CBD age com baixa afinidade nos CB1R, modulando a neurotransmissão inibitória via ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato (Grant et al., 2018).

Schiavon et al. (2016) demonstraram a proliferação neuronal em baixas doses (3 mg/kg) de CBD, mas não em altas (30 mg/kg), possibilitando o entendimento da curva em U invertido, característica da farmacologia dos canabinoides (Silveira e Tufik, 1981). A curva em U invertido sugere a participação de múltiplos mecanismos farmacológicos frente a um distúrbio. É sabido também que este mesmo fitocanabinoide reduz a atividade neural (Kanyo et al., 2021) e a excitabilidade de interneurônios hipocampais através da modulação GABAérgica, redirecionando, em situações patológicas, o circuito trissináptico hipocampal, o que implica na geração das epilepsias (Khan et al., 2018) bem como o desenvolvimento do *SE*. Os dados da expressão de CB1R nas sub-regiões hipocampais podem fornecer uma observação interessante acerca do envolvimento desse receptor nesse processo.

A expressão de CB1R no hipocampo dos animais 28 dias pós-natais filhotes de mães pré-expostas a CBD se mostrou maior na região ventral quando comparada à dorsal. Compreendida pelo sistema límbico e pelas emoções, o aumento de CB1R nessa região pode se relacionar com a dificuldade de sociabilidade e a agressividade apresentada pelos casos clínicos (Fenwick, 1989; Shih et al., 2009). Além disso, estes dados podem se associar aos relatos de desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, como ansiedade e depressão, pós-natais (Jutras-Aswad et al., 2009; Calvigioni et al., 2014; Huizink, 2014; McLemore and Richardson, 2016).

Falenski e colaboradores (2009) demonstram a internalização de CB1R no hipocampo, sobretudo no DG, frente à indução de *SE* por PILO (Falenski et al., 2009). Entretanto, Maglóczy e colaboradores (2010) propõem que, frente à mesma administração, não há a diminuição da expressão dos CB1R em CA1 e DG, uma vez que a diminuição de sua expressão em axônios de neurônios glutamatérgicos é compensada com o aumento dos mesmos receptores em axônios de neurônios GABAérgicos (Maglóczy et al., 2010).

O aumento da expressão de CB1R ventral se estende à sub-área CA1, inferindo a participação do receptor, nessa região, em processos intrinsecamente associados com as conexões hipocampais com o córtex entorrinal, principalmente os processos de criação, consolidação e reforço das emoções (Kandel, 2014). As mudanças das expressões de CB1R nas regiões ventral e dorsal do hipocampo podem estar associadas com o sistema inibitório GABAérgico, que se correlaciona com a perda de neurônios piramidais em

CA1, sobretudo na região dorsal (Maglóczy et al., 2010), além de contribuir, na região ventral, para a hipersincronia destes neurônios, aumentando a inibição que, por sua vez, contribui para o quadro epileptogênico (Quardoz et al., 2012).

Na sub-área CA2, ainda que o tratamento com CBD pareça aumentar a intensidade de CB1R nas regiões dorsal e ventral do hipocampo, quando comparado aos respectivos controles, não houve diferença estatística. É tido que CA2 é uma sub-região importante para o controle das crises (Dudek et al., 2016; Reyes-Garcia et al., 2018), visto a resistência, mediada pela menor perda de neurônios piramidais, sobretudo quando comparados às sub-regiões CA1 e CA3 (Williamson e Spencer, 1994), que a circuitaria apresenta. Em CA3, há a sugestão de que o tratamento com CBD não aumente a expressão de CB1R nas regiões dorsal e ventral, ocorrendo, na última, uma leve diminuição no padrão de intensidade. CA3 se faz importante visto ser a região de aferência das conexões do córtex entorrinal. Logo, interferências nas sinapses dos neurônios dessa conexão auxiliam o entendimento da manifestação dos transtornos neuropsiquiátricos nas etapas pós-natais. Entretanto, esses dados também não apresentaram significância estatística.

No GD, ao contrário dos resultados quantificados no hipocampo total e de CA1, o tratamento com CBD levou ao aumento da expressão de CB1 no hipocampo dorsal, contrariando os achados de Falenski e colaboradores (2009). É sabido que a região dorsal hipocampal é fundamental para os processos de memória e aprendizado. Os achados da intensidade de CB1R nessa região podem ser entendidos como um possível mecanismo de proteção para os neurônios presentes nesta região, ainda que as alterações pós-natais nos processos de atenção e consolidação da memória sejam demonstradas pela literatura. Para averiguar se os achados se estendem aos animais utilizados neste estudo, faremos como perspectiva futura o teste de memória utilizando o Labirinto Aquático de Morris (LAM), hipotetizando a ratificação de tais informações.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o tratamento com CBD diminui a diferenciação celular (Solinas et al., 2012), além de levar ao menor aporte de ácido fólico (vitamina B9), importante para a replicação de DNA, formação placentária e desenvolvimento fetal, sobretudo na formação do tubo neural (Araújo et al., 2009; Friedrich et al., 2016). Esses dados podem auxiliar no entendimento do aborto espontâneo encontrado neste estudo, sofrido pela rata aos 19 dias gestacionais (GD19) e, possivelmente, com a má-formação de um dos filhotes P0, também observado. Ainda que

a literatura não elucide a possível interação entre o tratamento com CBD e as vias de sinalização relacionadas à família dos *bone morphogenic protein (BMP)* e *fibrillary growth factor (fgf)*, importantes para o processo de desenvolvimento dos membros, Vrechi e colaboradores (2021) apontam o CBD na promoção de autofagia. No estudo, eles apontam a participação das vias ERK1/2 e da PI3K/Akt/mTOR, responsáveis pela regulação do metabolismo, crescimento e proliferação celular (Vrechi et al., 2021).

