

Janaina Iannicelli Torres

**Efeitos do uso recreacional da *Cannabis sativa*
sobre o remodelamento do miocárdio de
camundongos jovens**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestra em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2020

Janaina Iannicelli Torres

**Efeitos do uso recreacional da *Cannabis sativa*
sobre o remodelamento do miocárdio de
camundongos jovens**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestra em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Torres, Janaina Iannicelli

Efeitos do uso recreacional da Cannabis sativa sobre o remodelamento do miocárdio de camundongos jovens / Janaina Iannicelli Torres. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1.Cannabis sativa 2.Maconha
3.Coração 4.Fumo 5.Gestação 6.Miócitos cardíacos
7.Ecocardiograma

USP/FM/DBD-065/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Juverci Queiroz Torres e Rosa Mirtes Iannicelli Torres por me incentivarem na busca do conhecimento e, através dele, escolher o caminho a seguir.

Ao meu companheiro de vida, Gabriel do Espírito Santo Ribeiro, por todo amor e incentivo nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom da vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Mariana Matera Veras, pelo incentivo, compreensão, paciência e amizade. Minha profunda admiração e respeito.

À Prof^a Elia Caldini, pelo entusiasmo ao ensinar, me espelho em você.

Aos meus colegas do LIM 05, que tornaram essa jornada tão especial, leve, cheia de conhecimento e que jamais será esquecida. Em especial ao Victor, que foi um grande parceiro em todos os momentos.

Às minhas parceiras de exposição e da vida, Marlise e Sarah.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Poluição Atmosférica, em especial: Zilah, Dona Nilda, Nildo e Reginaldo, sempre tão disponíveis e carinhosos.

À querida e disponível Ivone, do LIM 16, que pacientemente dedicou seu tempo e imenso conhecimento nas padronizações de alguns protocolos.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao programa de Fisiopatologia Experimental.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À minha família, que sempre me incentivou a embarcar na busca pelos meus sonhos, eu não sei como seria a vida sem esse imenso amor.

Ao Gabriel, amor da minha vida e porto seguro.

NORMALIZAÇÃO

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviações e siglas	9
Lista de figuras	11
Lista de tabelas	13
Resumo	14
Abstract	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Cannabis sativa</i> (histórico)	20
2.2 Canabinóides e sistema endocanabinóide	22
2.3 <i>Cannabis sativa</i> durante a gestação e adolescência	23
2.4 Efeitos cardiovasculares da <i>Cannabis sativa</i>	25
2.5 Sistema endocanabinóide no sistema cardiovascular	27
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo geral	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. METODOLOGIA	30
5.1 Animais (grupos experimentais)	30
5.2 Delineamento experimental	30
5.3 Aparato para inalação de fumaça	31
5.4 Substância teste	32
5.5 Caracterização da presença de hidrocarbonetos na fumaça proveniente da queima	33
5.6 Caracterização da exposição – coleta de urina	34
5.7 Acompanhamento do desenvolvimento da gestação e prole	34
5.8 Avaliação ecocardiográfica	35
5.9 Coleta	35
5.10 Avaliação estereológica	36
5.10.1 Estimativa do volume individual dos ventrículos e do septo interventricular	36

5.10.2 Avaliação da densidade de volume de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e vasos	36
5.10.3 Avaliação do diâmetro e volume ponderado dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo	37
5.11 Picrosirius Red	38
5.12 Análise estatística	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Avaliação do nível de THC na amostra de <i>Cannabis sativa</i>	40
6.2 Avaliação dos níveis de hidrocarbonetos presentes na fumaça	40
6.3 Caracterização da exposição	41
6.4 Parâmetros reprodutivos	41
6.5 Desfechos pós-natais	42
6.5.1 Peso corporal	42
6.5.1.1 Fêmeas	42
6.5.1.2 Machos	44
6.5.2 Peso dos órgãos	47
6.5.3 Razão Peso coração/Peso corporal	49
6.6 Avaliação ecocardiográfica	50
6.6.1 Parâmetros ecocardiográficos	50
6.6.2 Espessura da parede posterior e do septo interventricular	53
6.6.3 Parâmetros funcionais	56
6.7 Análise estereológica do coração	57
6.7.1 Volume fracionário (%)	57
6.7.2 Volume absoluto (cm ³)	59
6.7.3 Volume médio dos cardiomiócitos (µm ³)	62
6.8 Análise picrosirius	62
7. DISCUSSÃO	64
8. CONCLUSÕES	72
9. REFERÊNCIAS	73
ANEXOS.....	81

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

2-AG: 2-araquidonilglicerol

AEA: anandamida

AF: ar filtrado

ANOVA: analysis of variance

AVC: acidente vascular cerebral

BaPE: índice benzo(a)pireno equivalente

CARDIA: desenvolvimento do risco da artéria coronária em adultos jovens

CB1: receptor canabinóide do tipo 1

CB2: receptor canabinóide do tipo 2

CBC: canabicromeno

CBD: canabidiol

CBE: canabielsoin

CBG: canabigerol

CBL: canabicitol

CBN: canabinol

CBND: canabinodiol

CBT: canabitriol

CEUA: Comissão de Ética do Uso de Animais

CO: monóxido de carbono

CS: *Cannabis sativa*

CV: coeficiente de variância

DG: dia gestacional

FC: frequência cardíaca

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GC-MS: cromatografia gasosa com detector de massa acoplado

H&E: hematoxilina-eosina

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da FMUSP

HIV: vírus de imunodeficiência humana

HPA: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LIM 05: Laboratório de Investigação Médica 05

LSD: least significant difference

MANOVA: multivariate analysis of variance
N: número de animais
ns: não significativo
PA: pressão arterial
PN: dia pós-natal
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
PSI: point sample intercept
QI: quociente de inteligência
SD: standard deviation (desvio padrão)
SE: standard error (erro padrão)
SEC: sistema endocanabinoide
SEP: septo intraventricular
SNC: sistema nervoso central
SPSS: Statistical Package for Social Sciences
THC: tetra-hidrocanabinol
THC-COOH: carboxi-tetra-hidrocanabinol
TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1
VD: ventrículo direito
VE: ventrículo esquerdo
VF: volume final
Vv: fração de volume
 Δ 8-THC: delta-8-tetra-hidrocanabinol
 Δ 9-THC: delta-9-tetra-hidrocanabinol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto geral das plantas de <i>Cannabis sativa</i>	20
Figura 2: Delineamento experimental e descrição dos grupos expostos e não expostos à <i>Cannabis sativa</i>	31
Figura 3: Representação esquemática do sistema de geração e exposição dos animais experimentais à fumaça da queima da <i>Cannabis sativa</i>	32
Figura 4: Preparação dos cigarros para queima da <i>Cannabis sativa</i>	33
Figura 5: Imagens representativas das fotos retiradas das lâminas para análise estereológica de densidade de volume	37
Figura 6: Curva de crescimento do 21 ^o ao 90 ^o dia de vida da prole de fêmeas nos diferentes grupos de exposição	43
Figura 7: Peso corporal das fêmeas (prole) nos diferentes grupos avaliados com 21, 30, 60 e 90 dias de idade	44
Figura 8: Curva de crescimento do 21 ^o ao 90 ^o dia de vida da prole de machos nos diferentes grupos de exposição	46
Figura 9: Peso corporal dos machos (prole) nos diferentes grupos avaliados com 21, 30, 50 e 90 dias de idade	47
Figura 10: Peso médio do coração, fígado, rim e cérebro das fêmeas adultas (90 dias) nos grupos avaliados	48
Figura 11: Peso médio do coração, fígado, rim e cérebro dos machos adultos (90 dias) nos grupos avaliados	49
Figura 12: Razão entre o peso do coração e o peso corporal	50
Figura 13: Gráfico de barras da espessura média do septo interventricular-SIV e da parede posterior do VE nos grupos avaliados em sístole e diástole.....	53
Figura 14: Gráfico de barras do diâmetro interno médio do VE em sístole (s) e diástole (d) nos grupos avaliados	54
Figura 15: Gráfico de barras do volume do VE em sístole e diástole e do volume sistólico nos grupos avaliados	55
Figura 16: Box-plot da massa do VE nos grupos avaliados	55
Figura 17: parâmetro funcionais do coração avaliados por ecocardiografia	56
Figura 18: Volume total do coração (cm ³) nos diferentes grupos avaliados	61

Figura 19: Volume médio dos cardiomiócitos (μm^3) nos diferentes grupos avaliados	62
Figura 20: Porcentagem de área marcada por picrossirius no coração dos diferentes grupos	63
Figura 21: Imagens representativas das fotos das lâminas coradas com picrossirius nos diferentes grupos	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais	31
Tabela 2: Concentração média dos HPAs presentes na fumaça proveniente da pirólise de 1 cigarro (200mg) de <i>Cannabis sativa</i>	40
Tabela 3: Desfechos gestacionais	41
Tabela 4: Peso corporal das fêmeas (prole)	42
Tabela 5: Peso corporal dos machos (prole)	45
Tabela 6: Médias, desvios padrão, coeficiente de variação (CV), valores máximo e mínimo para os parâmetros ecocardiográficos avaliados em modo M e modo B dos filhotes machos	51
Tabela 7: Volume fracionário (%) dos compartimentos do coração das fêmeas	57
Tabela 8: Volume fracionário (%) dos compartimentos do coração dos machos	58
Tabela 9: Volume absoluto do coração e seus compartimentos nas fêmeas	59
Tabela 10: Volume absoluto do coração e seus compartimentos nos machos	60

RESUMO

Torres IJ. *Efeitos do uso recreacional da Cannabis sativa sobre o remodelamento do miocárdio de camundongos jovens* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Cannabis sativa é a substância de abuso mais utilizada no mundo. Estudos evidenciam que a *Cannabis* afeta o desenvolvimento fetal causando comprometimento neurológico e restrições no crescimento. Os impactos relacionados ao seu uso na gestação, adolescência e início da fase adulta ainda permanecem desconhecidos no sistema cardiovascular. Neste estudo, desenvolvemos um modelo que mimetiza o uso real e avaliamos os efeitos da exposição recreacional à fumaça da *Cannabis sativa* durante o período gestacional e/ou pós-natal até o início da fase adulta sobre o remodelamento e função cardíaca e a interação entre os períodos de exposição. As exposições foram iniciadas no 5,5^o DG, período em que a implantação embrionária já está concluída. As gestantes foram expostas diariamente a partir do 5,5^o DG até o 17,5^o DG. Gestantes do grupo controle foram expostas apenas ao ar filtrado no mesmo sistema de exposição. A exposição pós-natal estendeu-se do 22^oDPN até o 90^oDPN. Parâmetros reprodutivos, função cardiovascular (ecocardiograma) e morfologia (estereologia) foram avaliadas nos 4 grupos [AF-AF (controle), AF-CS (exposição pós-natal), CS-AF (exposição pré-natal), CS-CS (exposição pré+pós-natal)]. Nós observamos que o ganho de peso materno foi menor e a prole das mães expostas apresentou peso reduzido ao nascer. A exposição pré e pós-natal foi determinante para a trajetória de crescimento da prole fêmea. Nos machos, a exposição pós-natal afetou a trajetória de ganho de peso. O peso do cérebro não foi afetado na prole fêmea das mães expostas, o peso do coração apresentou diminuição e o fígado apresentou um aumento no peso, desfechos influenciados pela interação entre as exposições. O peso do coração foi reduzido nos machos cujas mães foram expostas e houve interação entre os dois períodos de exposição. Machos e fêmeas apresentaram razão peso coração/peso corporal menor quando comparados ao grupo AF-AF, porém ao comparar com os outros grupos observamos influência de ambas as exposições como determinantes para este desfecho. As avaliações ecocardiográficas na prole de machos indicaram que o uso de maconha na vida adulta somado com o período intrauterino apresenta tendência de alterações que podem contribuir com um prejuízo futuro na função cardíaca. O volume e diâmetro do VE nos grupos expostos nos períodos pré e pós-natal reduziram quando comparados ao grupo controle. Fração de ejeção e fração de encurtamento estão aumentados comparados ao grupo controle (AF-AF). Volumes fracionários e proporção dos compartimentos não apresentaram diferenças entre os grupos. Nas fêmeas, as influências dos dois períodos de exposição são significativas para o volume total e absoluto do coração, o grupo exposto nos dois períodos (CS-CS) apresentou um volume médio de cardiomiócitos menor quando comparado ao grupo exposto pré-natal (CS-AF). Em relação às fibras de colágeno, apenas as proles de machos apresentaram uma área marcada maior comparada ao grupo controle (AF-AF) e ao grupo exposto nos dois períodos (CS-CS). Os resultados deste estudo poderão auxiliar na compreensão dos impactos da exposição pré e pós-natal no remodelamento e função cardíaca. Além disso, estas informações são fundamentais

para conscientizar cardiologistas, clínicos, legisladores e o público em geral sobre o potencial de efeitos adversos dessa substância.

Descritores: *Cannabis sativa*; Maconha; Coração; Fumo; Gestação; Miócitos cardíacos; Ecocardiograma.

ABSTRACT

Torres IJ. *Effects of recreational use of Cannabis sativa on myocardial remodeling in young mice* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Cannabis sativa is the most widely used psychotropic substance in the world. Studies show that *Cannabis* affects fetal development by causing neurological impairment and growth restrictions. The impacts related to its use during pregnancy, adolescence and early adulthood are still unknown in the cardiovascular system. In this study, we developed a model that mimics real use and evaluated the effects of recreational exposure to *Cannabis sativa* smoke during gestational and/or postnatal periods until early adulthood on cardiac remodeling and function and the interaction between the exposure periods. The exposure began at 5.5° GD, a period in which the embryonic implantation is already concluded. The pregnant females were exposed daily from the 5.5° GD to 17.5° GD. Control group were exposed only to filtered air in the same exposure system and conditions. Postnatal exposure extended from 22° PND to 90° PND. Reproductive outcomes, cardiovascular function (echocardiogram) and morphology (stereology) were assessed for all the 4 groups [AF-AF (control), AF-CS (postnatal exposure), CS-AF (prenatal exposure), and CS-CS (pre + postnatal exposure)]. We observed that maternal weight gain was lower and the offspring from smoking mothers presented reduced weight at birth. The prenatal and postnatal exposure was determinant for the growth trajectory of the female offspring. In males, postnatal exposure affected the trajectory of weight gain. Brain weight was not affected in the female offspring from smoking mothers, the weight of the heart decreased and the liver showed an increase in weight for males and females, these outcomes were influenced by the interaction between pre and postnatal exposure periods. The weight of the heart is reduced in males, whose mothers smoked cannabis and there was interaction between the two periods of exposure. Males and females had a lower heart/body weight ratio when compared to males and females from control group. However, when comparing with other groups we observed that both periods of exposure are determinant exposures for this outcome. Echocardiographic assessments in the offspring (only males) indicates that the use of marijuana in adulthood in combination with exposure during the intrauterine period, tend to show changes that may contribute to a future impairment in cardiac function. The volume and diameter of the LV in the groups exposed in the pre and postnatal period are reduced when compared to the control group. Ejection fraction and shortening fraction are increased compared to the control group (AF-AF). Fractional volumes and proportion of compartments did not differ between groups. In females, the influences of the two periods of exposure are significant for the total and absolute volume of the heart, the group exposed in the two periods (CS-CS) had a lower mean volume of cardiomyocytes when compared to group exposed only prenatally (CS-AF). Regarding collagen fibers, only the male offspring had increased positive fractional area compared to the control group (AF-AF) and to the group exposed in both periods (CS-CS). The results of this study may help to understand the impacts of prenatal and postnatal exposure on remodeling and cardiac function. In addition, these data are essential to raise awareness among

cardiologists, clinicians, legislators and the general public about the potential for adverse effects of this substance.

Descriptors: *Cannabis sativa*; Marijuana; Heart; Smoking; Pregnancy; Myocytes, cardiac; Echocardiogram.

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa*, conhecida popularmente como maconha, é a substância de abuso mais cultivada, traficada e utilizada no mundo. Entre 1998 e 2017 houve um aumento de 10% na prevalência global do uso dessa substância, sendo que nesta última década, o consumo entre as idades de 15-64 anos foi de aproximadamente 246 milhões de pessoas, cerca de 5% da população mundial (UNODC, 2015). No Brasil, um estudo desenvolvido pela Universidade Federal de São Paulo apontou que 4,3% dos adolescentes e 5,8% dos adultos brasileiros já usaram maconha alguma vez na vida (INPAD et al., 2013).

De acordo com o relatório mundial sobre uso de drogas, o Brasil é o país com o maior número de usuários de maconha recreacional no mundo (ONU, 2014). A Associação Brasileira de Estudo de Álcool e Outras Drogas, em 2012, identificou o Rio Grande do Sul como o estado com maior número de usuários. Cerca de 32% dos jovens gaúchos afirmaram já ter feito o uso da maconha acompanhada de outras drogas lícitas como o álcool e o tabaco (ABEAD, 2012; Jacobus et al., 2013).

Atualmente, nos EUA, 33 estados legalizaram a maconha para uso medicinal. Além disso, Canadá, Uruguai e 11 estados americanos legalizaram o uso da maconha para fim recreacional. Um estudo realizado por Schauer e colaboradores, em 2014, revelou que o uso recreativo predomina sob o uso medicinal. Entre os usuários recreacionais, há uma grande preocupação em relação às gestantes e adolescentes, pois essa é a substância ilícita mais consumida nestes grupos. (Tanasescu e Constantinescu, 2010; Morris et al., 2011; Hayatbakhsh et al., 2012; Behnke et al., 2013; Jaques et al., 2014).

As complicações cardiovasculares relacionadas ao uso de *Cannabis sativa* foram alarmantes na última década. A rede francesa de *Addict Vigilance* constatou que entre 2006 a 2010 cerca de 2% dos eventos relacionados ao consumo de *Cannabis sativa* foram de natureza cardiovascular e as taxas dessas complicações aumentaram de 1,1% para 3,6%, ocasionando a morte em 25% dos casos relatados.

Diante dos movimentos políticos acerca da legalização e descriminalização mundial, tem se observado uma diminuição da percepção sobre a segurança do seu consumo. Essas mudanças geram um novo mercado de produtos derivados aumentando o apelo entre usuários, pesquisadores, legisladores e a população em

geral (ONU, 2014; Greydanus et al., 2013). A necessidade de estudos que monitoram a percepção dos efeitos reais é absolutamente necessária a fim de orientar futuras decisões.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Cannabis sativa* (histórico)

Pertencente à família *Cannabaceae*, a *Cannabis sativa* é uma planta geralmente encontrada em regiões de clima tropical e temperado e que apresenta propriedades terapêuticas utilizadas há séculos, para diversos fins, dentre eles a amenização de sintomas como: náusea, vômitos, ansiedade e dor crônica. (Honório et al., 2006; Chen et al., 2012).

Morfologicamente, a *Cannabis sativa* apresenta folhas com um formato serrilhado, recortados em finos segmentos lineares e coloração verdes e verde-amarelas, com consistência enrugada. As folhas e flores da maconha são recobertas por pelos secretores, contendo uma glândula com grande concentração de substâncias como terpeno, fenol e canabinóides ativos (Guilherme et al., 2014).