Elliott e colaboradores (2003) demonstram que os mecanismos moleculares dos processos de neurodesenvolvimento e epileptogênese apresentam intersecções. No contexto do GD, dos 25 genes alvos do estudo, 11 estão presentes em ambos os processos. Tais genes, superexpressos (*upregulated*) ou suprimidos (*downregulated*), participam da morfologia e do destino celular, do crescimento axonal e da proliferação neuronal (Elliott et al., 2003). Um dos genes mencionados no trabalho é o *gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit delta (GABRD)* que codifica a subunidade  $\Delta$  do receptor GABA<sub>A</sub> e está relacionado com a atividade extrassináptica (Belelli et al., 2009) na área tegmental ventral (VTA), GD, bem como em todo o hipocampo (Vashchinkina et al., 2014). Nos processos de neurodesenvolvimento e epileptogênese, a subunidade  $\Delta$  do receptor GABA<sub>A</sub> se mostra *downregulada*, impactando os processos de aprendizado, memória e recompensa (Vashchinkina et al., 2014). Os dados dessa Dissertação podem se estender à luz dessa interpretação, com a hipótese de que tanto a gênese da crise quanto a facilitação do *SE* pós-natal apresentam associação com a menor expressão gênica de GABRD.

O tratamento com CBD mostra o aumento significativo no peso das fêmeas, em comparação ao grupo controle. As ingestões de comida e água não foram avaliadas, porém há uma grande plausibilidade em assumir os seus respectivos aumentos, principalmente quanto associa-se com o maior número de filhotes gerados por mães CBD, que necessitam de um maior aporte energético para nutrir-se e nutri-los, ainda que os mesmos nasçam com um tamanho menor quando comparado aos filhotes advindos de mães controle.

O presente estudo não encontrou diferenças no peso dos filhotes entre o grupo controle e CBD, ainda que haja um sugestivo comportamento de aumento da massa no grupo exposto a CBD até os 14 dias pós-natais, revertidos a partir do 21º dia, porém sem significância estatística. Ignatowska-Jankowska e colaboradores (2011) demonstram que

o CBD é capaz de promover diminuição do peso dos animais, sugerindo a participação de CB2R (Ignatowska-Jankowska et al., 2011). Entretanto, há relatos na literatura que sugerem a participação deste mesmo receptor no processo de formação e ganho ósseo, ao mesmo tempo que sugerem a ativação de CB1R como um regulador alostérico negativo desse processo (Bab e Zimmer, 2008).

Finalmente, outra perspectiva futura desse trabalho é identificar os marcadores genéticos-moleculares nos componentes das vias supracitadas, a fim de tentar explicar as justificativas para esse perfil de massa tanto materna quanto fetal, ao mesmo tempo em que também caracterizar os candidatos gênicos que podem estarem envolvidos nos processos de aborto e má-formação neonatal. A junção de esforços e colaborações para a obtenção de todos os presentes achados, junto a literatura, auxiliaram no entendimento da relação entre as vias de sinalização apresentadas, bem como a síntese e degradação dos endocanabinoides, ambos extremamente importantes para o processo de neurodesenvolvimento. Ao mesmo tempo, deixa perguntas, como perspectivas futuras, para serem avaliadas, investigadas e respondidas. Algo natural para a ciência e que, inexoravelmente, a deixa tão bela quanto sempre foi.

## **6. Conclusões e Considerações Finais**

Pelos dados expostos, vê-se que o tratamento pré-natal (mães grávidas) com CBD é capaz de levar, na prole exposta, ao desenvolvimento de crises com grau e índices de gravidade maiores, além de facilitar a gênese do *SE* por PILO. Esse achado confirma a hipótese do presente trabalho. Também foi demonstrada a influência do tratamento no peso gestacional e na expressão do CB1R nas regiões dorsal e ventral do hipocampo, bem como nas sub-áreas CA1, CA2, CA3 e DG.

Juntos, os dados encontrados na presente Dissertação são capazes de auxiliar e acrescentar os achados clínicos, sobretudo nas Epilepsias e no desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, colaborando para a necessária translação entre as áreas básicas e clínicas.

Pelo infeliz contexto ainda vigente no Brasil e no mundo, experimentos adicionais necessitam serem feitos, tais como o LAM, para a investigação do processo de memória

e o estudo de algumas vias moleculares, candidatas a explicar a má-formação e os processos metabólicos fetais. Assim que possível, tais experimentos serão realizados.

Estes dados, juntos aos expostos na Dissertação, certamente ajudarão a compor o cenário social e ajudarão a desmistificar todo o pré-conceito que existe na figura do cientista e na utilização da terapêutica com a *Cannabis* medicinal.

## 7. Referências

Adams, R., Hunt, M., Clark, J. H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. Journal of the American Chemical Society 1940 62 (1), 196-200.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2005) The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. FASEB J 19:1704–1706.

Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. Prog Neurobiol 68(4):247–286

Altman, J. & Gopal D. Das. Postnatal Neurogenesis in the Guinea-pig. Nature volume 214, pages1098–1101 (1967).

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). World Health Organization. Neuroscience of psychoactive substance use and dependence. Prog Brain Res, 2007; 163:3-22.

Araujo JR, Goncalves P, Martel F. Effect of cannabinoids upon the uptake of folic acid by BeWo cells. Pharmacology. 2009;83(3):170–6.

Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. Br J Pharmacol. 2008 Jan;153(2):182-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0707593. Epub 2007 Dec 10. PMID: 18071301; PMCID: PMC2219540.