Existem três espécies do gênero *Cannabis*: *C. sativa*, *C. ruderalis* e *C. indica*. A *C. sativa* é a mais cultivada e consumida devido a sua maior concentração de THC; a *C. ruderalis* não possui ingredientes psicoativos e a *C. indica* apresenta um baixo teor de ingredientes psicoativos. Nos últimos anos, as espécies cultivadas para uso recreacional apresentam concentrações de THC dez vezes maiores comparadas com as espécies selvagens. (Grant e Cahn, 2005).

A *C. sativa* é dióica (apresenta sexos separados). A planta feminina (figura 1a) mede aproximadamente 1,6 m e apresenta a maior concentração de canabinóides, enquanto as plantas do sexo masculino (figura 1b) têm uma altura média de 0,8 m (Faux et al., 2014; Bruci et al., 2012).

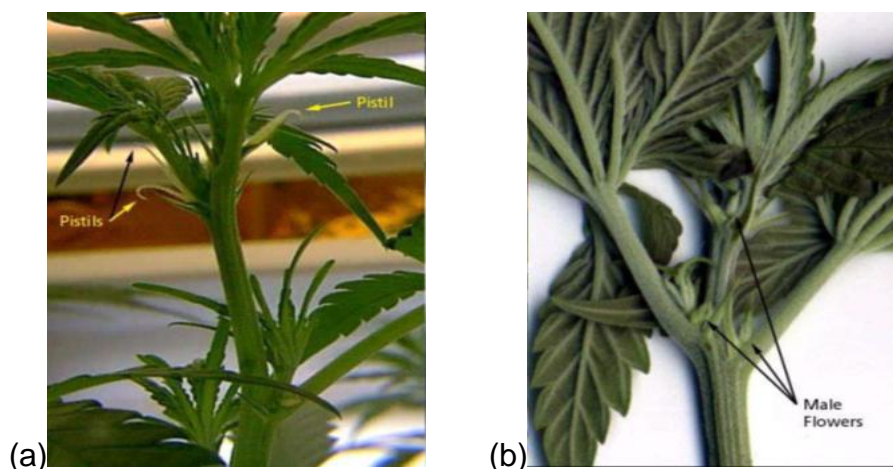


Figura 1: Aspecto geral das plantas de *Cannabis sativa* (maconha) (Faux et al., 2014). (a) Fotografia das plantas fêmeas. (b) Fotografia das plantas machos. Imagens reproduzidas com a permissão de Ed Rosenthal.

Após a polinização da planta feminina, a planta masculina morre e os canabinóides são extraídos das flores da planta fêmea. A concentração dos canabinóides pode ser influenciada por fatores genéticos e também por fatores ambientais, como: temperatura, clima, solo, umidade, tempo de cultivo, tratamento da amostra e tipo de secagem (Van Ornum, 2003; Honório et al., 2006; Raymundo e Souza, 2007).

Além de maconha, outros nomes são atribuídos a essa substância: *marijuana*, *haxixe*, *charas*, *bhang*, *ganja* e *sinsemilla*. A origem da *Cannabis sativa* não é bem estabelecida, acredita-se que foi uma das primeiras plantas cultivadas pelo homem na Ásia Central desde o período Neolítico (cerca de 6.000 a.C.). (Honório et al., 2006; Chen et al., 2012).

Os primeiros vestígios e evidências indicam que essa planta era cultivada para a obtenção de fibras (fabricação de tecidos, cordas, redes de pesca e papel), alimentação, extração do óleo das sementes (ainda hoje utilizada como óleo de cozinha no Nepal), droga alucinógena e rituais religiosos. Na Europa, seu cultivo era exclusivamente para a obtenção de fibras e somente no século XIX começou a ser difundida como substância medicinal descrita por Willian B. O'Shaughnessy, médico irlandês, e Jacques-Joseph Moreau, psiquiatra francês (Schultes et al., 1974; Li, 1974; Touw, 1981; Carlini, 2006).

No Brasil, segundo o documento oficial do Ministério das Relações Exteriores, relata-se que as sementes da planta foram trazidas ao país por escravos africanos em 1549. Com o passar dos anos, o uso não médico da planta foi disseminado entre os escravos e índios brasileiros, que passaram a cultivá-la para consumo próprio, com o apoio da Coroa Portuguesa que visava a produção de velas e cordas, comercialmente já conhecidas. Com isso, sua entrada foi facilitada em algumas cidades brasileiras como Santa Catarina (1747), Rio Grande de São Pedro (1762-1766) e Rio de Janeiro (1722). Como não havia controle sobre seu uso, o plantio foi marginalizado a classes menos favorecidas. (Pereira et al., 2018).

Em 1961, a Convenção Única de Drogas Narcóticas, proibiu o porte e consumo de *Cannabis sativa* no Brasil. Atualmente, há críticas quanto à lógica utilizada na época para classificação das substâncias psicoativas em lícitas e ilícitas, arbitrária e sem relação com o potencial destas substâncias em causar danos aos indivíduos que as consomem. (Pamplona e Takahashi, 2012).

Muitos dos efeitos positivos da utilização da maconha são amplamente divulgados e comprovados cientificamente, mas os seus efeitos negativos ainda permeiam os diálogos sobre sua legalização para fins terapêuticos e recreacionais. Mesmo em países que fazem uso de medicamentos derivados de componentes isolados da planta, embora ainda há receios quanto o uso da maconha *in natura* (Menezes, 2014).

2.2 Canabinóides e sistema endocanabinóide

Atualmente, mais de 750 componentes constituintes da maconha foram identificados, dos quais 104 são classificados como canabinóides, sendo os principais: cannabigerol (CBG), canabidiol (CBD), canabinol (CBN), canabicitrol (CBL), canabicromeno (CBC), canabielsoin (CBE), canabitriol (CBT), canabinodiol (CBND), Δ^8 -THC e Δ^9 -THC (Kalant, 2001; Sirikantaramas et al., 2005; Flores-Sanchez e Verpoorte, 2008; ElSohly e Gul, 2014)

Canabinóides são substâncias capazes de interagir com receptores canabinóides (CB1 e CB2), os quais são encontrados nas plantas de *Cannabis sativa* bem como no organismo humano, e que fazem parte do sistema endocanabinóide (SEC). Essas substâncias podem ser divididas em três tipos: fitocanabinóides (proveniente de vegetais), endocanabinóides (ligantes endógenos sintetizados pelo nosso organismo) e canabinóides sintéticos (Bordin et al., 2012; Howlett et al., 2002; Lambert e Fowler, 2005).

Em 1964, a identificação da estrutura química do Δ^9 -THC por Gaoni e Mechoulam intensificou o interesse social e científico pôr esse canabinóide, o que foi determinante para a descoberta dos receptores canabinóides CB1 e CB2. O Δ^9 -THC é o principal componente psicoativo que interage com o SEC através dos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) e receptores canabinóides do tipo 2 (CB2). O SEC consiste nos receptores CB-1 e CB-2, seus ligantes endógenos (endocanabinoides, anandamida (AEA) e 2-araquidonilglicerol (2-AG)) e as proteínas responsáveis pela síntese, recaptção e degradação. Endocanabinóides são mediadores reconhecidos como fundamentais em vários aspectos da fisiopatologia humana emergindo como algumas das moléculas de sinalização mais difundidas e versáteis já descobertas (Macarone et al., 2015; Mechoulam et al., 2005)

Além do principal componente psicoativo presente na maconha, o THC é considerado um agonista parcial capaz de induzir seus efeitos através da ligação com os receptores canabinóides provocando um estado de euforia, enquanto outras substâncias, como por exemplo o CBD, atua bloqueando e inibindo o senso de humor. (Mechoulam e Hanuš, 2000; Yamaori et al., 2010; Matos et al., 2017).

O receptor CB1 apesar de predominante no sistema nervoso central, também é expresso em órgãos e tecidos periféricos como: baço, amígdalas, fígado, pâncreas, glândulas adrenais, tecido adiposo e conjuntivo, órgãos reprodutivos, coração e vasos. O CB2 é expresso com mais frequência em células do sistema imune, células cardíacas e endoteliais. (Alger, 2013; André et al., 2016).

A síntese dos endocanabinóides ocorre nos neurônios pós-sinápticos pelo influxo de cálcio e a ação de enzimas fosfolipases que convertem os fosfolipídios em endocanabinóides. Estes ligam-se aos receptores canabinóides, onde passam a atuar como mensageiros em sistemas neurotransmissores como glutamatérgico e GABAérgico, e como moduladores da transmissão pós-sináptica dopaminérgico, serotoninérgico e colinérgico (Alger, 2002; Basavarajappa, 2007; Zogopoulos et al., 2013).

Os endocanabinóides também podem se ligar aos receptores TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid 1*), PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), GPR55 e GPR119. Apesar de não estar bem estabelecida a interação com esses receptores, estudos demonstram que o controle da circulação sanguínea, temperatura corporal, liberação de insulina e citocinas, densidade óssea, proliferação de células cancerígenas e motilidade gastrointestinal estão relacionados com a ação dos endocanabinóides e agonistas canabinóides nesses receptores e não apenas nos receptores CB1 e CB2 (Li et al., 2013; Huang et al., 2016; Ligresti et al., 2016).

Por sua capacidade de interação e ativação de diversas vias de sinalização celular, o SEC atua como agente terapêutico em diversos tratamentos importantes para o funcionamento normal do organismo. (Hasin et al., 2008; Ligresti et al., 2016).

2.3 *Cannabis sativa* durante a gestação e adolescência

O consumo de maconha durante a gestação dobrou de 2012 para 2016 nos EUA. Esse consumo está associado aos efeitos terapêuticos que amenizam

sintomas como: náusea, vômitos, ansiedade e dor crônica. Outros dados recentes indicam um aumento de episódios adversos à saúde em indivíduos que fazem uso frequente da maconha como: acidentes de automóvel, infecções por HIV, hepatite B, hepatite C, tuberculose e endocardite infecciosa. Além disso, há aumento na busca por internações em serviços de tratamento para usuários de substâncias abusivas.

A medida que o consumo de *Cannabis sativa* ganha uma ampla aceitação social e médica, é imprescindível compreender seus desfechos negativos na saúde de gestantes e de bebês expostos nos períodos pré e pós-natal. Os estudos que avaliam os impactos desse tipo de exposição na saúde dos indivíduos ainda são limitados. Resultados disponíveis são muitas vezes conflitantes, devido ao uso concomitante de maconha com outras substâncias ilícitas.

A maconha atravessa a barreira placentária e evidências indicam que o seu uso durante a gestação e lactação está associado a restrições no crescimento do feto e baixo peso ao nascer e pode afetar o desenvolvimento neurológico, especialmente quando a exposição ocorre em períodos críticos da organogênese e amadurecimento do cérebro, causando impactos neuropsiquiátricos, comportamentais e comprometimento nos processos de memorização, aprendizado e concentração (Jaques et al, 2014 ;Saurel-Cubizolles et al., 2014).

Benevenuto et al. (2016) mostrou que o uso da maconha durante a gestação, pode ser embriotóxico e fetotóxico, aumentando as falhas implantacionais e comprometendo o desenvolvimento fetal. De acordo com um estudo realizado através de auto-relato da *National Surveys of Drug Use and Health*, a proporção de mulheres que usaram maconha no período gestacional aumentou de 2,37%, em 2002, para 3,78% em 2014. Em 2016, outro estudo baseado em relatos e teste toxicológico para detecção de THC na urina foi de 7,1%, onde mais da metade das mulheres participantes foram identificadas apenas pelo teste de urina para detecção de THC.

Em uma revisão recente, os resultados dos efeitos do uso pré-natal e os desfechos na saúde mostraram aumento de anemia em usuárias que fizeram uso de *Cannabis sativa* e se abstiveram do uso de outras substâncias, além do aumento de chances de parto prematuro. Os resultados dos efeitos pré-natal e os desfechos na saúde dos neonatos com até 6 semanas de vida demonstraram baixo peso ao

nascer, diminuição significativa do comprimento do feto, diminuição da circunferência do crânio e restrição de crescimento intrauterino. Os desfechos pós-natais demonstraram comprometimentos neurossensoriais, diminuição da altura, baixo QI e desempenho escolar reduzido (Tennes et al., 1985).

O SEC desempenha um importante papel na implantação e manutenção da gestação. Os níveis de anandamida (AEA) devem estar sincronizados para a perfeita comunicação entre embrião e endométrio. Esse equilíbrio é necessário para a implantação. Estudos demonstram que os níveis plasmáticos de AEA, assim como a progesterona, estão diminuídos em mulheres que sofreram aborto, em relação a mulheres que tiveram uma gestação bem-sucedida. Evidências também sugerem que os receptores CB1 e CB2 são expressos no processo de diferenciação e remodelação (Correa et al., 2016).

Na adolescência, o SEC desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do córtex e do hipotálamo e promove o equilíbrio da interação do córtex pré-frontal com a amígdala e hipocampo, responsáveis pelas memórias afetivas e ansiedade. O córtex pré-frontal é a última região do cérebro que amadurece durante a adolescência e é uma região abundante em CB1, justificando os desfechos negativos da *Cannabis* nessa faixa etária.

Os endocanabinóides são fundamentais na regulação de distúrbio de excitação e inibição de neurônios, processo fundamental para o desenvolvimento cortical normal (Dow-Edwards e Silva, 2017; Morales et al., 2017; Meyer et al., 2017).

2.4 Efeitos cardiovasculares da *Cannabis sativa*

A prevalência e a segurança sobre o uso da maconha durante o período gestacional e adolescência vêm aumentando exponencialmente com a expansão da legalização. Entretanto, ainda são poucos os estudos sobre o desenvolvimento cardíaco e suas consequências na vida adulta. O uso recreativo de maconha vem sendo atribuído a diversos efeitos deletérios no sistema cardiovascular como o aumento da frequência cardíaca (FC), aumento da pressão arterial (PA), além da alteração dos níveis plasmáticos provocando hipotensão e episódios de desmaios. Outras disfunções relacionadas incluem: síndrome coronariana aguda, cardiomiopatias, fibrilação, assistolia, taquicardia ventricular, insuficiência cardíaca,

vaso espasmo e morte súbita. Esse consumo aumenta 4 vezes o risco de morte em usuários, além do risco de infarto em indivíduos com predisposição à doença coronariana. 185-200 (Lowe et al., 2007; Scott et al., 2018).

Tais efeitos dependem de diversos fatores de acordo com a composição da planta tal como: teor de THC, via de administração, fatores ambientais e fatores genéticos. A forma mais comum de uso da maconha recreacional é através do fumo, pois os efeitos psicoativos iniciam quase que instantaneamente.

Assim como a fumaça do tabaco, a fumaça da pirólise da *Cannabis* também libera produtos químicos como acetaldeído, amônia, benzeno, monóxido de carbono, cianeto de hidrogênio e hidrocarbonetos policíclicos. Além disso, a fumaça da maconha prejudica o fluxo da artéria femoral, tornando sua recuperação mais lenta e aumentando os níveis de carboxihemoglobina, resultando em uma menor capacidade de transporte de oxigênio, o que promove um ambiente suscetível ao desenvolvimento de isquemia e infarto do miocárdio. No entanto, a tolerância aos efeitos da maconha se desenvolve rapidamente e está associado a diminuição da FC, aumento do volume sanguíneo e à diminuição das respostas circulatórias, condizente com a atividade simpática e parassimpática reduzidas (Thomas et al., 2014).

Em um estudo conduzido por Scott et al. (2018), em indivíduos com idades entre 18 e 55 anos, foi observado que episódios de acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana, hipertensão e morte súbita foi significativamente maior em pacientes usuários de maconha. Ademais, uma recente revisão sobre os efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e periféricos adversos da maconha em humanos descreve associações temporais entre o uso de maconha e eventos adversos graves, incluindo infarto do miocárdio, morte cardíaca súbita, cardiomiopatia, acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório e arterite. (Thomas et al., 2014)

Porém, os autores ressaltam que os estudos disponíveis mostram sempre uma exposição concomitante à outras drogas (cigarro, álcool e cocaína) e, portanto, os achados devem ser avaliados com cautela. Além disto, destaca-se que pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nestes desfechos (Aryana e Williams, 2007; Ghuran e Nolan, 2000; Henry et al, 2003; Pratap e Korniyenko, 2012).

2.5 Sistema endocanabinóide no sistema cardiovascular

No sistema cardiovascular, receptores canabinóides estão localizados no miocárdio, células endoteliais, células do músculo liso e células circulantes. CB1 é predominante em células do SNC e periférico, como os neurônios vagais, que participam da modulação da função cardiovascular.

Os efeitos vasorelaxantes do SEC no sistema cardiovascular é mediado por diversas vias. Em camundongos, a ativação do CB1 produziu hipotensão prolongada e o THC provocou vasodilatação através da ativação do canal de ankyrina de tipo 1 (TRPA) do receptor transitório diminuindo o desempenho contrátil do miocárdio (Green et al., 2016; Montecucco e Di Marzo, 2012)

Estudos recentes demonstraram que a expressão do receptor CB2 expressos em células endoteliais, coronárias e células musculares lisas promovem o recrutamento de células do sistema imune envolvidas na cicatrização e controle da inflamação em lesões cardiovasculares, sugerindo que esse receptor pode desempenhar um papel cardioprotetor. A modulação de agonistas e antagonistas de CB2 são promissores em processos ateroscleróticos em modelos animais e no tratamento de diversas condições como infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (Hiley e Ford, 2004; Sharma et al, 2015; Singla et al., 2012; Steffens e Pacher, 2012).

A taquicardia induzida pelo uso de maconha, está associada ao aumento de carboxihemoglobina pela inalação de produtos da combustão, aumentando a demanda de oxigênio do miocárdio, diminuindo o suprimento de oxigênio. Avaliações ultrassonográficas mostraram que o consumo de maconha não altera o volume sistólico final, mas diminui o volume diastólico final, o índice de AVC e a fração de ejeção. Esses achados sugerem que os efeitos da maconha são cronotrópicos.

3. JUSTIFICATIVA

Diante dos movimentos acerca da legalização e descriminalização do uso medicinal e recreacional da maconha, o número de usuários é cada vez mais crescente no mundo. Portanto, estudos toxicológicos sobre a segurança dos efeitos durante o período gestacional e impactos na função cardiovascular são extremamente necessários. Assim, exploramos os efeitos cumulativos quando o indivíduo é exposto no período intrauterino e também na juventude. Nosso modelo tem o objetivo de mimetizar o uso humano. Essas informações são fundamentais para conscientizar cardiologistas, clínicos, legisladores e o público em geral sobre o potencial efeitos adversos dessa substância. A maconha utilizada é proveniente de um processo de apreensão realizado pela polícia e trata-se da mesma droga que pode ser obtida ilegalmente para consumo pessoal. A necessidade de estudos que monitoram a percepção dos efeitos reais é absolutamente necessária a fim de orientar futuras decisões.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição recreacional pré e pós-natal à fumaça da maconha sobre o remodelamento e função do coração em camundongos BALB/c.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os desfechos reprodutivos (número de filhotes na ninhada; razão sexual secundária; número de natimortos; duração da gestação em dias, ganho de peso e peso médio ao nascer)
- Avaliar funcional e geometricamente o coração com a utilização da técnica de ecocardiograma;
- Avaliar estereologicamente as estruturas macro e microscópicas do coração (volume dos compartimentos cardíacos do VE, volume dos componentes teciduais (miocárdio, tecido conjuntivo, vasos), quantificar o número de cardiomiócitos e determinar seu volume médio.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais (grupos experimentais)

Neste estudo, utilizamos camundongos fêmeas com 60 dias de vida pesando em média 22-25 g e machos com 90 dias de vida e peso médio de 22-25 g da linhagem BALB/c – CEUA/FMUSP 039/16. Durante o estudo, antes dos períodos de exposição, os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas dentro de estantes ventiladas. Permaneceram sob ciclo claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura controlada de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e com acesso a ração e a água *ad libitum*. Este projeto consiste na avaliação de dois períodos de exposição, um durante a vida pré-natal e outro na vida pós-natal, com acompanhamento até a idade de um jovem adulto, cerca de 90 dias de vida, e a interação entre eles. Para tanto, acasalamos fêmeas nulíparas com machos saudáveis, férteis e não expostos à maconha.