Bayrampour H, Zahradnik M, Lisonkova S, Janssen P. Women’ s perspectives about cannabis use during pregnancy and the postpartum period: an integrative review. Prev Med (Baltim). 2019;119(December 2018):17–23.

Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009) Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. J Neurosci 29:12757–12763. 10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nature Reviews Neuroscience, 3(9), 728.

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001 Oct;134(4):845-52. doi: 10.1038/sj.bjp.0704327. PMID: 11606325; PMCID: PMC1573017.

Blackard, C., & Tennes, K. (1984). Human placental transfer of cannabinoids. *The New England journal of medicine*, 311(12), 797-797.

Brown, H. L., & Graves, C. R. (2013). Smoking and Cannabis Use in Pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 56(1), 107-113

Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L. and Piomelli, D. (1996) Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *Journal of Neuroscience* 16, 3934–3942.

Calvigioni, D., Hurd, Y. L., Harkany, T., & Keimpema, E. (2014). Neuronal substrates and functional consequences of prenatal cannabis exposure. *European child & adolescent psychiatry*, 23(10), 931–941.

Cameron, H.A.; Woolley, C.S.; MCewen, B.S.; Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci*, 56:337-344.

Carty DR, Miller ZS, Thornton C, Pandelides Z, Kutchma ML, Willett KL. Multigenerational consequences of early-life cannabinoid exposure in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019 Feb 1;364:133-143. doi: 10.1016/j.taap.2018.12.021. Epub 2018 Dec 27. PMID: 30594692; PMCID: PMC6347400.

Cavalheiro EA, Silva DF, Turski WA, Calderazzo-Filho LS, Bortolotto ZA, Turski L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Brain Res.* 1987 Dec 15;465(1-2):43-58. doi: 10.1016/0165-3806(87)90227-6. PMID: 3440212.

Cernak I, Vink R, Natale J, Stoica B, Lea P.M., Movsesyan V, Ahmed F, Knoblach S.M., Fricke S.T., Faden A.I. The 'dark side' of endocannabinoids: a neurotoxic role for anandamide. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004;24:564–578

Chan, H., McKirdy, N. C., Peiris, H. N., Rice, G. E., and Mitchell, M. D. (2013). The role of endocannabinoids in pregnancy. *REPRODUCTION* 146, 3, R101-R109, available from: < <https://doi.org/10.1530/REP-12-0508> > [Accessed 15 June 2021]

Cheung, K., Peiris, H., Wallace, G., Holland, O. J., & Mitchell, M. D. (2019). The Interplay between the Endocannabinoid System, Epilepsy and Cannabinoids. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6079. <https://doi.org/10.3390/ijms20236079>

Correa, F. Wolfson, M. Valchi, P. Aisemberg, J. Franchi, A. Endocannabinoid system and pregnancy. *Reproduction.* 2016 vol: 152 (6) pp: R191-R200

Corsi DJ, Walsh L, Weiss D, et al. Association Between Self-reported Prenatal Cannabis Use and Maternal, Perinatal, and Neonatal Outcomes. *JAMA*. 2019;322(2):145–152. doi:10.1001/jama.2019.8734

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9371-6. doi: 10.1073/pnas.161191698. Epub 2001 Jul 24. PMID: 11470906; PMCID: PMC55427. Dalterio SL, DeRooij DG. Maternal cannabinoid exposure effects on spermatogenesis in male offspring. *Int J Androl*. 1986;9(4):250–8.

Darnell, D. and Gilbert, S. F. (2017), *Neuroembryology*. *WIREs Dev Biol*, 6: e215.

Darrin J. Lee, Ali Izadi, Mikhail Melnik, Stacey Seidl, Angela Echeverri, Kiarash Shahlaie, Gene G. Gurkoff, Stimulation of the medial septum improves performance in spatial learning following pilocarpine-induced status epilepticus, *Epilepsy Research*, Volume 130, 2017, Pages 53-63, ISSN 0920-1211, <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.01.005>.

Da Silva, Naielly Rodrigues; Gomes, Felipe Villela; Sonogo, Andreza Buzolin; Da Silva, Nicole Rodrigues; Guimarães, Francisco Silveira. Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT1A, but not CB1 and CB2 receptors. *Pharmacological Research*, V. 156, P. 104749, 2020.

de Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology research & perspectives*, 8(6), e00682. <https://doi.org/10.1002/prp2.682>

Dekker GA, Lee SY, North RA, McCowan LM, Simpson NAB, et al. (2012) Risk Factors for Preterm Birth in an International Prospective Cohort of Nulliparous Women. *PLOS ONE* 7(7): e39154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039154>

Dekker, N., Meijer, J., Koeter, M. W. J., van den Brink, W., van Beveren, N., Kahn, R. S., Myin-Germeys, I. (2012). Age at onset of non-affective psychosis in relation to cannabis use, other drug use and gender. *Psychological Medicine*, 42(9).

De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 2011 Aug;163(7):1479-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x. PMID: 21175579; PMCID: PMC3165957.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A. et al. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.

Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W. G., Martinez-Orgado, J., Robson, P. J.,



Rohrback, B. G., Thiele, E., Whalley, B., & Friedman, D. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791–802. <https://doi.org/10.1111/epi.12631>

Devinsky O, Marsh E, Friedman D, Thiele E, Laux L, Sullivan J, Miller I, Flamini R, Wilfong A, Filloux F, Wong M, Tilton N, Bruno P, Bluvstein J, Hedlund J, Kamens R, Maclean J, Nangia S, Singhal NS, Wilson CA, Patel A, Cilio MR. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurol*. 2016 Mar;15(3):270-8. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00379-8. Epub 2015 Dec 24. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2016 Apr;15(4):352. PMID: 26724101.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. and Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686–691.

Donatti, Ana Luiza Ferreira; GARCIA-CAIRASCO, Norberto. Consequências da displasia cortical focal desenvolvida em ratos Wistar submetidos à técnica de criolesão. 2015. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Dudek, S. M., Alexander, G. M., & Farris, S. (2016). Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Nature reviews. Neuroscience*, 17(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.22>

Endrenyi L, Fritsch S, Yan W. Cmax/AUC is a clearer measure than Cmax for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1991 Oct;29(10):394-9. PMID: 1748540.

Elliott, R. C., Miles, M. F., & Lowenstein, D. H. (2003). Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(6), 2218–2227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02218.2003>

El Marroun H et al (2008) Demographic, emotional and social determinants of cannabis use in early pregnancy: the generation R study. *Drug Alcohol Depend* 98(3):218–226

Elmes MW, Kaczocha M, Berger WT, Leung K, Ralph BP, Wang L, et al. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *J Biol Chem*. 2015;290:8711–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618447>.

Fentress JC, Stilwell FP. Grammar of a movement sequence in inbred mice. (Letter) *Nature* 1973;244:52–3

Fenwick P. The nature and management of aggression in epilepsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1989 Fall;1(4):418-25. doi: 10.1176/jnp.1.4.418. PMID: 2521095.

Fisher RS1, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. Apr;55(4):475-82.

Fogaça, Manoela V. ; Campos, Alline C. ; Coelho, Ludmila D. ; Duman, Ronald S. ; Guimarães, Francisco S. . The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology*, v. 135, p. 22-33, 2018.

Food and Drug Administration (FDA). FDA Approves First Drug Comprised of an Active Ingredient Derived from Marijuana to Treat Rare, Severe Forms of Epilepsy. Jun. 2018. Disponível em <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms>. Acesso em 15/06/2021.

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017–1066

Fried PA. Conceptual issues in behavioral teratology and their application in determining longterm sequelae of prenatal marijuana exposure. *J Child Psychol Psychiatry*. 2002;43:81–102.

Friedrich, J., Khatib, D., Parsa, K., Santopietro, A., & Gallicano, G. I. (2016). The grass isn't always greener: The effects of cannabis on embryological development. *BMC pharmacology & toxicology*, 17(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0085-6>

Fride E. Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol*. 2008 May;20 Suppl 1:75-81. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01670.x. PMID: 18426504.

Garcia-Cairasco N, Sabbatini RM. Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1983 Jul;16(2):171-83. PMID: 6686072.

Garcia-Cairasco N, Doretto MC, Prado RP, Jorge BP, Terra VC, Oliveira JA. New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures: a comparison of two ethological methods. *Behav Brain Res* 1992;48:49–56.

Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JA, Gomes EL, Del Bel EA, Mello LE. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 1996;26:177–92.

Garcia-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear Res* 2002;168:208–22.

Garcia-Cairasco N, Rossetti F, Oliveira JA, Furtado Mde A. Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy Behav.* 2004 Aug;5(4):455-63. doi: 10.1016/j.yebeh.2004.04.005. PMID: 15256181.

García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Gasparyan A, Austrich-Olivares A, Sala F, Manzanares J. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules.* 2020 Nov 19;10(11):1575. doi: 10.3390/biom10111575. PMID: 33228239; PMCID: PMC7699613.

Gastaut H. Classification of status epilepticus. *Adv Neurol.* 1983;34:15-35. PMID: 6829330.

Gerdeman GL, Lovinger DM (2003) Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 140(5):781–789

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>

Gloss D, Vickrey B. Cannabinoids for epilepsy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 3. Art. No.: CD009270

Grant KS, Petroff R, Isoherranen N, Stella N, Burbacher TM. Cannabis use during pregnancy: Pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacol Ther.* 2018 Feb;182:133-151. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.014. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28847562; PMCID: PMC6211194. Grlic, L. (1976). A comparative study on some chemical and biological characteristics of various samples of cannabis resin. *Bull. Narc.* 14, 37–46.

Gunasekaran N, Long LE, Dawson BL, Hansen GH, Richardson DP, Li KM, et al. Reintoxication: the release of fat-stored delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) into blood is enhanced by food deprivation or ACTH exposure. *Br J Pharmacol.* 2009;158(5):1330–7.

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM.(1997). Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 25;94(24):13311-6

Hayatbakhsh Mohammad R., Flenady Vicki J., Gibbons Kristen S., Kingsbury Ann M., Hurriion Elizabeth Mamun, Abdullah A. Najman, Jake M. (2011) Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy. *Pediatric Research.* International Pediatric Research Foundation, Inc. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.25>

Hindocha C, Freeman TP, Schafer G, Gardener C, Das RK, Morgan CJ, Curran HV. Acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and their combination on facial emotion recognition: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in

cannabis users. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015 Mar;25(3):325-34. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.11.014. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25534187; PMCID: PMC4398332.

Hložek T, Uttl L, Kadeřábek L, Balíková M, Lhotková E, Horsley RR, Nováková P, Šíchová K, Štefková K, Tylš F, Kuchař M, Páleníček T. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017 Dec;27(12):1223-1237. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.10.037. Epub 2017 Nov 10. PMID: 29129557.

Huizink AC (2013) Prenatal cannabis exposure and infant outcomes: overview of studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 52:45–52.

Ignatowska-Jankowska B, Jankowski MM, Swiergiel AH. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: involvement of CB2 receptors. *Neurosci Lett.* 2011 Feb 18;490(1):82-4. doi: 10.1016/j.neulet.2010.12.031. Epub 2010 Dec 21. PMID: 21172406.