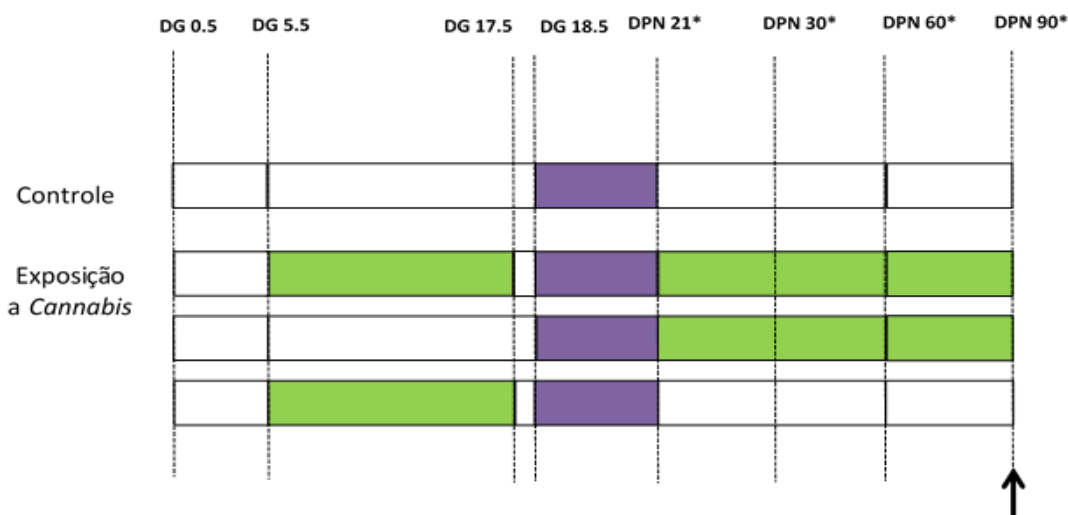
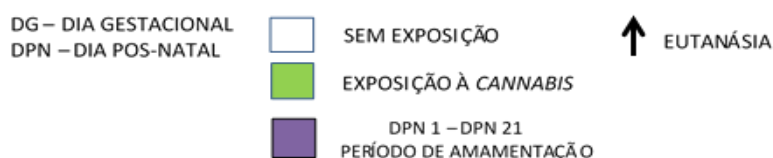
5.2 Delineamento experimental

As exposições foram iniciadas no 5,5^o dia gestacional (DG), neste período a implantação embrionária já está concluída e exposições anteriores a este período poderiam acarretar em índices elevados de perdas gestacionais.

O 0,5^o DG foi definido com base na visualização do plug ou pela presença de espermatozoides no lavado vaginal. Após o acasalamento, as fêmeas gestantes foram divididas aleatoriamente em dois grupos: controle (AF, n= 8 gestantes) e exposto à *Cannabis sativa* (CS, n= 8 gestantes). As exposições foram iniciadas no 5,5^o DG, período em que a implantação embrionária já está concluída. As gestantes foram expostas diariamente a partir do 5,5^o DG até o 17,5^o DG. Gestantes do grupo controle são expostas apenas ao ar filtrado no mesmo sistema de exposição. Após o término do período de exposição e nascimento da prole, as fêmeas foram mantidas individualmente com sua prole até o desmame, que ocorre no 21^o dia pós-natal (PN). Ao atingirem os 21 dias, os filhotes são separados de suas mães e os grupos experimentais são formados conforme demonstramos na tabela 1, com 5 animais por gênero (macho e fêmea), totalizando 10 animais por grupo de exposição. A exposição pós-natal estendeu-se do 22^o PN até o 90^o PN. O delineamento experimental está esquematizado na figura 2.

Tabela 1: Grupos experimentais

Grupos	Exposição pré-natal (5,5° GD – 17,5° GD)	Exposição pós-natal (22° PN – 90° PN)
AF- AF	Ar filtrado	Ar filtrado
AF-CS	Ar filtrado	<i>Cannabis sativa</i>
CS-AF	<i>Cannabis sativa</i>	Ar filtrado
CS-CS	<i>Cannabis sativa</i>	<i>Cannabis sativa</i>



*Realização dos exames ecocardiográficos

Figura 2: Delineamento experimental e descrição dos grupos expostos e não expostos à *Cannabis sativa*.

5.3 Aparato para Inalação de fumaça

A *Cannabis sativa* possui uma taxa de absorção maior (cerca de 90 - 95%) e mais lenta (cerca de 30 - 45 minutos) quando administrada via oral, em comparação com a via inalatória (cerca de 50%, entre 5 a 10 minutos). A fim de simular a forma popular de uso, ou seja, por via inalatória, um modelo de exposição já descrito previamente por Jardim et al. (2010) e Lichtman et al. (2001) foi adaptado e desenvolvido no LIM 05 – Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – HCFMUSP pela Dra. Mariana Matera Veras e pelo Engenheiro Marco Antonio G. Martins (Benevenuto et al., 2017). O equipamento consiste em uma câmara da

queima da substância, uma de mistura e uma de exposição, onde os animais são acondicionados individualmente para exposição por via inalatória (Figura 3).

Durante as exposições, cigarros previamente preparados com a substância foram colocados em um adaptador dentro da câmara de queima. As exposições foram controladas por tempo, fluxo de fumaça e a concentração de CO₂.

Com base no estudo piloto determinou-se que 5 minutos de exposição são suficientes para queima de 200 mg de *Cannabis sativa*. Todas as exposições foram conduzidas na capela de pressão negativa de ar, com a finalidade de que qualquer resíduo de fumaça produzida fosse totalmente exaurida para o ambiente externo.

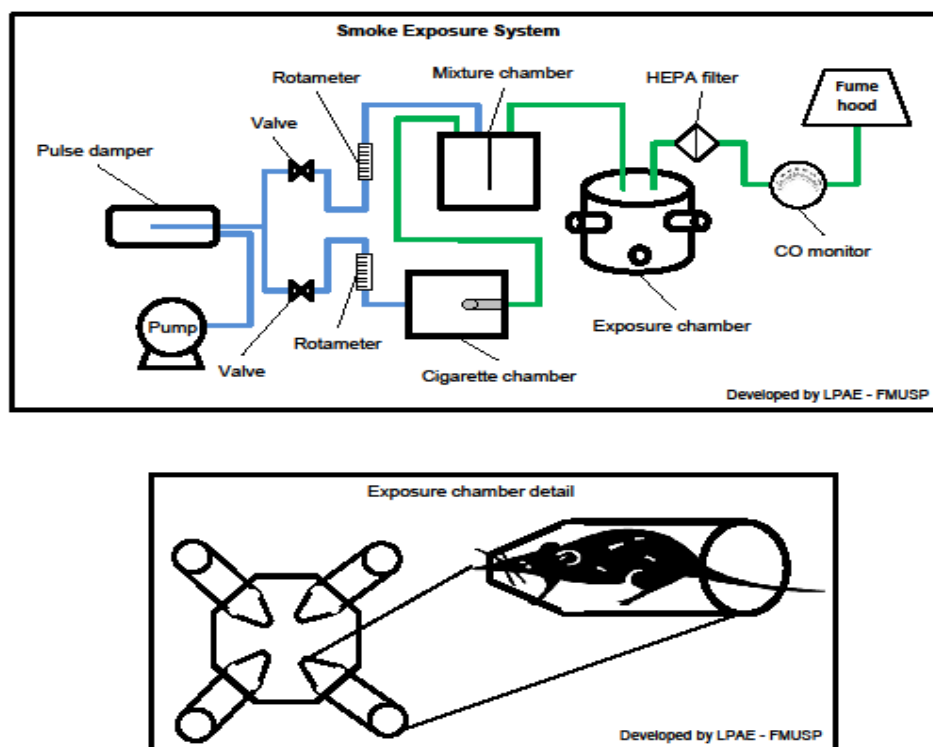


Figura 3: Representação esquemática do sistema de geração e exposição dos animais experimentais à fumaça da *Cannabis sativa* (Benevenuto et al., 2017).

5.4 Substância teste

A substância utilizada foi obtida através de solicitação oficial ao Delegado Seccional de Marília, autorizado pela 3ª Vara Criminal, Execuções Criminais – Corregedoria dos Presídios e da Polícia Judiciária – Poder Judiciário da Comarca de Marília- SP, sendo a liberação do material para o desenvolvimento exclusivo

deste estudo. O material foi apreendido de fonte única, compondo um único lote lacrado (Lacre nº 448187/08) pelo Núcleo de Perícias Médicas Legais do Instituto de Criminalística de Marília - São Paulo, contendo 1,0 Kg da substância “*in natura*”. A identificação e determinação da porcentagem de THC foi realizada pelo Laboratório de Toxicologia Analítica da Universidade de Campinas em colaboração com o Professor José Luis da Costa.



Figura 4: Preparação dos cigarros para queima da *Cannabis sativa*. Foto: Arquivo Pessoal /Janaina Iannicelli Torres.

5.5 Caracterização da presença de hidrocarbonetos na fumaça proveniente da queima

As análises de detecção de HPAs presentes na fumaça de *Cannabis sativa* provenientes do sistema de exposição foram conduzidas pela técnica de cromatografia gasosa com detector de massa acoplado (GC-MS). As amostras de fumaça foram coletadas em quatro tubos adsorventes XAD (Orbo 32 – Supelco). O método de extração da fumaça após ser coletada foi adaptado de Lee et al.; (2014). Os compostos orgânicos foram extraídos com 10 mL de diclorometano utilizando o banho de ultrassom (3 ciclos - 20 minutos). O solvente foi extraído, concentrado utilizando um evaporador rotativo e filtrado com uma membrana de filtro de seringa 33 mm (Millex).

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

em fluxo de 1,3 mL/min. A temperatura do injetor foi ajustada em 280°C, a linha de transferência para 300°C e a fonte de íons para 200°C. A curva de calibração foi preparada com base em soluções padrão (Sigma-Aldrich) e os coeficientes de correlação para todos os HPAs foram $R^2 > 0,99$.

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

5.6 Caracterização da exposição - coleta da urina

As fêmeas foram expostas do 5,5º DG até o 17,5º DG, por 5 minutos, diariamente. A exposição foi controlada com base na concentração de CO₂ monitorado em tempo real e a dose interna foi avaliada pela quantificação da presença de THC na urina, onde detectou-se o metabólito THC – COOH. A coleta da urina era realizada impreterivelmente 24 horas após a exposição à *Cannabis sativa*.

As dosagens dos metabólitos do THC na urina foram realizadas em parceria com o Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar do Instituto de Química – USP. Uma descrição detalhada da metodologia utilizada para detecção dos metabólitos do THC na urina pode ser encontrada em Benevenuto et al. 2017.

5.7 Acompanhamento do desenvolvimento da gestação e prole

As fêmeas gestantes foram pesadas individualmente a cada dois dias para o acompanhamento do ganho ou perda de peso e a prole foi pesada individualmente ao nascer, e semanalmente até os 90 dias de vida para a construção de uma curva de crescimento. Os seguintes desfechos gestacionais foram avaliados:

- número de filhotes na ninhada
- razão sexual secundária
- número de natimortos
- duração da gestação em dias

5.8 Avaliação ecocardiográfica

Os exames ecocardiográficos foram realizados com o auxílio de um sistema de imagem de ultrassom de alta frequência (Vevo 2100; Visual sonics, Toronto, Canadá), com transdutor de 40 MHz. A avaliação foi realizada no 91 dia de vida após a conclusão das exposições pós natais.

Durante o procedimento, os animais são anestesiados através de máscara com ISOFLURANE® a 1,5% em oxigênio e mantidos em mesa aquecida a 38°C com batimentos cardíacos e a temperatura constantemente monitorados. Os pelos da região torácica foram removidos com removedor químico de pelos (VEET® creme para peles sensíveis; Reckitt Benckiser). Para evitar o ressecamento das córneas, os olhos eram mantidos cobertos com compressa de soro fisiológico durante todo o procedimento. Os parâmetros estruturais cardíacos foram obtidos em imagens M-mode e B-mode (bidimensionais).

5.9 Coleta

Após a realização do último exame ecocardiográfico, aos 90 dias de vida, os animais foram eutanasiados para coleta do coração e demais órgãos para a avaliação estereológica e histopatológica.

A eutanásia foi conduzida por overdose de anestésico via inalatória ISOFLURANE®. Imediatamente após a verificação de parada cardíaca e confirmação do óbito através de estímulos, a cavidade abdominal foi seccionada e a coleta do sangue foi realizada através da punção da veia cava abdominal. Em seguida, realizamos a abertura da cavidade torácica para coleta do coração. Após a coleta, o coração foi pesado e seccionado em fatias, sendo uma fatia dos ventrículos selecionada aleatoriamente para congelamento a -80° C. As demais fatias foram fixadas por imersão em solução de formaldeído 4% por 24hs e transferidas para álcool 70%. Ao final da coleta, os corações foram processados rotineiramente para inclusão em parafina. A inclusão foi realizada de maneira que pudessem se obter cortes paralelos à face de corte das fatias, ou seja, transversais do coração. Com auxílio de um micrótomo rotativo, pares de cortes consecutivos e aleatórios com espessura de 5 µm foram obtidos e coletados e armazenados em lâminas silanizadas e lâminas comuns.

5.10 Avaliação estereológica

A estereologia é um método matemático bem estabelecido para definir propriedades físicas de estruturas tridimensionais irregulares a partir de secções bidimensionais obtidas por técnica de imagens físicas.

5.10.1 Estimativa do volume individual dos ventrículos e do septo intraventricular

As fatias produzidas foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Estes cortes foram corados com H&E (hematoxilina-eosina) e utilizados para estimarmos as frações de volume (V_v) dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) do septo intraventricular (SEP) pelo método de contagem de pontos.

Os cortes foram escaneados para obtenção de fotos de aumentos de 20 e 40 vezes utilizando o software *Pannoramic™ Viewer v. 1.15* desenvolvido pela 3DHISTEC LTDA. As imagens foram analisadas com o auxílio do software *Image J* (<http://rbs.info.nih.gov/ij>) no qual um sistema teste de pontos foi sobreposto à imagem e os pontos incidentes sobre cada região de interesse foram contados.

Este método permite obter uma estimativa do volume das estruturas. Os pontos incidentes sobre o VD, VE e SEP em todas as fatias foram somados e a fração de volume de cada compartimento foi obtida aplicando-se a seguinte fórmula:

$$V_v \text{ VE} = \frac{\sum \text{ptVE}}{\sum \text{pt totais}}$$

Onde $\sum \text{pt totais}$ refere-se à soma de todos os pontos incidentes sobre o VE, VD E SEP.

As frações de volume de cada compartimento foram convertidas em volume total multiplicando-se o V_v de cada compartimento pelo volume total dos ventrículos.

5.10.2 Avaliação da densidade de volume de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e vasos.

A densidade de volume V_v de cada compartimento (cardiomiócitos, tecido conjuntivo e vasos) foi estimada pelo método de contagem de pontos. Para isso, os cortes foram fotografados utilizando-se uma objetiva de médio aumento (20x) e sobre as imagens ($n=10$) foi aplicado um sistema teste de pontos. Os números de

pontos incidentes sobre os compartimentos de interesse foram contados e a fração de volume (V_v) determinada segundo a fórmula.

$$V_v \text{ VE} = \frac{\sum \text{pt Comp}}{\sum \text{pt VE}}$$

Onde $\sum \text{pt Comp}$ é a somatória de pontos incidentes sobre o miocárdio, tecido conjuntivo e vasos e $\sum \text{pt VE}$ é a soma de todos os pontos incidentes sobre o VE como um todo.

As densidades de volumes foram convertidas em volumes absolutos multiplicando-se pelo volume total do VE. Aproximadamente 20 campos selecionados randomicamente por bloco foram analisados. O programa Image J (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para a contagem e geração do sistema teste.

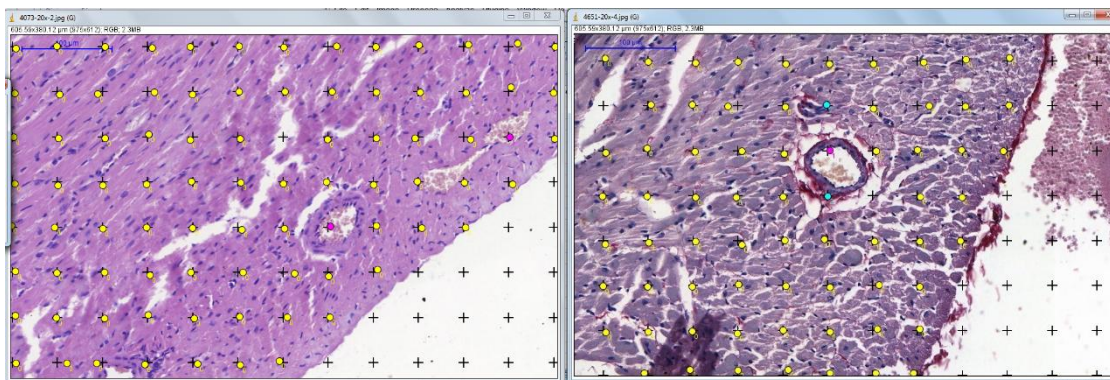


Figura 5: Imagens representativas das fotos retiradas das lâminas para análise estereológica da densidade de volume.

5.10.3 Avaliação do diâmetro e volume ponderado dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

A estimativa do diâmetro e do volume médio ponderado dos cardiomiócitos foi realizada utilizando-se as mesmas imagens obtidas para a análise da fração de volume de cardiomiócitos.

O volume médio ponderado dos cardiomiócitos foi obtido pelo método PSI (*point sample intercept*). Este método é realizado em duas etapas:

1) amostragem das partículas a serem medidas: é realizado aplicando-se um sistema teste de pontos e os cardiomiócitos sobre os quais um ponto incide são avaliados.

2) estimativa do volume de cada partícula: realizada medindo-se o comprimento de uma linha isotrópica que atravessa o ponto de amostragem que está dentro do transecto da partícula. O volume ponderado pode ser obtido aplicando-se a seguinte fórmula:

$$V_{ponN} = \left[\frac{\pi}{3 \cdot n} \right] \cdot \sum l^3$$

Onde o número de medidas realizada para esta mesma partícula, no caso um cardiomiócito, $\sum l^3$ é a somatória dos comprimentos medidos elevados a terceira potência.