Jutras-Aswad D et al (2009) Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259(7): 395–412

Kaas, Jon H. (2017). *Evolution of Nervous Systems. Reference Work, 2nd Edition, 2007 p.*

Kandel, E.R. *Princípios de Neurociências* Porto Alegre Ed. MC HILL 5a. Edição 2014.

Kanyo, R., Amin, M.R., Locskai, L.F. et al. Medium-throughput zebrafish optogenetic platform identifies deficits in subsequent neural activity following brief early exposure to cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Sci Rep* 11, 11515 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90902-3>

Katona I, Freund TF (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14(9):923–930

Kerri A. Schoedel, Isabella Szeto, Beatrice Setnik, Edward M. Sellers, Naama Levy Cooperman, Catherine Mills, Tilden Etges, Kenneth Sommerville, Abuse potential assessment of cannabidiol (CBD) in recreational polydrug users: A randomized, double-blind, controlled trial, *Epilepsy & Behavior*, Volume 88, 2018, Pages 162-171, ISSN 1525-5050.

Khan S, Nobili L, Khatami R, Loddenkemper T, Cajochen C, Dijk DJ, Eriksson SH. Circadian rhythm and epilepsy. *Lancet Neurol.* 2018 Dec;17(12):1098-1108. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30335-1. Epub 2018 Oct 23. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2018 Nov 19;: PMID: 30366868.

Khazipov R. (2016). GABAergic Synchronization in Epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(2), a022764. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022764>

Knowles, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol.* 1992; 9(2):252-63.

Kornack DR, Rakic P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5768–5773

Laprairie, R., Bagher, A., Kelly, M., and Denovan-Wright, E. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4790–4805. doi: 10.1111/bph.13250

Lazarini-Lopes Willian, da Silva-Júnior Rui M. P., Servilha-Menezes Gabriel, Do Val-da Silva Raquel A., Garcia-Cairasco Norberto. Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) Expression in Limbic Brain Structures After Acute and Chronic Seizures in a Genetic Model of Epilepsy. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 14. 2020. 238. 10.3389/fnbeh.2020.602258

Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalleiro EA (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res.* 50(1-2):93-103.

Luján MÁ, Valverde O. The Pro-neurogenic Effects of Cannabidiol and Its Potential Therapeutic Implications in Psychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci.* 2020 Jun 26;14:109. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00109. PMID: 32676014; PMCID: PMC7333542.

Maccarrone, M., Guzmán, M., Mackie, K. et al. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci* 15, 786–801 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrn3846>

Maglóczy, Z., Tóth, K., Karlócai, R., Nagy, S., Eross, L., Czirják, S., Vajda, J., Rásonyi, G., Kelemen, A., Juhos, V., Halász, P., Mackie, K., & Freund, T. F. (2010). Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia*, 51 Suppl 3(Suppl 3), 115–120. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02624.x>

Marsicano G, Lutz B (2006) Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Investig* 29(3 Suppl):27–46

Martínez-Pinilla, E., Varani, K., Reyes-Resina, I., Angelats, E., Vincenzi, F., Ferreiro-Vera, C., et al. (2017). Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. *Front. Pharmacol.* 8:744. doi: 10.3389/fphar.2017.00744.

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. and Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.

McDonald, A. J., and Mascagni, F. (2001). Localization of the CB1 type cannabinoid receptor in the rat basolateral amygdala: High concentrations in a subpopulation of

cholecystikinin-containing interneurons. *Neuroscience* 107, 641–652. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00380-3

McGuire P, Robson P, Cubala WJ, Vasile D, Morrison PD, Barron R, Taylor A, Wright S. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2018 Mar 1;175(3):225-231. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.17030325. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29241357.

McLemore GL, Richardson KA. Data from three prospective longitudinal human cohorts of prenatal marijuana exposure and offspring outcomes from the fetal period through young adulthood. *Data Brief*. 2016 Oct 18;9:753-757. doi: 10.1016/j.dib.2016.10.005. PMID: 27833935; PMCID: PMC5096595.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L. et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* 50, 83–90.

Mechoulam R & Gaoni Y 1965 Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21 1223–1229.

Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol*. 2002;42(S1):11S–9S.

Melisa J. Wallace, Robert E. Blair, Katherine W. Falenski, Billy R. Martin and Robert J. DeLorenzo (2003). The Endogenous Cannabinoid System Regulates Seizure Frequency and Duration in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* October 1, 2003, 307 (1) 129-137;

Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MM, Guinsburg R, Laranjeira R. Teenage pregnancy: use of drugs in third trimester and prevalence of psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28(2):122-5.

Moss, M.J., Bushlin, I., Kazmierczak, S. et al. Cannabis use and measurement of cannabinoids in plasma and breast milk of breastfeeding mothers. *Pediatr Res* (2021).

Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.

Musella A, De Chiara V, Rossi S, Prosperetti C, Bernardi G, Maccarrone M, Centonze D (2009) TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci* 40:89–97

Nirwan N, Siraj F, Vohora D. Inverted-U response of lacosamide on pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in C57BL/6 mice is independent of hippocampal collapsin response mediator protein-2. *Epilepsy Res*. 2018 Sep;145:93-101. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2018.06.009. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29935443.

Nomura Y, Marks DJ, Halperin JM. Prenatal exposure to maternal and paternal smoking on attention deficit hyperactivity disorders symptoms and diagnosis in offspring. *J Nerv Ment Dis.* 2010;198(9):672–8.

Norton S. The study of sequences of motor behavior. In: Iversen LC, Iversen SD, Snyder SH, editors. *Handbook of psychopharmacology; principles of behavioral pharmacology*, vol. 7. New York: Plenum; 1977. p. 82–105.

O'Connell BK, Gloss D, Devinsky O. Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: A review. *Epilepsy Behav.* 2017 May;70(Pt B):341-348. doi: 10.1016/j.yebeh.2016.11.012. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28188044.

Onaivi, E. S., Ishiguro, H. , Gong, J. , Patel, S. , Perchuk, A. , Meozzi, P. A., Myers, L. , Mora, Z. , Tagliaferro, P. , Gardner, E. , Brusco, A. , Akinshola, B. E., Liu, Q. , Hope, B. , Iwasaki, S. , Arinami, T. , Teasenfitz, L. And Uhl, G. R. (2006), Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074: 514-536.

Osama M. H. Habayeb, Anthony H. Taylor, Stephen C. Bell, David J. Taylor, Justin C. Konje, Expression of the Endocannabinoid System in Human First Trimester Placenta and Its Role in Trophoblast Proliferation, *Endocrinology*, Volume 149, Issue 10, 1 October 2008, Pages 5052–5060, <https://doi.org/10.1210/en.2007-1799>.

Ouardouz M, Carmant L. Changes in inhibitory CA1 network in dual pathology model of epilepsy. *Channels (Austin).* 2012 Jan-Feb;6(1):18-25. doi: 10.4161/chan.18615. Epub 2012 Jan 1. PMID: 22373560.

O.W. Castro, M.A. Furtado, C.Q. Tilelli, A. Fernandes, G.P. Pajolla, N. Garcia-Cairasco, Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research.* Volume 1374, 2011, Pages 43-55, ISSN 0006-8993, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.012>.

Palanisamy, A. (2012). Maternal anesthesia and fetal neurodevelopment, *International Journal of Obstetric Anesthesia*, Volume 21, Issue 2, 2012, Pages 152-162.

Paria, B. C., Das, S. K., & Dey, S. K. (1995). The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9460–9464. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9460>

Paxinos, G., and Watson, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edn. San Diego, CA: Academic Press.

Pereira, P. D. A influência da estimulação olfatória no desenvolvimento de crises límbicas em ratos Wistar. 2015. Dissertação (Mestrado em Neurologia) - Faculdade de Medicina

de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015. doi:10.11606/D.17.2017.tde-01022016-103743. Acesso em: 2021-07-07.

Perez-Reyes, M. & Wall, M. E. Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. *N. Engl. J. Med.* 307, 819–820 (1982).

Pertwee, R. G., and Ross, R. A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 101–121. doi: 10.1054/plef.2001.0341

Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 153, 199–215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707442

Pinel JP, Rovner LI. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol.* 1978 Jan 15;58(2):190-202. doi: 10.1016/0014-4886(78)90133-4. PMID: 618743.

Psychoyos D, Hungund B, Cooper T, Finnell RH (2008) A cannabinoid analogue of Delta9-tetrahydrocannabinol disrupts neural development in chick. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 83(5):477–488.

Psychoyos, D., Vinod, K. Y., Cao, J., Xie, S., Hyson, R. L., Wlodarczyk, B., He, W., Cooper, T. B., Hungund, B. L., & Finnell, R. H. (2012). Cannabinoid receptor 1 signaling in embryo neurodevelopment. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 95(2), 137–150. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20348>

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972 Mar;32(3):281-94. doi: 10.1016/0013-4694(72)90177-0. PMID: 4110397.

Rachel J. A. Helliwell, Lawrence W. Chamley, Katherine Blake-Palmer, Murray D. Mitchell, Janice Wu, Christopher S. Kearns, Michelle Glass, Characterization of the Endocannabinoid System in Early Human Pregnancy, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 89, Issue 10, 1 October 2004, Pages 5168–5174, <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0388>

Renard J, Loureiro M, Rosen LG, Zunder J, de Oliveira C, Schmid S, Rushlow WJ, Laviolette SR. Cannabidiol Counteracts Amphetamine-Induced Neuronal and Behavioral Sensitization of the Mesolimbic Dopamine Pathway through a Novel mTOR/p70S6 Kinase Signaling Pathway. *J Neurosci.* 2016 May 4;36(18):5160-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3387-15.2016. PMID: 27147666; PMCID: PMC4854973.

Represa A. (2019). Why Malformations of Cortical Development Cause Epilepsy. *Frontiers in neuroscience*, 13, 250.

Reyes-Garcia, S.Z., Scorza, C.A., Araújo, N.S. et al. Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant



temporal lobe epilepsy. *Sci Rep* 8, 7116 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25378-9>

Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 140, 790–801. doi: 10.1038/sj.bjp.0705467

Rossetti F, Rodrigues MC, de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 2006 Dec;72(2-3):192-208. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2006.08.001. PMID: 17150334.

Sarrafpour S, Urits I, Powell J, Nguyen D, Callan J, Orhurhu V, Simopoulos T, Viswanath O, Kaye AD, Kaye RJ, Cornett EM, Yazdi C. Considerations and Implications of Cannabidiol Use During Pregnancy. *Curr Pain Headache Rep.* 2020 Jun 10;24(7):38. doi: 10.1007/s11916-020-00872-w. PMID: 32524214.

Saez TM, Aronne MP, Caltana L, Brusco AH (2014) Prenatal exposure to the CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 alters migration of early-born glutamatergic neurons and GABAergic interneurons in the rat cerebral cortex. *J Neurochem* 129(4):637–648

Sagredo O, Palazuelos J, Gutierrez-Rodriguez A, Satta V, Galve-Roperh I, Martínez-Orgado J. Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochem Pharmacol.* 2018 Nov;157:85-96. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.014. Epub 2018 Aug 15. PMID: 30118663.

Scharfman H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7(4), 348–354.