O diâmetro do cardiomiócito foi avaliado de acordo com métodos morfométricos. Os cardiomiócitos que apareciam em corte transversal foram selecionados aleatoriamente e seu maior e menor diâmetro foram medidos diretamente. A média das duas medidas foi então considerada a medida dos cardiomiócitos.

5.11 Picrossirius Red

A análise histológica através da coloração de picrossirius red é um método comum que além de quantificar a deposição de colágeno no tecido cardíaco também pode diferenciar padrões morfológicos. A fibrose cardíaca é caracterizada por um acúmulo de proteínas da matriz extracelular, em especial o colágeno. É um processo que ocorre na morte celular cardíaca para garantir a integridade do coração. Outras condições estão associadas à deposição de colágeno: hipertensão, infarto agudo do miocárdio, diabetes do tipo I e II e obesidade. Uma resposta fibrótica exacerbada pode causar disfunção sistólica e diastólica e aumento de arritmias devido à alteração da sinalização intercelular, levando a um comprometimento da função cardíaca.

A coloração específica dos componentes da matriz extracelular é extremamente útil no estudo do remodelamento tecidual. Junqueira et al., desenvolveu o picrossirius red para estudo das redes de colágeno em diferentes tecidos. Sob a luz polarizada, os feixes de colágeno são demonstrados na coloração verde, vermelho ou amarelo e podem ser facilmente diferenciados do fundo preto, permitindo analisar morfometricamente a amostra.

A técnica de coloração picrossírius red, foi realizada da seguinte maneira: as lâminas foram dispostas em berços de coloração e desparafinizadas em xilol em dois banhos de dez minutos. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em soluções de etanol com concentrações decrescentes (100%, 96% e 70%), e lavadas em água corrente por dois minutos. O material foi imerso em coloração de picrossírius red a 0,1% por 60 minutos, posteriormente lavados em água corrente por 5 minutos. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 5 minutos e posteriormente lavadas com água corrente por 10 minutos. Após a contra-coloração as lâminas foram desidratadas com etanol na seguinte sequência (70%, 96% e 100%) por 3 minutos em cada cuba. A clarificação foi realizada em xilol e a montagem das lâminas foi feita em meio entellan.

A quantificação do colágeno intersticial foi determinada calculando-se a porcentagem de área marcada positivamente pela coloração picrossírius em relação à área total, analisando-se um total de 10 campos em um corte. O aumento utilizado foi de 20x. O programa Image J ([http:// rbs.info.nih.gov/ij](http://rbs.info.nih.gov/ij)) foi utilizado para a quantificação da porcentagem de área de colágeno intersticial.

5.12 Análise Estatística

Foi utilizado o software estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 17.0 para as análises estatísticas. Médias, erros padrões (SE) ou desvios padrões (SD) foram calculados para cada uma das variáveis consideradas. A comparação entre os parâmetros avaliados no estudo foi realizada com a aplicação dos testes: ANOVA para inspecionar a relação entre as variáveis dependentes (comparação entre os grupos) e MANOVA para inspecionar a presença de interação entre os fatores (exposição, idade e sexo). A hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do nível de THC na amostra de *Cannabis sativa*

Os níveis de THC nas amostras de *Cannabis sativa* utilizada neste estudo indicaram uma concentração de 0,03% (Benevenuto et al.; 2017).

6.2 Avaliação dos níveis de hidrocarbonetos presentes na fumaça

Foram coletadas 4 amostras durante o período de exposição, para medir a concentração e determinar a caracterização de HPAs na fumaça de *Cannabis sativa* do sistema de exposição. A tabela 2 apresenta os valores de concentração para cada tipo de HPA determinado em valores de média e desvio padrão (DP).

Tabela 2: Concentração média dos HPAs presentes na fumaça proveniente da pirólise de 1 cigarro (200mg) de *Cannabis sativa*.

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

Valores expressos em média ± desvio padrão. LD: limite de detecção.

*O volume de fumaça por cigarro foi de 1,0L.

Foi calculado o índice benzo(a)pireno equivalente (BaPE) para avaliar o risco à saúde devido à exposição aos HPAs carcinogênicos. O valor da BaPE foi de 1,26.

6.3 Caracterização da exposição

As amostras de urina provenientes das mães gestantes e da prole mostraram a presença do metabólito THC-COOH (carboxi THC), que é o principal biomarcador da exposição à *Cannabis sativa*.

6.4 Parâmetros reprodutivos

A avaliação dos desfechos reprodutivos em consequência da exposição das fêmeas gestantes está apresentada na tabela 3.

Tabela 3: Desfechos gestacionais.

	Grupo	N	Média	DP	EP	CV	P*	P**
Duração gestação (d)	Controle	7	18,71	2,81	1,06	15%	ns	ns
	Cannabis sativa	9	17,89	4,23	1,41	24%		
Número de filhotes	Controle	7	4,71	1,50	0,57	32%	0,045	0,071
	Cannabis sativa	10	6,70	2,63	0,83	39%		
Razão sexual secundária	Controle	6	1,67	0,52	0,21	31%	0,096	ns
	Cannabis sativa	5	1,15	0,54	0,24	47%		
Número de natimortos	Controle	7	0,86	1,86	0,70	218%	ns	ns
	Cannabis sativa	9	0,78	1,30	0,43	167%		
Ganho de peso na gestação (g)	Controle	7	13,90	4,06	1,54	29%	0,010	0,059
	Cannabis sativa	6	6,82	2,11	0,86	31%		
Peso médio ao nascer (g)	Controle	7	3,05	0,68	0,26	22%	ns	0,009
	Cannabis sativa	5	2,01	1,81	0,81	90%		

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; CV: coeficiente de variância; P: valor de P. *Teste estatístico Kruskal-Wallis; **Teste estatístico MANOVA

Os resultados mostram que a exposição à maconha durante a gestação promove um ganho de peso materno significativamente menor ($p=0,010$) e os neonatos apresentam peso reduzido ao nascer ($p=0,009$), embora o número de filhotes totais vivos na ninhada seja maior ($p=0,045$). Além disso, há uma tendência a nascerem mais filhotes machos ($p=0,096$).

6.5 Desfechos pós-natais

Os resultados a seguir referentes aos desfechos de peso na prole (peso corporal, peso dos órgãos e razão peso coração/peso corporal) serão apresentados separadamente para fêmeas e machos.

6.5.1 Peso Corporal

6.5.1.1 Fêmeas

A tabela 4 mostra o acompanhamento do peso corporal dos filhotes fêmeas e seus respectivos grupos do dia 21^o ao dia 90^o pós-natal.

Tabela 4: Peso corporal das fêmeas (prole).

Fêmeas	Grupo	N	Média	DP	EP	ANOVA	MANOVA Pré	MANOVA Pós	MANOVA Pré*Pós
Peso 21d	AF-AF	5	12,4	2,9	1,3	0,002	0,025	0,007	0,011
	CS-CS	6	11,6	1,1	0,5				
	AF-CS	5	9,0	0,4	0,2				
	CS-AF	6	11,1	1,6	0,6				
Peso 30d	AF-AF	5	15,9	1,7	0,8	0,002	ns	0,000	ns
	CS-CS	6	14,3	1,2	0,5				
	AF-CS	5	13,1	0,5	0,2				
	CS-AF	6	16,2	1,0	0,4				
Peso 40d	AF-AF	5	17,8	1,4	0,6	0,005	ns	0,001	ns
	CS-CS	6	16,0	1,1	0,4				
	AF-CS	5	15,8	0,8	0,4				
	CS-AF	6	17,7	0,6	0,3				
Peso 50d	AF-AF	5	19,3	1,4	0,6	0,002	ns	0,002	ns
	CS-CS	6	17,2	1,0	0,4				
	AF-CS	5	18,0	0,7	0,3				
	CS-AF	6	18,9	0,6	0,3				
Peso 60d	AF-AF	5	20,0	1,3	0,6	0,001	0,050	0,002	ns
	CS-CS	6	17,3	1,0	0,4				
	AF-CS	5	18,1	0,8	0,4				
	CS-AF	6	18,9	0,6	0,2				
Peso 70d	AF-AF	5	21,0	0,9	0,4	0,017	ns	0,013	ns
	CS-CS	6	18,6	1,4	0,6				
	AF-CS	5	18,9	0,7	0,3				
	CS-AF	6	19,4	1,4	0,6				
Peso 80d	AF-AF	5	22,3	0,9	0,4	0,001	0,024	0,004	ns
	CS-CS	6	19,5	0,9	0,4				
	AF-CS	5	19,8	0,7	0,3				
	CS-AF	6	20,4	1,4	0,6				
Peso 90d	AF-AF	5	21,9	1,2	0,5	0,001	0,050	0,001	ns
	CS-CS	6	18,9	0,9	0,4				
	AF-CS	5	19,3	0,9	0,4				
	CS-AF	6	20,5	1,2	0,5				

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ANOVA: valor de P para o teste ANOVA (diferença entre grupos); MANOVA: valor de P para o teste MANOVA (influência do tipo de exposição – pré-natal, pós-natal ou ambos).

AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Nas fêmeas, a avaliação do crescimento pelo acompanhamento de peso corporal mostrou que as exposições tanto no período pré-natal quanto no período pós-natal influenciam a trajetória de crescimento. De modo geral, as exposições determinam um menor peso corporal que se acentua aos 60 dias e permanece até aos 90 dias de idade (figura 6), sendo que a exposição pós-natal parece afetar mais o peso corporal das fêmeas. De fato, a análise da influência dos períodos de exposição (MANOVA) mostrou que o período pós-natal é o mais determinante para os desfechos observados (tabela 4).

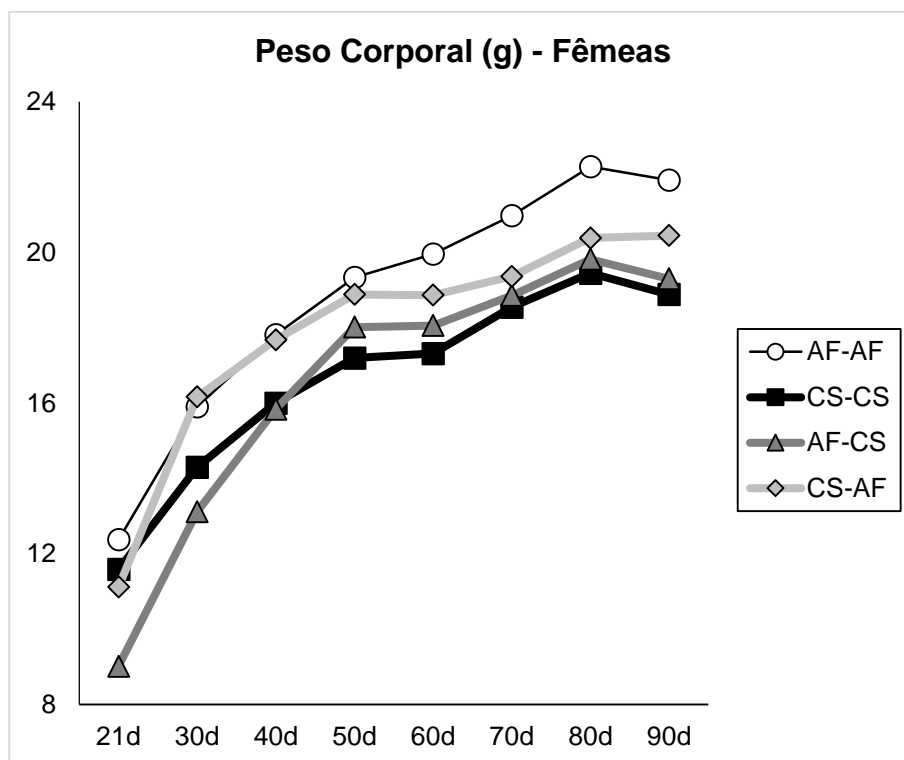


Figura 6: Curva de crescimento do 21º ao 90º dia de vida da prole de fêmeas nos diferentes grupos de exposição. Representação da média dos grupos. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Na figura 7 estão apresentados os pesos médios das fêmeas em cada grupo com 21, 30, 60 e 90 dias de idade. Aos 21 dias de vida as fêmeas do grupo AF-CS são as que apresentam maior redução no peso quando comparados ao grupo controle (AF-AF) ($p=0,001$) e aos demais grupos (CS-CS: $P=0,001$; CS-AF: $P=0,003$). Com 30 dias, as diferenças começam a se acentuar nos grupos AF-CS e CS-CS, indicando uma influência determinante da exposição pós-natal. O grupo AF-CS apresenta peso menor quando comparado aos grupos AF-AF ($p=0,002$) e CS-

AF ($p < 0,001$) e o grupo CS-CS apresenta peso menor quando comparado aos grupos AF-AF ($p = 0,038$) e CS-AF ($p = 0,014$). Com 60 dias, mesmo os animais expostos apenas no período pré-natal (CS-AF) não conseguem manter a mesma curva de crescimento do grupo AF-AF, que apresenta um peso maior do que os grupos CS-CS ($p < 0,001$) e AF-CS ($p = 0,005$) e uma tendência em relação ao grupo CS-AF ($p = 0,070$). Por fim, com 90 dias o grupo controle apresenta um peso maior em relação aos demais grupos (CS-CS: $p < 0,001$); AF-CS: $p = 0,001$; CS-AF: $p = 0,034$).

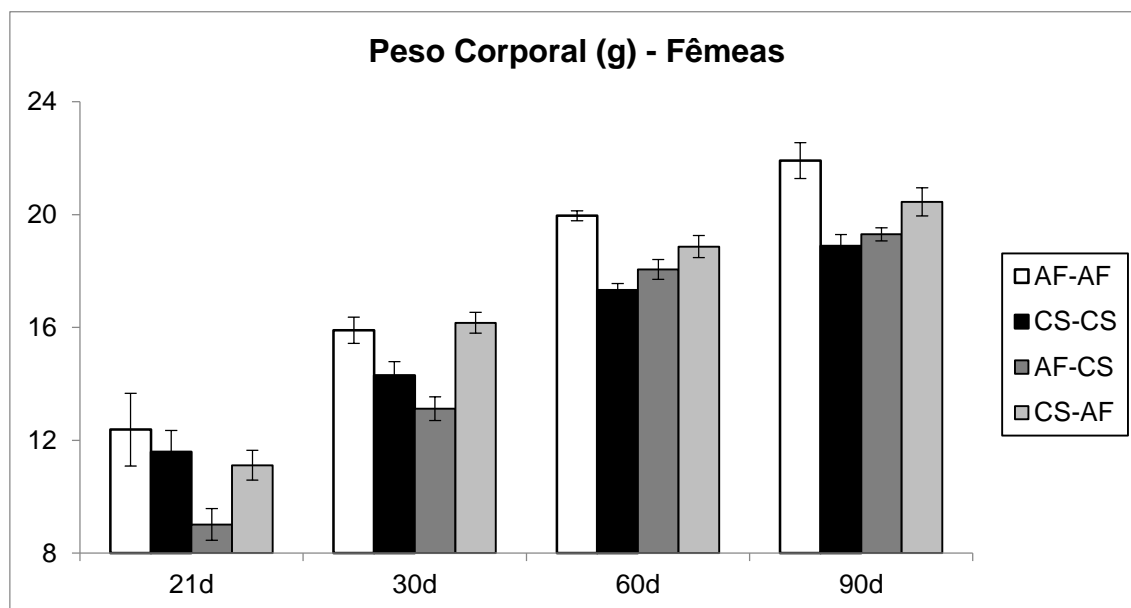


Figura 7: Peso corporal das fêmeas (prole) nos diferentes grupos avaliados com 21, 30, 60 e 90 dias de idade. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.5.1.2 Machos

A tabela 5 resume o acompanhamento do peso corporal dos filhotes machos e seus respectivos grupos do dia 21^o ao dia 90^o pós-natal.

Tabela 5: Peso corporal dos machos (prole).

Machos	Grupo	N	Média	DP	EP	ANOVA	MANOVA Pré	MANOVA Pós	MANOVA Pré*Pós
Peso 21d	AF-AF	5	12,6	3,8	1,7	Ns	ns	ns	0,074
	CS-CS	6	12,5	1,5	0,6				
	AF-CS	8	10,7	0,9	0,3				
	CS-AF	6	10,2	1,8	0,7				
Peso 30d	AF-AF	5	17,1	2,7	1,2	Ns	ns	ns	ns
	CS-CS	6	16,4	1,3	0,5				
	AF-CS	8	16,1	1,1	0,4				
	CS-AF	6	17,7	1,8	0,7				
Peso 40d	AF-AF	5	20,2	1,5	0,7	0,038	ns	ns	ns
	CS-CS	6	18,3	0,9	0,4				
	AF-CS	8	19,2	1,2	0,4				
	CS-AF	6	20,4	1,5	0,6				
Peso 50d	AF-AF	5	22,8	1,6	0,7	0,038	ns	ns	ns
	CS-CS	6	20,4	0,8	0,3				
	AF-CS	8	22,2	1,9	0,7				
	CS-AF	6	22,7	1,1	0,5				
Peso 60d	AF-AF	5	24,2	1,0	0,4	0,024	ns	ns	ns
	CS-CS	6	21,5	0,9	0,3				
	AF-CS	8	23,0	2,0	0,7				
	CS-AF	6	23,6	1,3	0,5				
Peso 70d	AF-AF	5	25,9	1,6	0,7	0,022	ns	0,038	ns
	CS-CS	6	22,4	1,0	0,4				
	AF-CS	8	23,7	2,0	0,7				
	CS-AF	6	24,7	2,1	0,9				
Peso 80d	AF-AF	5	26,8	1,1	0,5	Ns	ns	ns	ns
	CS-CS	6	24,8	0,8	0,3				
	AF-CS	8	25,5	2,3	0,8				
	CS-AF	6	26,7	1,2	0,5				
Peso 90d	AF-AF	5	26,5	0,9	0,4	0,002	ns	0,004	0,053
	CS-CS	5	24,1	1,0	0,5				
	AF-CS	8	25,4	2,2	0,8				
	CS-AF	6	27,2	0,6	0,2				

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ANOVA: valor de P para o teste ANOVA (diferença entre grupos); MANOVA: valor de P para o teste MANOVA (influência do tipo de exposição – pré-natal, pós-natal ou ambos).

AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Nos machos, de modo geral, pudemos observar que dependendo do período em que foram expostos e da combinação entre as exposições, a trajetória de ganho de peso é afetada. A exposição pós-natal parece afetar mais a redução de ganho de peso, os animais expostos à maconha após o nascimento (CS-CS e AF-CS) não atingem seu potencial de crescimento quando comparados ao grupo AF-AF principalmente a partir dos 50 dias de idade (figura 8). Porém, a análise da influência dos períodos de exposição (MANOVA) mostrou o período pós-natal como determinante para os desfechos observados apenas para as idades de 70 e 90 dias (tabela 5).