Schiavon A. P., Bonato J. M., Milani H., Guimarães F. S., Weffort de Oliveira R. M. (2016). Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 64, 27–34. 10.1016/j.pnpbp.2015.06.017

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019

Schmidt, M. J., & Mirnics, K. (2015). Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 40(1), 190–206. Substance Abuse and Mental Health Administration (2011). Definitions.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089

Shih, J. J., LeslieMazwi, T., Falcao, G., & Van Gerpen, J. (2009). Directed aggressive behavior in frontal lobe epilepsy: a video-EEG and ictal spect case study. *Neurology*, 73(21), 1804–1806. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c2933f>

Silote, Gabriela Pandini ; Sartim, Ariandra ; Sales, Amanda ; Eskelund, Amanda ; Guimarães, Fs ; Wegener, Gregers ; Joca, Samia . Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *Journal Of Chemical Neuroanatomy*, v. 98, p. 104-116, 2019.

Silveira Filho NG, Tufik S. Comparative effects between cannabidiol and diazepam on neophobia, food intake and conflict behavior. *Res Commun Psychol Psychiatry Behav*. 1981;6:25-6

Solinas M, Massi P, Cantelmo AR, Cattaneo MG, Cammarota R, Bartolini D, Cinquina V, Valenti M, Vicentini LM, Noonan DM, Albin A, Parolaro D. Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2012;167(6):1218–31.

Soltész I, Alger BE, Kano M, Lee SH, Lovinger DM, Ohno-Shosaku T et al (2015) Weeding out bad waves: towards selective cannabinoid circuit control in epilepsy. *Nat Rev Neurosci* 16(5):264–277

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. and Waku, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemistry Biophysics Research Communications* 215, 89–97.

Tilelli CQ (2003) Estudo das alterações comportamentais, eletrofisiológicas e morfológicas num modelo animal para estudo das epilepsias. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de fisiologia – Universidade de São Paulo.

Tilelli CQ, Del Vecchio F, Fernandes A, Garcia-Cairasco N. (2005) Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. *Epilepsy Behav.*; 7(3):401-10. Epub 2005 Sep 2.

Todd SM, Arnold JC. Neural correlates of interactions between cannabidiol and  $\Delta(9)$  - tetrahydrocannabinol in mice: implications for medical cannabis. *Br J Pharmacol*. 2016 Jan;173(1):53-65. doi: 10.1111/bph.13333. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26377899; PMCID: PMC4813392.

Toth, A. B., Shum, A. K., & Prakriya, M. (2016). Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell calcium*, 59(2-3), 124–134.

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. C., Mackie, K., and Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00436-3

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983 Sep;9(3):315-35. doi: 10.1016/0166-4328(83)90136-5. PMID: 6639740.

Valim Brigante TA, Abe FR, Zuardi AW, Hallak JEC, Crippa JAS, de Oliveira DP. Cannabidiol did not induce teratogenicity or neurotoxicity in exposed zebrafish embryos. *Chem Biol Interact.* 2018 Aug 1;291:81-86. doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.008. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29902416.

Vashchinkina E, Panhelainen A, Aitta-Aho T, Korpi ER (2014-11-25). "GABAA receptor drugs and neuronal plasticity in reward and aversion: focus on the ventral tegmental area". *Frontiers in Pharmacology.* 5: 256. doi:10.3389/fphar.2014.00256.

Vrechi, T.A.M., Leão, A.H.F.F., Morais, I.B.M. et al. Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. *Sci Rep* 11, 5434 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84879-2>

Xie H, Sun X, Piao Y, Jegga AG, Handwerker S, Ko MS, Dey SK. Silencing or amplification of endocannabinoid signaling in blastocysts via CB1 compromises trophoblast cell migration. *J Biol Chem.* 2012;287(38):32288–97.

Young-Wolff, K. C. et al. Self-reported daily, weekly, and monthly cannabis use among women before and during pregnancy. *JAMA Netw. Open* 2, e196471 (2019).

Wallace MJ, Martin BR, DeLorenzo RJ (2002). Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur J Pharmacol* 452(3):295–301