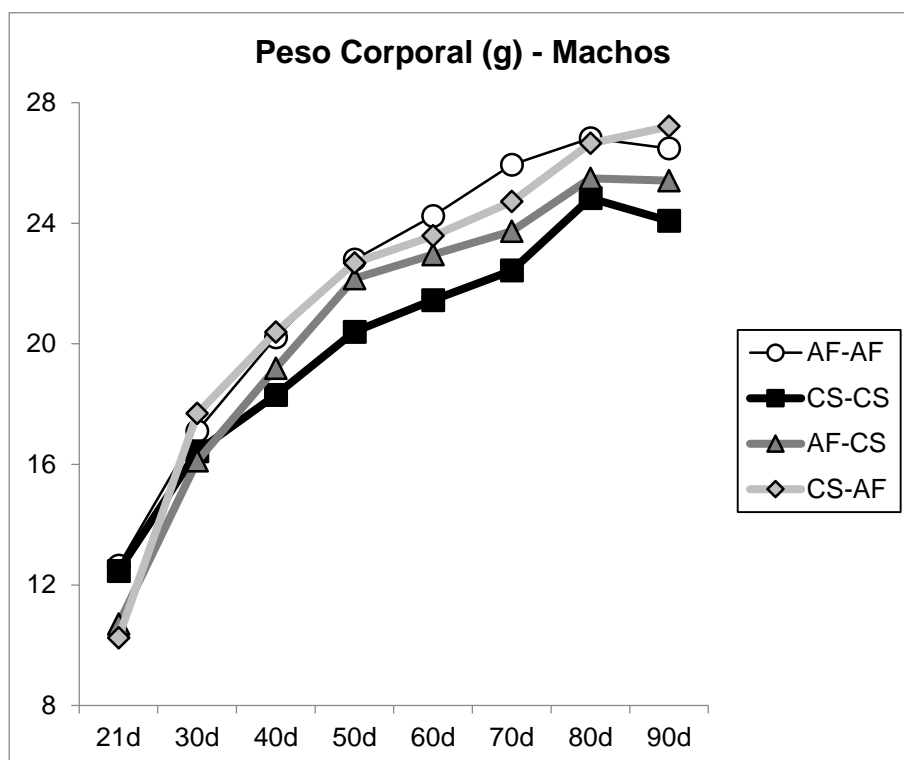


Figura 8: Curva de crescimento do 21^o ao 90^o dia de vida da prole de machos nos diferentes grupos de exposição. Representação da média dos grupos. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Na figura 9 estão apresentados os pesos médios dos machos em cada grupo com 21, 30, 50 e 90 dias de idade. Aos 21 dias o grupo exposto no período pré-natal (CS-AF) apresenta menor peso em relação ao grupo CS-CS ($p=0,021$) e uma tendência em relação ao grupo AF-AF ($p=0,053$). Aos 30 dias, não há diferenças entre os grupos, mostrando que houve uma recuperação de peso no grupo CS-AF. Com 50 dias o grupo CS-CS começou a apresentar um peso menor em relação aos demais grupos (AF-AF: $p=0,013$; AF-CS: $p=0,036$; CS-AF: $p=0,013$). Aos 90 dias, com o término do acompanhamento, o grupo CS-CS finalizou com um peso menor quando comparado aos demais grupos (AF-AF: $p=0,006$; AF-CS: $p=0,037$; CS-AF $<0,001$).

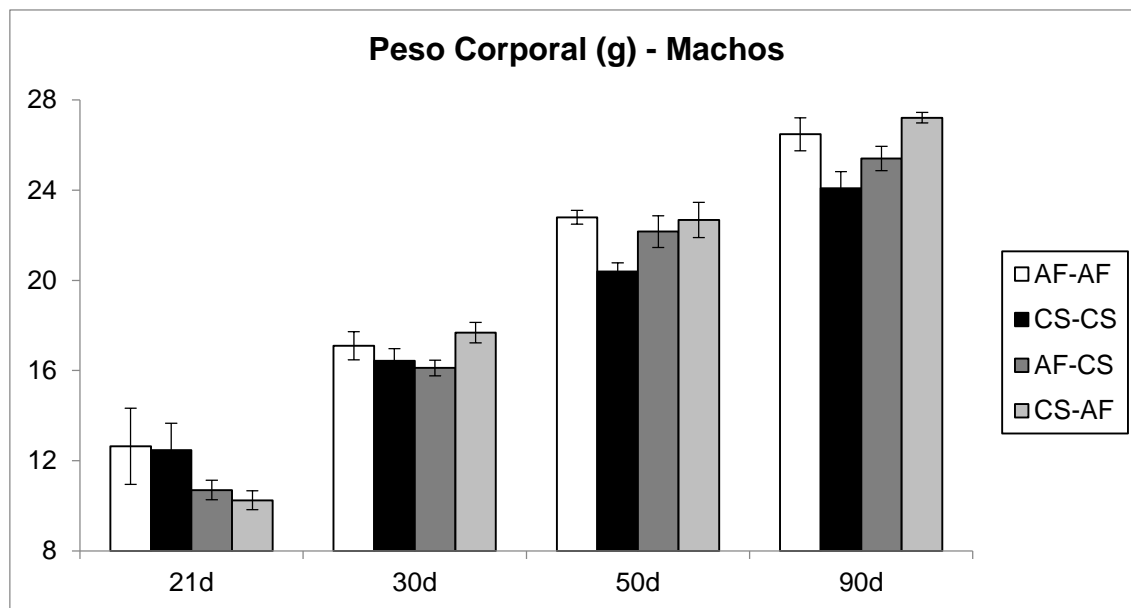


Figura 9: Peso corporal dos machos (prole) nos diferentes grupos avaliados com 21, 30, 50 e 90 dias de idade. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.5.2 Peso dos Órgãos

Nas fêmeas, o peso dos principais órgãos acompanha os resultados do peso corporal e estão apresentados na figura 10. Coração, fígado e rim apresentaram diferenças entre os grupos. Apenas o peso cerebral não foi afetado. No coração, o grupo CS-AF apresentou um peso menor comparado aos grupos AF-AF ($p=0,003$) e CS-CS ($p=0,006$), sendo a interação entre as exposições pré e pós-natal ($p=0,009$) determinante para os desfechos. No fígado, o grupo AF-AF apresentou um peso maior comparado aos demais grupos (CS-CS: $p<0,001$; AF-CS: $p=0,007$; CS-AF: $p=0,024$), desfechos influenciados pelas exposições pré-natal ($p=0,001$), pós-natal ($p=0,001$) e pré e pós-natal ($p=0,019$). No rim, as fêmeas do grupo AF-AF apresentaram peso maior em relação aos demais grupos (CS-CS: $p=0,002$; AF-CS: $p<0,001$; CS-AF: $p=0,005$) e os desfechos foram influenciados pela exposição pós-natal ($p=0,001$) e pela interação das exposições pré-natal e pós-natal ($p=0,009$).

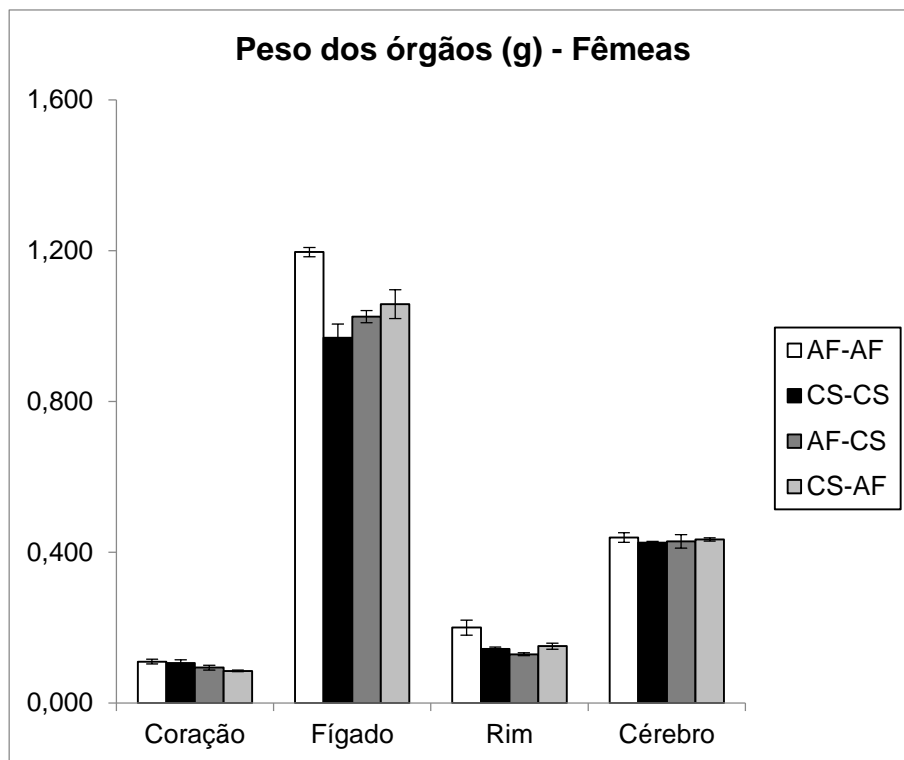


Figura 10: Peso médio do coração, fígado, rim e cérebro das fêmeas adultas (90 dias) nos grupos avaliados. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Nos machos apenas o peso do coração apresentou diferenças significativas. O peso do coração foi menor nos grupos AF-CS ($p=0,025$) e CS-AF ($p=0,042$) quando comparados ao grupo AF-AF e menor no grupo AF-CS quando comparado ao grupo CS-CS ($p=0,041$), sendo a interação entre as condições de exposição pré e pós-natal determinantes para este desfecho ($p=0,024$) (figura 11).

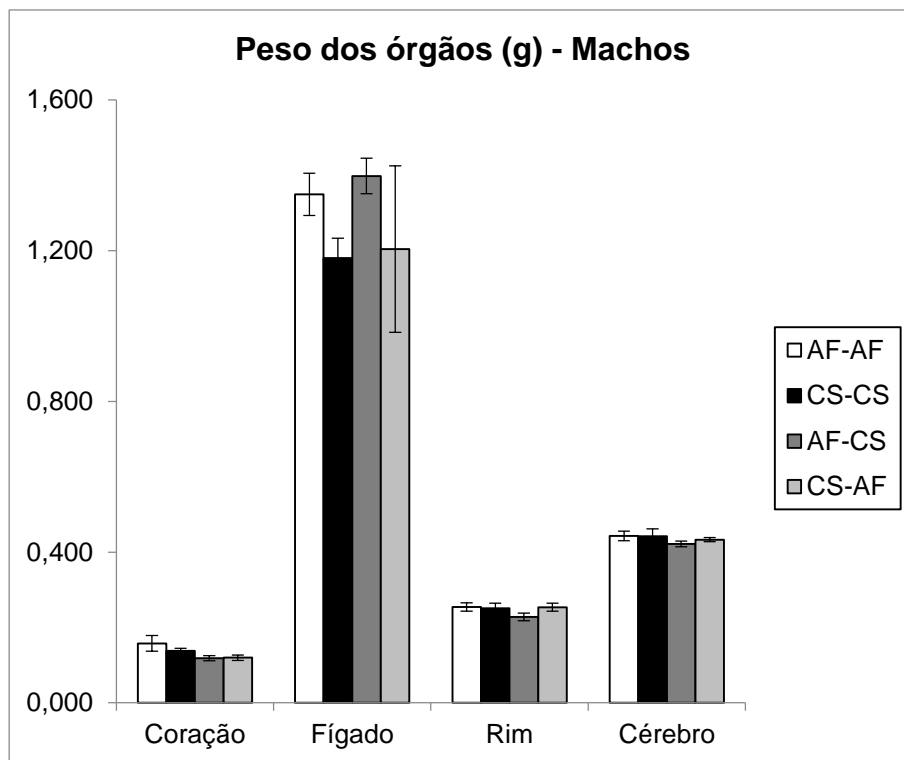


Figura 11: Peso médio do coração, fígado, rim e cérebro dos machos adultos (90 dias) nos grupos avaliados. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.5.3 Razão Peso Coração/Peso Corporal

Nas fêmeas, o grupo exposto durante o período pré-natal (CS-AF) apresentou uma razão menor quando comparado aos grupos controle (AF-AF) ($p=0,035$), ao grupo exposto no período pós-natal (AF-CS) ($p=0,048$) e ao grupo exposto em ambos os períodos (CS-CS) ($p=0,002$) (figura 12). Houve influência do fator exposição pós-natal ($p=0,048$) e da interação entre as exposições pré e pós-natal ($p=0,015$) nos desfechos avaliados.

Nos machos, semelhantemente às fêmeas, o grupo CS-AF apresentou uma razão menor quando comparado ao grupo AF-AF ($p=0,008$) e ao grupo CS-CS ($p=0,002$). Porém, diferentemente das fêmeas, o grupo AF-CS também apresentou uma razão menor quando comparado aos grupos AF-AF ($p=0,041$) e CS-CS ($p=0,010$) (figura 12). Houve influência da interação entre as exposições pré e pós-natal nos desfechos ($p=0,001$).

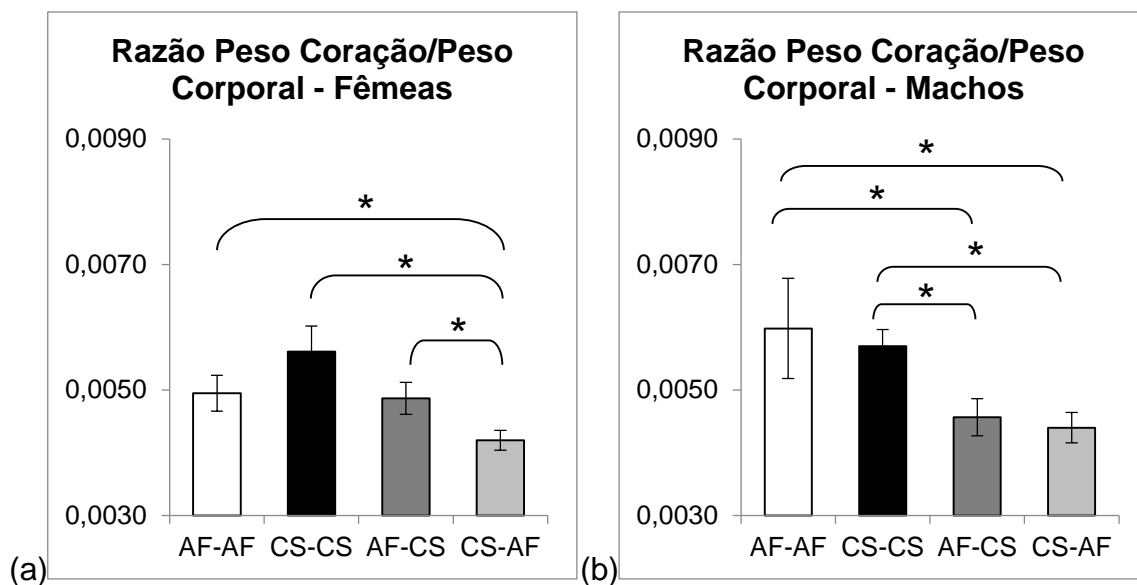


Figura 12: Razão entre o peso do coração e o peso corporal. (a) Fêmeas: *CS-AF x AF-AF ($p=0,035$); *CS-AF x CS-CS ($p=0,002$); *CS-AF x AF-CS ($p=0,048$). (b) Machos: *CS-AF x AF-AF ($p=0,008$); *CS-AF x CS-CS ($p=0,002$); *AF-CS x AF-AF ($p=0,041$); *AF-CS x CS-CS ($p=0,010$). Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. Teste estatístico realizado por ANOVA e pós-teste LSD. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.6 Avaliação Ecocardiográfica

6.6.1 Parâmetros ecocardiográficos

Os resultados do exame ecocardiográfico dos machos das proles aos 90 dias de vida, mostraram que o uso da maconha na vida adulta somado a exposição durante o período de vida intrauterino pode afetar a função e morfologia cardíaca.

Quando a exposição ocorre em apenas um dos períodos não há diferenças significativas nos parâmetros avaliados na idade adulta, entretanto alguns desfechos tendem a mostrar alterações e possivelmente um prejuízo futuro na função cardíaca.

Na tabela 6 estão apresentados os valores para os parâmetros analisados.

A análise da variância (ANOVA) entre os grupos não mostrou significância para a maioria dos desfechos, possivelmente devido ao número reduzido de animais e elevado coeficiente de variação.

Entretanto quando os grupos são avaliados dois a dois, comparando-se com o controle (AF-AF) observamos diferenças significativas em parâmetros

relacionados a função e morfologia do VE dependendo do período em que a exposição ocorreu, sendo no caso da combinação da exposição em ambos os períodos, pré e pós-natal, as alterações mais marcantes.

Os resultados (significância das diferenças) da comparação feita pelo teste T entre os grupos será apresentada nos gráficos a seguir.

Tabela 6: Médias, desvios padrão, coeficiente de variação (CV), valores máximo e mínimo para os parâmetros ecocardiográficos avaliados em modo M e modo B dos filhotes machos.

	Grupo	Média	DP	CV	Min	Max
Espessura do Septo Interventricular VE s (mm)	AF-AF	0.80	0.04	5%	0.76	0.84
	AF-CS	0.81	0.10	13%	0.66	0.91
	CS-AF	0.92	0.11	12%	0.81	1.09
	CS-CS	0.83	0.08	9%	0.75	0.92
Espessura do Septo Interventricular VE d (mm)	AF-AF	1.24	0.11	8%	1.14	1.39
	AF-CS	1.19	0.17	15%	0.93	1.37
	CS-AF	1.39	0.15	11%	1.14	1.54
	CS-CS	1.24	0.18	15%	1.06	1.54
Diâmetro interno do VE d (mm)	AF-AF	4.00	0.18	4%	3.74	4.19
	AF-CS	4.03	0.26	6%	3.76	4.35
	CS-AF	3.89	0.45	11%	3.19	4.29
	CS-CS	3.62	0.31	8%	3.23	4.06
Diâmetro interno do VE s (mm)	AF-AF	2.84	0.12	4%	2.68	3.01
	AF-CS	2.84	0.46	16%	2.34	3.38
	CS-AF	2.65	0.46	17%	2.06	3.14
	CS-CS	2.40	0.22	9%	2.20	2.65
Espessura da parede posterior do VE d (mm)	AF-AF	0.84	0.13	16%	0.77	1.08
	AF-CS	0.78	0.06	8%	0.68	0.84
	CS-AF	0.90	0.12	14%	0.79	1.10
	CS-CS	0.82	0.06	7%	0.75	0.89
Espessura da parede posterior do VE s (mm)	AF-AF	1.22	0.20	17%	1.01	1.54
	AF-CS	1.02	0.12	12%	0.82	1.14
	CS-AF	1.27	0.17	13%	1.11	1.52
	CS-CS	1.11	0.10	9%	1.02	1.23
Fração de Ejeção (%)	AF-AF	55.98	4.59	8%	49.97	61.49
	AF-CS	56.89	12.49	22%	37.36	68.58
	CS-AF	60.58	7.03	12%	51.57	66.35
	CS-CS	63.14	4.17	7%	57.64	68.23
FunçãoSistólica (%)	AF-AF	28.87	3.07	11%	24.84	32.54

	AF-CS	29.91	7.96	27%	17.77	37.69
	CS-AF	31.99	4.62	14%	26.10	36.06
	CS-CS	33.55	3.02	9%	29.74	37.21
Massa do VE (mg)	AF-AF	97.19	17.59	18%	79.93	126.03
	AF-CS	95.36	17.15	18%	78.04	114.82
	CS-AF	109.34	34.90	32%	74.12	160.24
	CS-CS	82.67	9.59	12%	73.43	96.09
Volume do VE d (uL)	AF-AF	69.96	7.31	10%	59.64	78.23
	AF-CS	71.72	10.91	15%	60.36	85.44
	CS-AF	66.33	16.98	26%	40.72	82.51
	CS-CS	55.64	11.34	20%	41.85	72.42
Volume do VE s (uL)	AF-AF	30.65	3.16	10%	26.58	35.19
	AF-CS	31.57	11.96	38%	18.97	46.89
	CS-AF	26.93	10.96	41%	13.70	39.03
	CS-CS	20.49	4.71	23%	16.20	25.85
Volume sistólico (uL)	AF-AF	39.30	6.22	16%	29.80	46.41
	AF-CS	40.15	7.32	18%	27.97	47.62
	CS-AF	39.39	7.32	19%	27.02	44.94
	CS-CS	35.15	7.57	22%	25.25	46.57
Cardiac Output (ml/min)	AF-AF	14.53	2.68	18%	11.28	17.00
	AF-CS	14.55	3.36	23%	8.72	16.73
	CS-AF	15.79	3.07	19%	10.89	18.98
	CS-CS	12.61	2.92	23%	9.40	17.23
FreqCardíaca (bpm)	AF-AF	367.56	39.92	11%	324.50	420.99
	AF-CS	359.17	30.54	9%	311.69	388.14
	CS-AF	400.51	13.56	3%	388.14	422.29
	CS-CS	358.81	21.45	6%	332.92	380.35
Alteração na fração de área (%)	AF-AF	41.44	5.21	13%	34.04	48.77
	AF-CS	47.33	6.24	13%	36.87	52.24
	CS-AF	49.05	6.68	14%	44.28	60.69
	CS-CS	44.32	3.10	7%	40.76	47.83
Fração de encurtamento (%)	AF-AF	8.77	4.09	47%	34.04	48.77
	AF-CS	13.77	4.8	35%	36.87	52,24
	CS-AF	13.74	6.64	48%	44.28	60.69
	CS-CS	16.68	3.03	18%	40.76	47.83
Peso coração (g)	AF-AF	0.158	0.047	30%	0.130	0.240
	AF-CS	0.116	0.019	17%	0.090	0.140
	CS-AF	0.121	0.018	15%	0.090	0.140
	CS-CS	0.134	0.017	13%	0.120	0.160

AF-AF: nunca expostos à maconha; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal; CS-CS: expostos à maconha em ambos os períodos.

6.6.2 Espessura da parede posterior e do septo interventricular

Os animais que foram expostos apenas no período pré-natal (CS-AF) apresentam um espessamento do septo interventricular (Figura 13) quando comparados ao grupo controle AF-AF. Quanto a espessura da parede posterior do VE não houve diferenças entre os grupos.

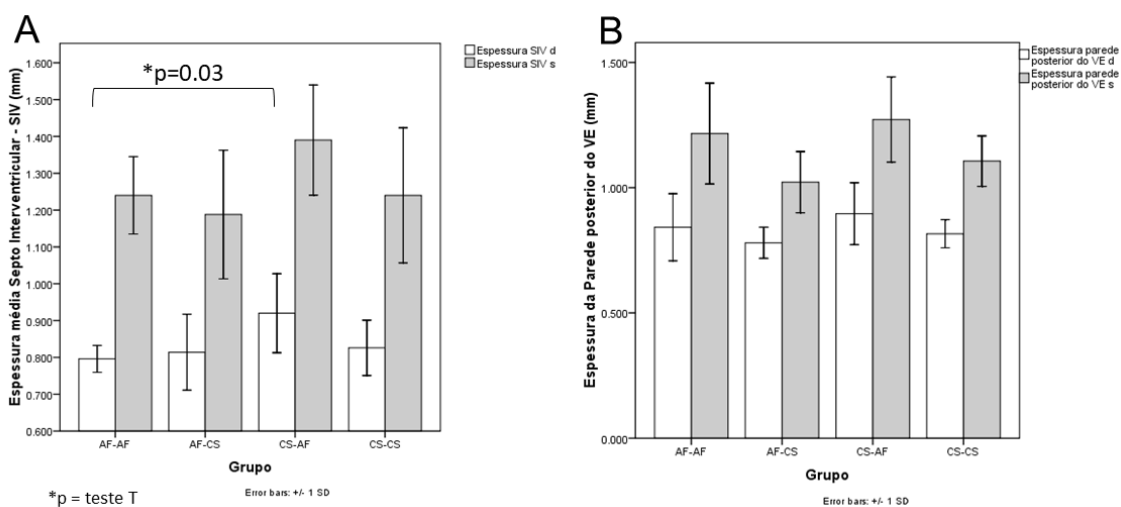


Figura 13: Gráfico de barras da espessura média do septo interventricular-SIV(A) e da parede posterior do VE (B) nos grupos avaliados em sístole (s) e diástole (d). AF-AF: nunca expostos à maconha; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal; CS-CS: expostos à maconha em ambos os períodos.

Quando os animais sofrem exposição a maconha nos dois períodos de vida (pré-natal e pós-natal) verificou-se que há uma diminuição do diâmetro interno do VE em sístole e diástole quando comparado aos animais controle (AF- AF) (Figura 14)

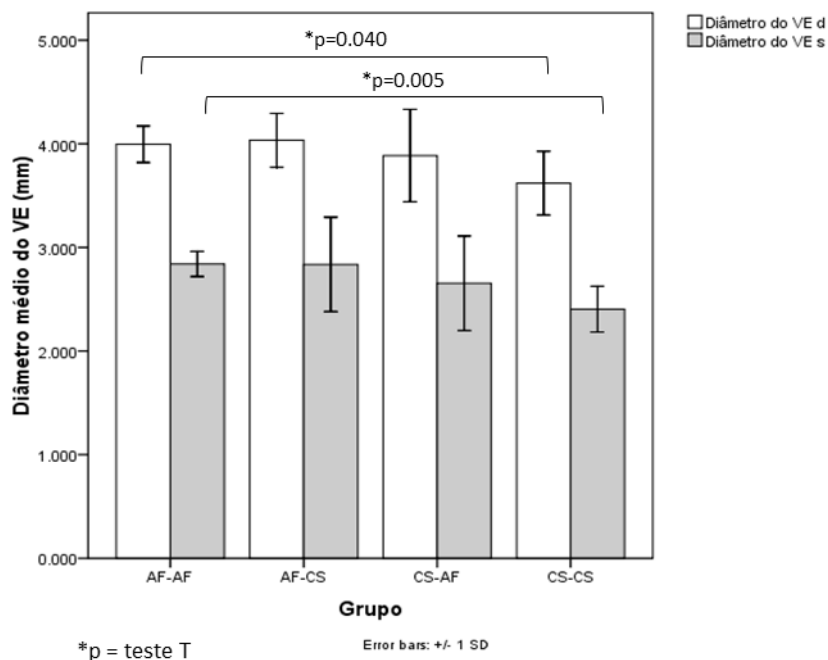


Figura 14: Gráfico de Barras do diâmetro interno médio do VE em sístole (s) e diástole (d) nos grupos avaliados. AF-AF: nunca expostos à maconha; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal; CS-CS: expostos à maconha em ambos os períodos.

O volume do VE em sístole e diástole apresentam uma redução significativa no grupo CS-CS quando comparado ao grupo controle (AF-AF) e não há diferença significativa no volume sistólico embora este esteja reduzido no grupo CS-CS (Figura 15).

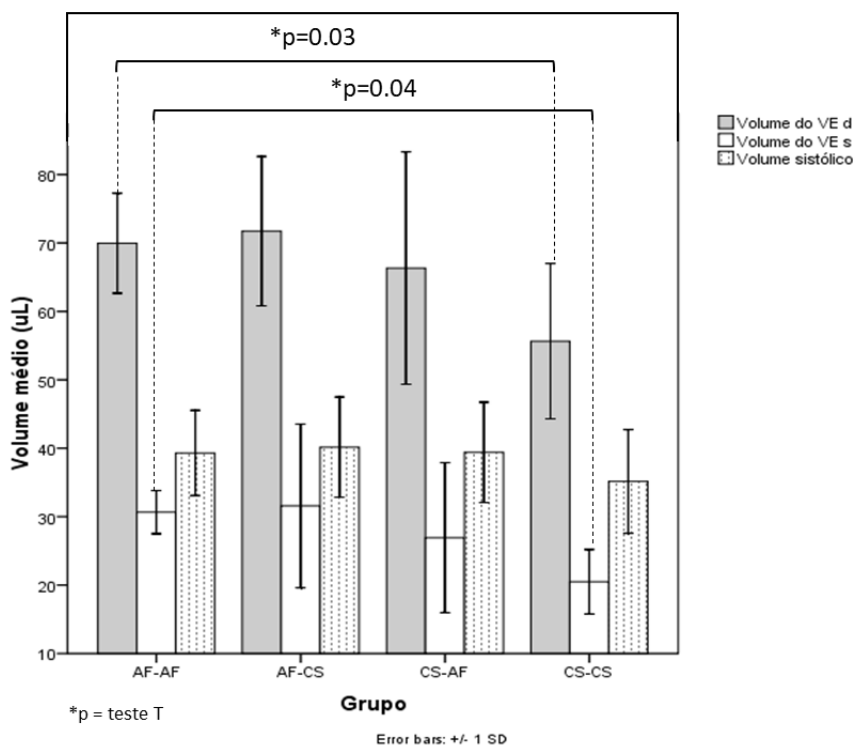


Figura 15: Gráfico de barras do volume do VE em sístole e diástole e do volume sistólico nos grupos avaliados. AF-AF: nunca expostos à maconha; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal; CS-CS: expostos à maconha em ambos os períodos.

Apesar da alteração na espessura septo interventricular e volume do VE não houve alterações na massa do VE (Figura 16) estimada de acordo com o proposto por Penn.

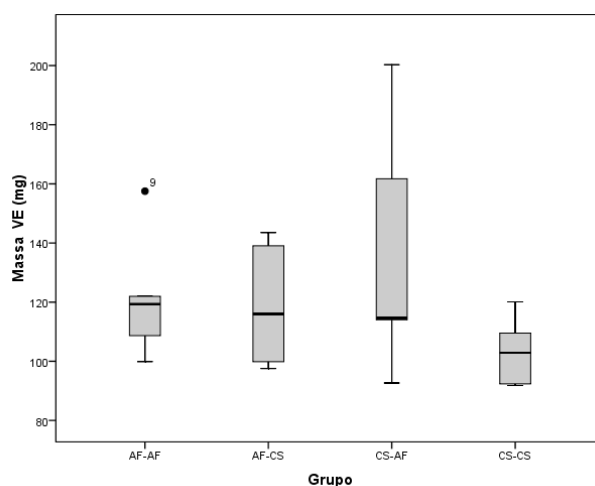


Figura 16: Box-plot da massa do VE nos grupos avaliados. AF-AF, nunca exposto a maconha; AF-CS, exposto a maconha no período pós-natal; CS-AF, expostos a maconha apenas no período pré-natal e CS-CS, expostos em ambos os períodos pré e pós-natal.

6.6.3 Parâmetros funcionais

O débito cardíaco está diminuído no grupo onde a exposição à maconha ocorreu nos dois períodos (CS-CS), entretanto a diferença não atingiu significância estatística ($p=0.07$).

Já a fração de ejeção, a fração de encurtamento, a função sistólica e a variação na fração de área mostraram-se aumentadas no grupo CS-CS quando comparado ao grupo controle (AF-AF) (Figura 17).

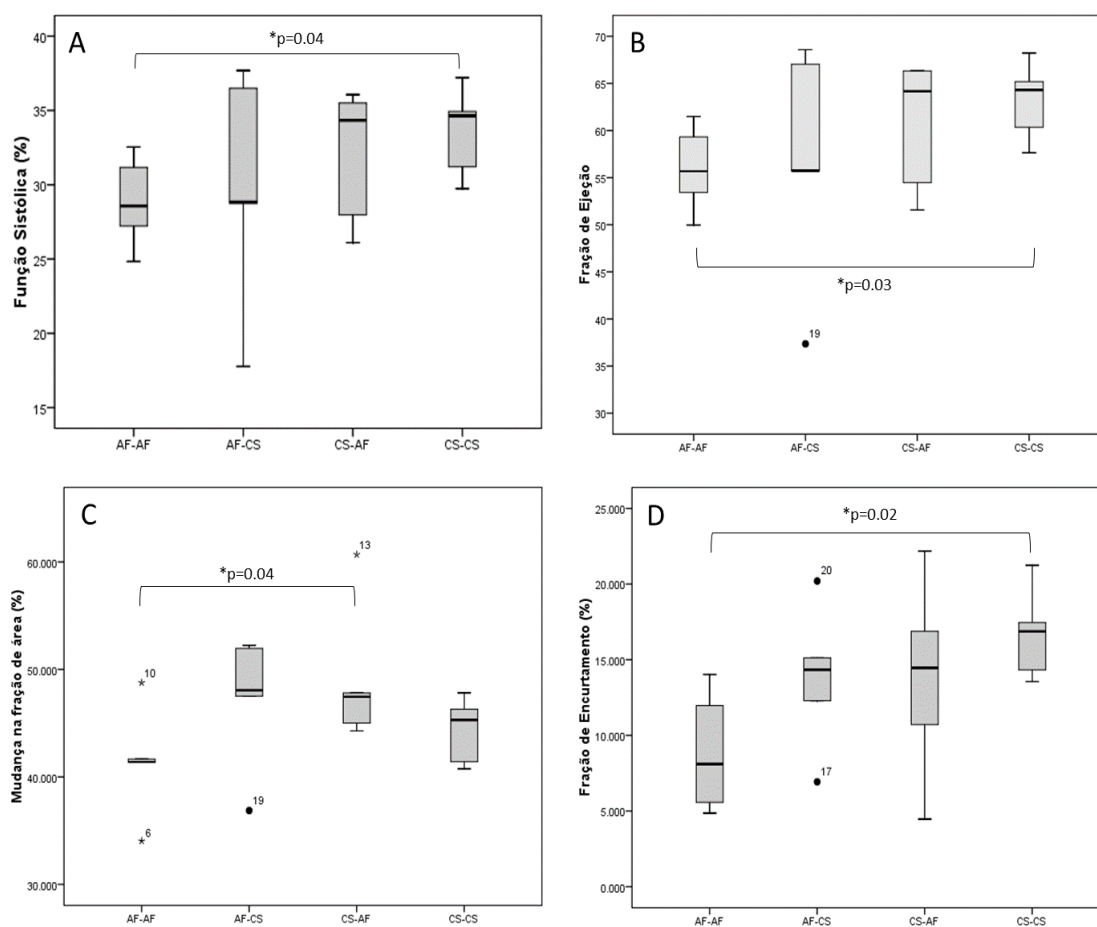


Figura 17: Parâmetros funcionais do coração avaliados por ecocardiografia. (A) Função sistólica, (b), Fração de Ejeção, (C) Variação na fração de área e (D) Fração de encurtamento. AF-AF, nunca exposto a maconha; AF-CS, exposto a maconha no período pós-natal; CS-AF, expostos a maconha apenas no período pré-natal e CS-CS, expostos em ambos os períodos pré e pós-natal.

6.7 Análise estereológica do coração

6.7.1 Volume Fracionais (%)

Os volumes fracionais dos compartimentos do coração (cardiomiócitos, vasos e tecido conjuntivo) não apresentaram diferenças entre os grupos. A análise estereológica mostrou que não houve alterações na proporção dos compartimentos do coração em decorrência da exposição à *Cannabis sativa* tanto na prole de fêmeas (tabela 7) quanto na prole de machos (tabela 8).

Tabela 7: Volume fracionário (%) dos compartimentos do coração das fêmeas.

Fêmeas	Grupo	N	Média	DP	EP	ANOVA	MANOVA Pré	MANOVA Pós	MANOVA Pré*Pós
% Volume Cardiomiócitos	AF-AF	4	0,955	0,055	0,028	ns	ns	ns	ns
	CS-CS	7	0,969	0,020	0,008				
	AF-CS	6	0,944	0,038	0,016				
	CS-AF	5	0,976	0,016	0,007				
% Volume Vasos	AF-AF	4	0,019	0,025	0,013	ns	ns	ns	ns
	CS-CS	7	0,011	0,008	0,003				
	AF-CS	6	0,017	0,012	0,005				
	CS-AF	5	0,012	0,006	0,003				
% Volume Conjuntivo	AF-AF	4	0,026	0,032	0,016	ns	ns	ns	ns
	CS-CS	7	0,020	0,021	0,008				
	AF-CS	6	0,039	0,027	0,011				
	CS-AF	5	0,012	0,016	0,007				

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ANOVA: valor de P para o teste ANOVA (diferença entre grupos); MANOVA: valor de P para o teste MANOVA (influência do tipo de exposição – pré-natal, pós-natal ou ambos).

AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Tabela 8: Volume fracionário (%) dos compartimentos do coração dos machos.

Machos	Grupo	N	Média	DP	EP	ANOVA	MANOVA Pré	MANOVA Pós	MANOVA Pré*Pós
% Volume Cardiomiócitos	AF-AF	5	0,955	0,026	0,012	ns	0,091	ns	ns
	CS-CS	6	0,969	0,029	0,012				
	AF-CS	6	0,949	0,044	0,018				
	CS-AF	6	0,983	0,018	0,007				
% Volume Vasos	AF-AF	5	0,016	0,008	0,004	ns	ns	ns	ns
	CS-CS	6	0,015	0,015	0,006				
	AF-CS	6	0,025	0,018	0,007				
	CS-AF	6	0,009	0,010	0,004				
% Volume Conjuntivo	AF-AF	5	0,029	0,018	0,008	ns	0,094	ns	ns
	CS-CS	6	0,016	0,015	0,006				
	AF-CS	6	0,026	0,026	0,011				
	CS-AF	6	0,009	0,013	0,005				

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ANOVA: valor de P para o teste ANOVA (diferença entre grupos); MANOVA: valor de P para o teste MANOVA (influência do tipo de exposição – pré-natal, pós-natal ou ambos).

AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.7.2 Volume Absoluto (Volume Total – cm³)

A tabela 9 resume os resultados da análise estereológica realizada para a aferição do volume absoluto (volume total - cm³) do coração e de seus compartimentos (cardiomiócitos, vasos e tecido conjuntivo) nas fêmeas. Não houve diferença entre os grupos para esses parâmetros. Pela análise multivariada (MANOVA) foi observada uma influência da interação dos fatores exposição pré e pós-natal no volume total do coração (p=0,023) e no volume total dos cardiomiócitos (p=0,017) (tabela 9).

Tabela 9: Volume absoluto do coração e seus compartimentos nas fêmeas.