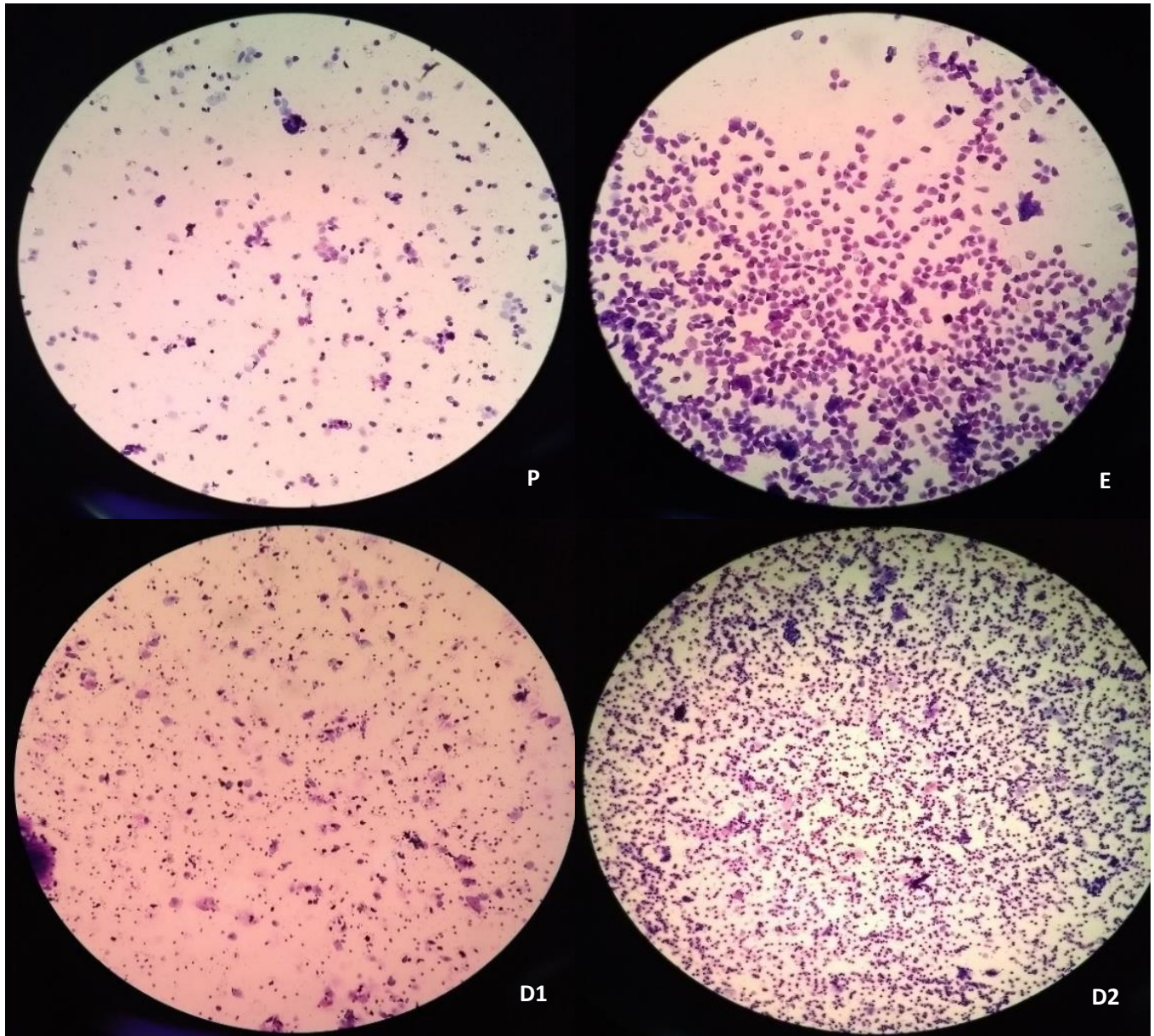
What you should know about using cannabis, including cbd, when pregnant or breastfeeding | FDA [Internet]. Acesso em 15/06/2021.

Williamson A, Spencer DD. Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus.* 1994 Apr;4(2):226-37. doi: 10.1002/hipo.450040213. PMID: 7951697.

World Health Organization (WHO). Epilepsy. Feb. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>>. Acesso em: 04/10/2019.

Zuardi, Antonio Waldo. History of cannabis as a medicine: a review. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 28, n. 2, p. 153-157, 2006.

## 8. Material Suplementar



**Figura 33. Fases do ciclo estral de ratas.** O compilado de imagens demonstra as fases de Proestro (P), marcadas por células arredondadas; Estro (E), considerada fértil, no qual as células se apresentam em formato de folhas; Diestro Inicial, Metaestro ou Diestro 1 (D1), no qual percebe-se a presença de células sanguíneas e Diestro Final ou Diestro 2 (D2), marcado pela presença de células do sistema imune. Lâmina corada pelo método de Panótico rápido.



**Figura 34. Esfregaço com a presença de espermatozoide.** Lâmina feita a partir do esfregaço vaginal após a união da fêmea com o macho. A presença dos espermatozoides indica o primeiro dia de gravidez (GD1). Lâmina corada pelo método de Panótico rápido.

**Tabela Complementar 1.** Dicionário de alguns dos itens comportamentais seguidos de suas correspondentes siglas (Garcia-Cairasco et al., 1992) (Pereira, 2015).

Port	Descrição	Port	Descrição	Port	Descrição
AL	Autolimpeza frontal	DEID	Deitar	OPIS	Opistotonus
ALD	Autolimpeza direita	EL	Elevação	POHL	Piscar os olhos
ALE	Autolimpeza esquerda	ER	Ereto	PIV <sub>1</sub>	Pivotear
ALER	Alerta	ECL	Espasmo clônico	PR	Parar
ALG	Autolimpeza de genitais	FCB	Flexão de cabeça	PU	Pular
AP	Apnéia	GID	Girar à direita	QT	Queda atônica
BC	Bocejar	GIE	Girar à esquerda	RE	Recuar
CBC	Cabeceio	HP <sub>1</sub>	Hiperextensão de patas anteriores	RO	Roer
CCD	Coçar à direita	IMO	Imobilidade pós-ictal	SAC <sub>1</sub>	Sacudir a cabeça
CCE	Coçar à esquerda	LA	Lamber	SAC <sub>2</sub>	Sacudir o corpo
CG	Congelar	LCB	Lavar a cabeça	SAL	Salivação
CHP	Cheirar exploratório	LG	Limpeza de garra	SCR	Defecar
CM	Caminhar	LGD1	Limpar a garra anterior direita	SOB	Sobressalto
COR	Correr	LGD2	Limpar a garra posterior direita	SQ	Esquadrinhar
CVCg	Convulsão clônica generalizada	LGE1	Limpar a garra anterior esquerda	STN	Estendido
CVCp	Convulsão clônica parcial	LGE2	Limpar a garra posterior esquerda	TQ	Taquipnéia
CVC1	Conv. Cl. Sincrônicas pata anterior	LVF	Lavar o focinho		
CVC2	Conv. Cl. Sincrônicas pata posterior	MIO <sub>1</sub>	Mioclonia de patas anteriores		
CVT	Convulsão tônica-clônica	MIOc	Mioclonia de cabeça		
DCE	Dobramento corporal à esquerda	MAST	Mastigar		