Fêmeas	Grupo	N	Média	DP	EP	ANOVA	MANOVA Pré	MANOVA Pós	MANOVA Pré*Pós
Volume Total Coração (cm ³)	AF-AF	4	0,101	0,015	0,007	0,064	ns	ns	0,023
	CS-CS	7	0,100	0,019	0,007				
	AF-CS	6	0,090	0,011	0,005				
	CS-AF	5	0,081	0,004	0,002				
Volume Total Cardiomiócitos (cm ³)	AF-AF	4	0,097	0,018	0,009	0,077	ns	ns	0,017
	CS-CS	7	0,097	0,018	0,007				
	AF-CS	6	0,085	0,011	0,005				
	CS-AF	5	0,079	0,004	0,002				
Volume Total Vasos (cm ³)	AF-AF	4	0,0017	0,0020	0,0010	ns	ns	ns	ns
	CS-CS	7	0,0011	0,0007	0,0003				
	AF-CS	6	0,0016	0,0012	0,0005				
	CS-AF	5	0,0009	0,0004	0,0002				
Volume Total Conjuntivo (cm ³)	AF-AF	4	0,0025	0,0029	0,0014	ns	ns	ns	ns
	CS-CS	7	0,0021	0,0022	0,0008				
	AF-CS	6	0,0035	0,0026	0,0011				
	CS-AF	5	0,0010	0,0013	0,0006				

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ANOVA: valor de P para o teste ANOVA (diferença entre grupos); MANOVA: valor de P para o teste MANOVA (influência do tipo de exposição – pré-natal, pós-natal ou ambos).

AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

A tabela 10 resume os resultados da análise estereológica realizada para a aferição do volume absoluto (volume total - cm³) do coração e de seus compartimentos (cardiomiócitos, vasos e tecido conjuntivo) na prole de machos. Semelhantemente às fêmeas, pela MANOVA foi observada uma influência da interação dos fatores exposição pré e pós-natal no volume total do coração (p=0,005) e no volume total dos cardiomiócitos (p=0,018) (tabela 10).

Tabela 10: Volume absoluto do coração e seus compartimentos nos machos.

Machos	Grupo	N	Média	DP	EP	ANOVA	MANOVA Pré	MANOVA Pós	MANOVA Pré*Pós
Volume Total Coração (cm ³)	AF-AF	5	0,149	0,044	0,020	0,036	ns	ns	0,005
	CS-CS	6	0,130	0,018	0,007				
	AF-CS	6	0,111	0,017	0,007				
	CS-AF	6	0,113	0,015	0,006				
Volume Total Cardiomiócitos (cm ³)	AF-AF	5	0,143	0,046	0,021	ns	ns	ns	0,018
	CS-CS	6	0,126	0,015	0,006				
	AF-CS	6	0,105	0,016	0,007				
	CS-AF	6	0,111	0,014	0,006				
Volume Total Vasos (cm ³)	AF-AF	5	0,0021	0,0008	0,0004	ns	0,083	ns	ns
	CS-CS	6	0,0021	0,0024	0,0010				
	AF-CS	6	0,0028	0,0021	0,0009				
	CS-AF	6	0,0010	0,0012	0,0005				
Volume Total Conjuntivo (cm ³)	AF-AF	5	0,0039	0,0021	0,0009	ns	0,056	ns	ns
	CS-CS	6	0,0022	0,0024	0,0010				
	AF-CS	6	0,0030	0,0030	0,0012				
	CS-AF	6	0,0011	0,0016	0,0007				

N: número de animais; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ANOVA: valor de P para o teste ANOVA (diferença entre grupos); MANOVA: valor de P para o teste MANOVA (influência do tipo de exposição – pré-natal, pós-natal ou ambos).

AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

Porém, diferentemente das fêmeas, nos machos houve diferença no volume total do coração. Os animais do grupo exposto pós-natal (AF-CS) e apresentaram um volume total do coração menor ($p=0,015$) quando comparados com o grupo controle (AF-AF). O grupo de animais expostos pré-natal (CS-AF) também apresentou um valor significativamente menor ($p=0,018$) quando comparado ao grupo AF-AF (figura 18).

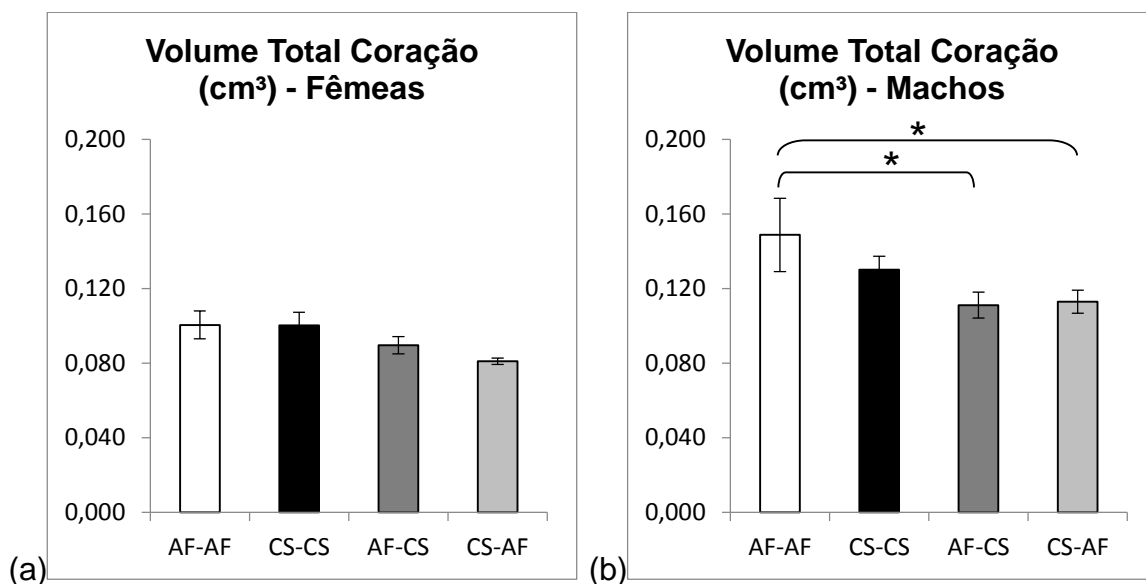


Figura 18: Volume total do coração (cm³) nos diferentes grupos avaliados. (a) Fêmeas. (b) Machos. *AF-AF x AF-CS ($p=0,015$). *AF-AF x CS-AF ($p=0,018$). Análise estatística realizada por ANOVA e pós-teste LSD. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.7.3 Volume médio dos cardiomiócitos (μm^3)

A análise do volume médio de cardiomiócitos mostrou diferenças entre os grupos apenas nas fêmeas. As fêmeas do grupo CS-CS apresentaram um volume médio menor quando comparadas às fêmeas do grupo CS-AF ($p=0,004$) (figura 19). Houve influência dos fatores na exposição pós-natal ($p=0,012$) e da interação das exposições pré e pós-natal ($p=0,017$). Nos machos não houve diferenças entre os grupos (figura 19) nem influência do tipo de exposição nos desfechos.

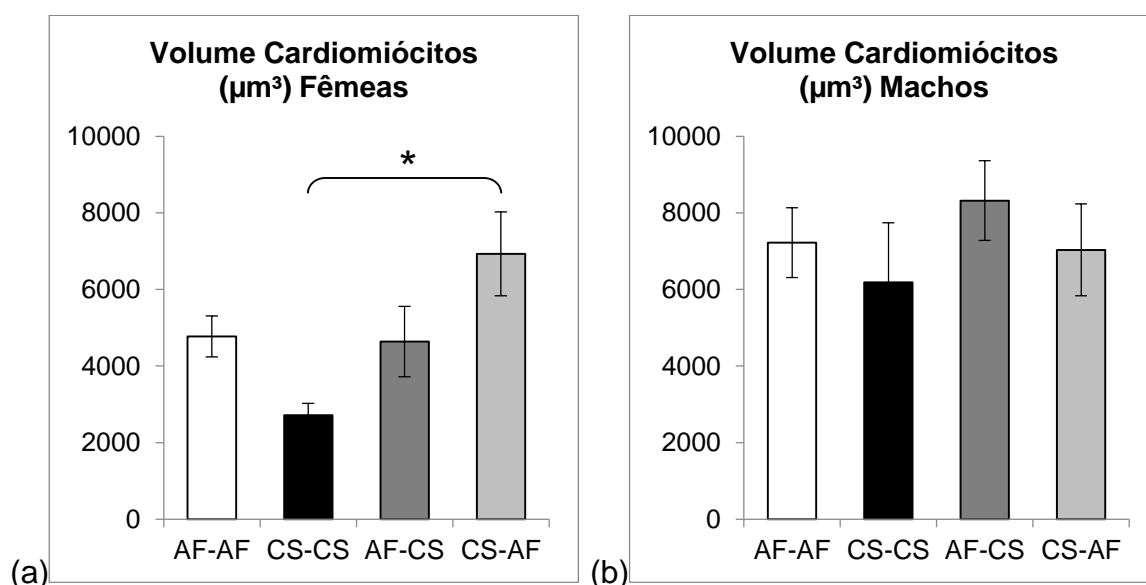


Figura 19: Volume médio dos cardiomiócitos (μm^3) nos diferentes grupos avaliados. (a) Volume de cardiomiócitos nas fêmeas. *CS-CS x CS-AF ($p=0,004$) Análise estatística realizada por ANOVA e pós-teste Tukey. (b) Volume de cardiomiócitos nos machos. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

6.8 Análise Picrosirius

A quantificação de colágeno estimada pela coloração seletiva picrosirius não mostrou diferença entre os grupos nas fêmeas (figura 18). Houve diferença entre os grupos apenas no coração dos machos. O grupo exposto durante o período pós-natal (AF-CS) apresentou uma porcentagem de área marcada maior quando comparado ao grupo controle (AF-AF) ($p=0,041$) e ao grupo de animais exposto durante os dois períodos (CS-CS) ($p=0,007$) (figura 20).

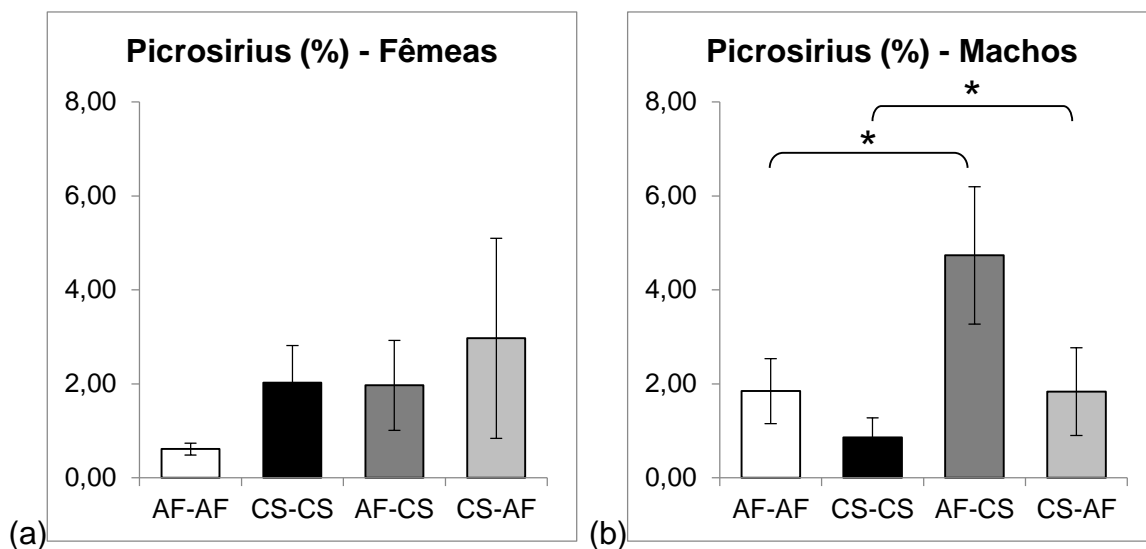


Figura 20: Porcentagem de área marcada por picrosirius no coração dos diferentes grupos. (a) Fêmeas. (b) Machos: *AF-CS x AF-AF ($p=0,041$). *AF-CS x CS-CS ($p=0,007$). Análise estatística realizada por ANOVA e pós-teste LSD. Gráfico de barras expressas em média \pm erro padrão. AF-AF: nunca expostos à maconha; CS-CS: expostos à maconha nos períodos pré-natal e pós-natal; AF-CS: expostos à maconha no período pós-natal; CS-AF: expostos à maconha no período pré-natal.

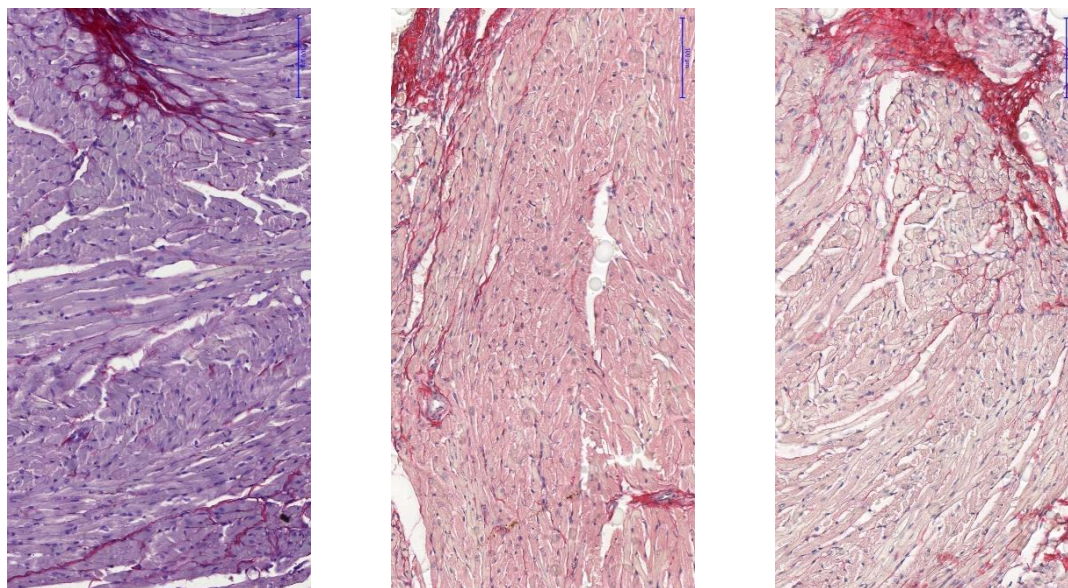


Figura 21: Imagens representativas das fotos das lâminas coradas com picrosirius.

7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o número de gestantes usuárias de maconha dobrou nos EUA. Com a expansão da legalização, as gestantes relatam que fazem uso de maconha para amenizar os sintomas decorrentes do período gestacional como náuseas e dor. Muitas, ainda descrevem que fazem uso para outros distúrbios psiquiátricos como depressão e ansiedade.

O tabagismo materno está associado a diversos desfechos negativos na gestação e desenvolvimento fetal como: aborto espontâneo, nascimento prematuro, déficit no crescimento, maior risco de desenvolver alergias, desenvolvimento de asma, disfunção pulmonar infantil (Mantzoros et al., 1997; Das et al., 1998; Peat e Björkstén, 1998; Stein et al., 1999; Hoo et al., 1998), infecções pulmonares (Milner et al., 1999) e risco de síndrome de morte súbito é proporcional ao número de cigarros fumados (Gibson e Tibbetts, 1998; Mainous e Hueston, 1994; Fleming e Blair, 2007). Os componentes da fumaça do cigarro, assim como a maconha, atravessam a barreira placentária e promove alterações na oxigenação e no metabolismo placentário. Os resultados dos desfechos reprodutivos mostram novamente o impacto negativo do uso recreacional da maconha sobre a gestação. Neste estudo, observamos que a exposição provoca prejuízos no desenvolvimento fetal, observados pela redução do peso ao nascer. Além deste desfecho, o ganho de peso materno mostrou-se menor, embora o número de filhotes tenha sido maior nas mães que foram expostas durante a gestação. Estes resultados corroboram nosso estudo anterior (Benevenuto et al., 2017).

Na literatura há diversos estudos que avaliam os efeitos do uso da maconha na gestação, tanto em humanos quanto em animais experimentais. Os resultados concordam que este uso tem efeitos adversos sobre os desfechos perinatais e principalmente no desenvolvimento neurológico fetal (Gunn et al., 2016). Dentre os desfechos gestacionais, os mais associados são a restrição do crescimento fetal, baixo peso ao nascer e prematuridade. No entanto, os dados não são uniformes e às vezes, contraditórios (Gunn *et al.*, 2016). Em humanos, existe uma dificuldade de se determinar os níveis de exposição, devido ao uso concomitante de outras substâncias lícitas e ilícitas, além de fatores sócio-econômicos e falta de concordância do auto-relato materno do uso com a amostragem biológica.

As evidências experimentais mostram que o sistema endocanabinoide desempenha um papel fundamental no processo de desenvolvimento do blastocisto e implantação e pode ser prejudicado desde as fases iniciais pela desregulação dos níveis de anandamida. Além disso, a placenta tem seu funcionamento prejudicado. O equilíbrio na síntese e degradação de anandamida é fundamental para garantir a implantação e a manutenção da gravidez. (Park et al., 2004; Friedrich et al., 2016).

Diferenças nos efeitos sobre o desenvolvimento fetal em machos e fêmeas são relatadas na literatura. Em nosso estudo prévio os filhotes machos apresentaram menor peso ao nascer ao contrário das fêmeas que apresentaram peso normal (Benevenuto et al., 2017). Neste estudo, todos os filhotes, apresentaram menor peso quando comparado aos filhotes de mães não expostas. As diferenças no efeito de acordo com o sexo podem ser explicadas pelo fato do THC atuar como um concorrente fraco in vivo do receptor de estrogênio produzindo um efeito primário de estrogênio em ratos machos e fêmeas (Rawitch et al., 1977; Fonseca et al., 2013; Takeda et al., 2013).

As evidências sobre os efeitos do uso da maconha durante a gestação e sobre desenvolvimento fetal não são conclusivas. Os dados de estudos experimentais sugerem que há prejuízos no desenvolvimento fetal devido à desregulação no sistema endocanabinoide ocasionando diversos desfechos neonatais e mais tarde na vida adulta, principalmente as alterações neuro-comportamentais (Metz e Stickrath, 2015; Gunn et al., 2016). A maioria dos estudos epidemiológicos prospectivos longitudinais foram iniciados no final da década de 1970 e início da década de 1980, época em que a maconha era 6 vezes menos potente que a maconha atual. Assim os achados presentes na literatura devem ser analisados com cautela, pois os níveis de THC podem determinar a extensão dos impactos sobre o desenvolvimento (Cascini et al., 2012).

O prejuízo no desenvolvimento também pode ser observado pela trajetória de crescimento dos animais no período pós-natal. Machos e fêmeas apresentam diferenças quanto à interferência da exposição no período pós-natal. Pouquíssimos estudos avaliaram as consequências do uso da maconha na adolescência e na vida adulta em relação ao crescimento e ao ganho de peso. Em humanos, este tipo de estudo pode ter interferência de diversos fatores, tais como o uso de outras drogas,

prática de atividade física, fatores genéticos e presença de comorbidades (Jin et al., 2017).

Em um recente estudo conduzido na Dinamarca (Jin et al., 2017) com adolescentes do sexo masculino, com idade entre 15 a 19 anos, não foi encontrada uma associação entre o uso de maconha e o peso corporal.

Em nosso estudo, observamos que no primeiro mês de vida da prole, que corresponde ao período da infância, apenas as fêmeas apresentam uma diminuição do peso, enquanto os machos apresentam diferenças na redução de peso a partir dos 60 dias de vida, considerado período final da puberdade, e se mantêm assim até os 90 dias, quando são considerados jovens adultos. Não foi avaliado o consumo diário de ração, assim não podemos associar a redução do peso a uma diminuição da ingestão de ração ou a uma alteração metabólica.

Os dados da literatura são contraditórios quanto ao ganho de peso corporal. De acordo com Andersen et al. (2010), o baixo peso ao nascer, a restrição de crescimento pós-natal, e o peso corporal ideal para a altura, adquirido mais tarde na infância, estão associados com doenças coronarianas na idade adulta.

Sabe-se que o uso da maconha é classicamente associado a um aumento transitório do apetite, popularmente chamado como “larica”. Sendo assim, acredita-se que em decorrência do uso pode haver um aumento do ganho de peso. No entanto, apesar do apetite ser estimulado, alguns estudos indicam que o aumento de peso nem sempre é clinicamente significativo. Estudos prévios sugerem que a exposição gestacional altera a expressão dos receptores de canabinóides do tipo 1 (CB1) e os seus ligantes endógenos (anandamida 2-araquidonilglicerol) e que estão envolvidos no equilíbrio energético de mamíferos, e esta alteração poderia aumentar o armazenamento de energia no tecido adiposo e reduzir o gasto energético. Estudos epidemiológicos na população em geral, indicam consistentemente que os usuários de maconha tendem a ter menores índices de massa corporal do que os não usuários.

Os resultados de um estudo longitudinal (Desenvolvimento do Risco da Artéria Coronária em Adultos Jovens - CARDIA) com 3.617 participantes, com faixa etária compreendidas entre os 18 e 30 anos, que não faziam uso de maconha (2.252; 62%) e com histórico prévio de uso (1.365; 38%) mostraram que o uso crônico da maconha foi associado à maior ingestão calórica diária, mas não com um

aumento do índice de massa corporal (Rodondi et al., 2006). Smit e Crespo (2001) examinaram dados sobre adultos da *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (Hanes III; N = 10,623) e compararam os usuários de maconha com não usuários e encontraram o mesmo resultado que o estudo CARDIA, ressaltando que entre os usuários de maconha também havia maiores taxas de uso do tabaco.

Hayatbakhsh et al., 2010; estudaram a relação entre o uso de maconha e o peso corporal em 2.566 jovens adultos que foram acompanhados por 21 anos. Foram encontrados uma menor prevalência de sobrepeso e obesidade comparados com não usuários.

Estes achados epidemiológicos, que sugerem que o uso de maconha está associado a um índice de massa corporal mais baixo, são suportados por um estudo com ratos obesos (Levendal et al., 2012). Neste estudo, ratos normais e ratos obesos receberam injeções de THC por 28 dias e alimentação *ad libitum* e foi mostrado que o ganho de peso no grupo de animais obeso ocorreu mais lentamente do que no grupo de animais com peso normal. Em outras palavras, os ratos obesos ganharam peso de forma mais lenta, assim como demonstrado em nosso estudo.

Ainda não se sabe muito sobre como a maconha regula o apetite e sua influência no ganho de peso via metabolismo. Porém as diferenças entre os estudos podem ser explicadas por diversos fatores como a forma de uso, frequência do uso, associação com o uso de outras drogas lícitas e ilícitas, características genéticas individuais, hábitos alimentares, entre outros.

Em nosso estudo, os animais expostos a maconha durante o período pré-natal e pós-natal apresentam um ganho de peso ao longo de sua trajetória de crescimento menor quando comparados com os indivíduos não expostos e a exposição pré-natal associada a exposição pós-natal reforçam este efeito na diminuição do ganho de peso. Não podemos afirmar se houve ou não maior ingestão de ração pelos grupos expostos, pois a ingestão de alimentos não foi acompanhada. Entretanto, em nosso estudo anterior com fêmeas gestantes observamos um aumento significativo do consumo de ração (Benevenuto et al., 2017).

Em relação ao peso do coração (razão peso coração/peso corporal), foram observadas alterações tanto em fêmeas quanto em machos. Nas fêmeas, a exposição pré-natal provocou diminuição do peso. Nos machos, a exposição pré-natal (somente) e a exposição pós-natal (somente) provocaram o efeito de

diminuição do peso. Na literatura ainda não foram descritos efeitos da exposição à *Cannabis* em relação ao peso do coração. Para investigar melhor os motivos dessa diminuição de peso, realizamos a análise histopatológica e estereológica do coração.

A análise estereológica mostrou que não houve alterações na proporção dos compartimentos analisados em decorrência da exposição à maconha em ambas as proles. Os volumes fracionários dos compartimentos do coração não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados sugerem que, apesar de uma parte da exposição ter sido realizada em um período crucial de desenvolvimento do coração (período gestacional), os efeitos negativos não foram suficientes para alterar a proporção da composição dos tecidos que compõem o coração (cardiomiócitos, vasos e conjuntivo).

Porém, a análise de interação entre os fatores (MANOVA) mostrou que houve influência da exposição pré e pós-natal na diminuição do volume total do coração e no volume total de cardiomiócitos em ambas as proles. Embora não tenhamos observado alterações na proporção dos compartimentos, observamos essa diminuição no volume total de cardiomiócitos em decorrência da diminuição do volume total do coração, que apresenta esse volume menor provavelmente devido ao menor peso do coração, principalmente na prole de machos.

Já em relação ao volume médio dos cardiomiócitos somente as fêmeas foram afetadas, apresentando um volume médio reduzido dessas células no grupo expostos nos períodos pré e pós-natal. Isso não ocorre nos machos, o que significa que outro fenômeno pode estar ocorrendo para explicar a diminuição do volume total dos cardiomiócitos.

Uma das explicações pode ser os achados que obtivemos da deposição de colágeno. Nos machos, uma área marcada maior foi observada no grupo com exposição pós-natal, comparada ao grupo controle e também ao grupo exposto nos dois períodos. A deposição de colágeno pode estar ocorrendo com maior intensidade nos animais expostos no período pós-natal, que de fato é o grupo que apresenta menor volume total de cardiomiócitos. Outro achado interessante em relação ao resultado do picosirius foi o fato de que os animais expostos em ambos os períodos apresentam pouca deposição de colágeno, sugerindo que pode estar havendo um processo de condicionamento dos animais que foram expostos durante

a gestação, os quais não seriam afetados pela exposição pós-natal. No entanto, mais análises são necessárias para confirmarmos.

A avaliação da morfologia e função do coração por ecocardiograma nos animais expostos à fumaça da queima da maconha em diferentes períodos da vida mostrou que há uma provável alteração na função diastólica na vida adulta. Os efeitos são dependentes do tipo de exposição e foram observados nos animais expostos em ambos os períodos (pré e pós-natal).

Os achados experimentais em seres humanos são consistentes em mostrar o papel importante do sistema nervoso autônomo nas respostas cardiovasculares que ocorrem em resposta ao THC. O aumento da frequência cardíaca decorrente da exposição ao THC é o resultado da estimulação beta-simpática mediada centralmente e da atividade parassimpática reduzida (Fredericks et al., 1981).

Em humanos, o efeito agudo do fumo da maconha se manifesta por um aumento na frequência cardíaca sem alteração significativa na pressão arterial (Kanakis et al., 1976). No entanto, a administração aguda, bem como a administração crônica e prolongada ao THC em grupos de animais experimentais, provocou uma diminuição duradoura da pressão arterial e da frequência cardíaca (Rosenkratz, 1974, Benowitz e Jones, 1975).

Devido aos efeitos bem conhecidos dos canabinóides na função do sistema nervoso central, a maioria dos estudos sobre os efeitos cardiovasculares decorrentes do uso da maconha concentraram-se na avaliação da capacidade dos compostos presentes na fumaça em inibir o sistema simpático como mecanismo de ação. Em contraste, pouco se sabe sobre os efeitos cardíacos diretos induzidos por eles.

Nos animais que foram expostos somente pós-natal, não observamos diferenças significativas na morfologia e função. A exposição pós-natal diária dos animais à fumaça da queima da maconha por aproximadamente 70 dias corresponde à exposição a partir da infância tardia até a idade de jovem adulto em humanos. Nesta fase da vida, o coração já está com seu desenvolvimento completo (Gan et al., 2015) e os insultos do uso da maconha nas condições de nosso estudo parecem não afetar seu funcionamento.

O consumo de maconha tem efeitos complexos no sistema cardiovascular que incluem aumento da frequência cardíaca (dependendo da dose), diminuição do

volume sistólico, aumento do débito cardíaco e aumento da pressão sanguínea, mediada por estímulo simpático e atividade parassimpática reduzida. Esse aumento de noradrenalina aumenta a demanda miocárdica de oxigênio e reduz o tempo de ejeção do ventrículo esquerdo, diminuindo o limiar de angina e resistência vascular periférica nos músculos esqueléticos. Além disso, a fumaça decorrente da pirólise da maconha pode resultar em níveis mais elevados de carboxihemoglobina influenciando os efeitos adversos no coração, sendo tão prejudicial quanto o consumo de cigarros (Gash et al., 1978; Pratap e Korniyenko, 2012; Quercioli et al., 2011).

Em um estudo conduzido por Mukamal et al., 2008, que avaliou o impacto do tabagismo na doença coronariana, verificou-se o aumento na mortalidade em pacientes usuários de maconha após episódios de infarto do miocárdio, comparados a não-usuários.

O aumento da frequência cardíaca e pressão arterial após consumo de maconha é atribuído ao THC, principal componente psicoativo presente na maconha. A diminuição do ventrículo esquerdo e do volume diastólico final pode estar parcialmente associado ao aumento da frequência cardíaca.

Nos animais expostos nos dois períodos (pré e pós-natal), há uma diminuição do débito cardíaco, aumento na função sistólica, na fração de encurtamento e na fração de ejeção. Na morfologia, observamos que a parede posterior tende a ser mais fina. Estas alterações a princípio não são indicativas de um prejuízo na função do coração, entretanto podem progredir provocando uma disfunção futura.

Essas alterações estão relacionadas a insuficiência cardíaca, definida pela incapacidade do coração em gerar um débito cardíaco adequado, fundamental para atender as necessidades metabólicas dos tecidos. Essa condição pode estar associada a uma disfunção sistólica ou a uma função sistólica preservada. Na ausência de causas, a insuficiência cardíaca com função sistólica preservada é comumente resultado de disfunção diastólica e, nesses casos, referida como insuficiência cardíaca diastólica (Frost et al., 2013).

No sistema cardiovascular, os receptores canabinóides estão localizados no miocárdio, células endoteliais, células do músculo liso e células sanguíneas circulantes. Os endocanabinóides tem sua ação parácrina ou autócrina, através da ativação de receptores canabinóides (CB1 e CB2). Nas células do musculo liso, os

receptores modulam as respostas celulares mediadas pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) ou pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sugerindo que fatores inflamatórios induzem canabinóides, mediados por endocanabinóides por sinalização autócrina (Molica et al., 2012; Molica et al., 2013; Rajesh et al., 2008;)

Os endocanabinóides exercem efeitos complexos no sistema cardiovascular e são produzidos por células imunes e endoteliais e ativadas por cardiomiócitos em condições patológicas por meio da sinalização do CB1, atenuando a inflamação, morte celular e remodelamento de diversos tecidos (Varga et al., 1998; Wagner et al., 2001). Ao contrário dos efeitos deletérios do CB1, o receptor CB2 tem sido demonstrado como cardioprotetor em modelos experimentais de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e esteatose, devido aos efeitos atenuantes à inflamação e sua capacidade de interação com o endotélio e as células inflamatórias (Molica et al., 2012; Montecucco et al., 2009; Schaich et al., 2014).

Tendo em vista a importância dos receptores CB1 e CB2, seria interessante investigar futuramente o comportamento desses receptores, os quais podem estar relacionados com os desfechos obtidos nesse trabalho, no qual observamos influência da exposição gestacional e pós-natal sobre os desfechos reprodutivos, sobre a morfometria do coração e sobre os parâmetros funcionais desse órgão essencial.

8. CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que o uso crônico de maconha em baixas doses pode afetar adversamente a trajetória de crescimento aferida pelo ganho de peso corporal e a estrutura e a função cardiovascular, mesmo em indivíduos jovens e a exposição pré-natal à fumaça da maconha combinada com o consumo de maconha durante a idade jovem pode predispor os indivíduos a problemas cardiovasculares na vida adulta.

O uso recreativo da maconha durante a gravidez e mais tarde na vida parece não ser inofensivo à saúde cardiovascular.

9. REFERÊNCIAS

- Alger BE. Getting high on the endocannabinoid system. *Cerebrum*. 2013;2013:14.
- Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*. 2002;68(4):247-86.
- American Academy of Pediatrics. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012;129:e827-41.
- Andersen LG, et al. Birth Weight, Childhood Body Mass Index and Risk of Coronary Heart Disease in Adults: Combined Historical Cohort Studies. *PLoS One*. 2010;5(11): e14126.
- André CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci*. 2016;7:19.
- Aryana A, Williams MA. Marijuana as a trigger of cardiovascular events: speculation or scientific certainty? *Int J Cardiol*. 2007;118(2):141-4.
- Associação brasileira de estudo de álcool e outras drogas (ABEAD). <http://www.abead.com.br/>, 2012. Acesso em: 17/04/2015.
- Basavarajappa BS. Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr Neuropharmacol*. 2007;5(2):81-97.
- Behnke M, et al. Prenatal substance abuse: short-and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics*. 2013;131(3):e1009-24.
- Benevenuto SG, et al. Recreational use of marijuana during pregnancy and negative gestational and fetal outcomes: An experimental study in mice. *Toxicology*. 2017; 376:94-101.
- Benowitz NL, Jones RT. Cardiovascular effects of prolonged delta-9-tetrahydrocannabinol ingestion. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;18(3):287-97.
- Bordin DC, et al. Análise forense: pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinóides da maconha (Cannabis Sativa L.). *Química nova*. 2012;35(10):2040-3.
- Bruçi Z, et al. First systematic evaluation of the potency of Cannabis sativa plants grown in Albania. *Forensic Sci Int*. 2012;222(1-3):40-6.
- Carlini EA. A história da maconha no Brasil. *J Bras Psiquiatr*. 2006;55(4):314-7.
- Cascini F, Aiello C, Di Tanna G. Increasing delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) content in herbal Cannabis sativa over time: systematic review and meta-analysis. *Curr Drug Abuse Rev*. 2012;5(1):32-40.

Chen T, et al. The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chem.* 2012;134(2):1030-7.

Das TK, et al. Effects of smoking cessation on maternal airway function and birth weight. *Obstet Gynecol.* 1998;92(2):201-5.

Dow-Edwards D, Silva L. Endocannabinoids in brain plasticity: Cortical maturation, HPA axis function and behavior. *Brain Res.* 2017;1654(Pt B):157-164.

EISohly M, Gul W. Constituents of *Cannabis Sativa*. In: Pertwee RG. *Handbook of Cannabis sativa*. Oxford: OUP Oxford; 2014. Chap.1, p.3-22.

Faux AM, et al. Sex chromosomes and quantitative sex expression in monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica.* 2014;196(2):183-97.

Fleming P, Blair PS. Sudden Infant Death Syndrome and parental smoking. *Early Hum Dev.* 2007;83(11):721-5.

Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochem Rev.* 2008;7(3):615–39.

Fonseca BM, et al. The endocannabinoid system in the postimplantation period: a role during decidualization and placentation. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:510540.

Fredericks AB, Benowitz NL, Savanapridi CY. The cardiovascular and autonomic effects of repeated administration of delta-9-tetrahydrocannabinol to rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;216(2):247-53.

Friedrich J, et al. The grass isn't always greener: The effects of *Cannabis sativa* on embryological development. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2016;17(1):45.

Frost L, et al. Marijuana use and long-term mortality among survivors of acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2013;165(2):170-5.

Gan J, et al. Integrative Analysis of the Developing Postnatal Mouse Heart Transcriptome. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133288.

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 1964;86(8):1646–7.

Gash A, et al. Effects of smoking marijuana on left ventricular performance and plasma norepinephrine: studies in normal men. *Ann Intern Med.* 1978;89:448-52.

Ghuran A, Nolan J. Recreational drug misuse: issues for the cardiologist. *Heart.* 2000;83(6):627-33.

Gibson CL, Tibbetts SG. Interaction between maternal cigarette smoking and Apgar scores in predicting offending behavior. *Psychol Rep.* 1998;83(2):579-86.

Grant I, Cahn BR. Cannabis sativa and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clin Neurosci Res*. 2005;5(2-4):185-99.

Green KM, Johnson RM, Milam AJ, et al. Racial differences and the role of neighborhood in the sequencing of marijuana and tobacco initiation among urban youth. *Subst Abus*. 2016;37(4):507-10.

Greydanus DE, et al. Marijuana: current concepts(†). *Front Public Health*. 2013;1:42.

Guilherme CG, et al. Cannabis sativa (maconha): uma alternativa terapêutica no tratamento de crises convulsivas. *Rev Ciênc Saúde Nova Esperança*. 2014;12(2):1-8.

Gunn JK, et al. Prenatal exposure to cannabis and maternal and child health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2016;6(4):e009986.

Hasin DS, et al. Cannabis withdrawal in the United States: results from NESARC. *J Clin Psychiatry*. 2008;69(9):1354-63.

Hayatbakhsh MR, et al. Birth outcomes associated with cannabis use before and during pregnancy. *Pediatr Res*. 2012;71(2):215-9.

Hayatbakhsh MR, et al. Cannabis sativa use and obesity and young adults. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2010;36(6):350-6.

Henry JA, Oldfield WL, Kon OM. Comparing Cannabis sativa with tobacco. *BMJ*. 2003;326(7396):942-3.

Hiley CR, Ford WR. Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2004;79(1):187-205.

Honório KM, Arroio A, Silva ABF. Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. *Química nova*. 2006;29(2):318-25.

Hoo AF, et al. Respiratory function among preterm infants whose mothers smoked during pregnancy. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(3):700-5.

Howlett AC, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-202.

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

Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), Unidade de Pesquisas em Álcool e Drogas (UNIAD), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). II LENAD: levantamento nacional de álcool e drogas: o uso de maconha no Brasil. http://www.inpad.org.br/images/stories/LENAD/lenad_maconha1%20copia.pdf, 2013. Acesso em: 13/08/2016.

Jacobus J, et al. White matter integrity pre-and post marijuana and alcohol initiation in adolescence. *Brain Sci.* 2013;3(1):396-414.

Jaques SC, et al. Cannabis sativa, the pregnant woman and her child: weeding out the myths. *J Perinatol.* 2014;34(6):417-24.

Jardim JR, et al. An inhalation chamber model for controlled studies of tobacco smoke toxicity in rodents. *Arch Bronconeumol.* 2010;46(9):455-8.

Jin LZ, et al. Association Between Use of Cannabis sativa in Adolescence and Weight Change into Midlife. *PLoS One.* 2017;12(1):e0168897.

Kalant H. Medicinal use of cannabis: History and current status. *Pain Res Manag.* 2001;6(2):80-91.

Kanakis C Jr, Pouget JM, Rosen KM. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (Cannabis sativa) on cardiac performance with and without beta blockade. *Circulation.* 1976;53(4):703-7.

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

Lee DC, et al. Treatment models for targeting tobacco use during treatment for cannabis use disorder: case series. *Addict Behav.* 2014;39(8):1224-30.

Levendal RA, et al. Cannabis sativa exposure associated with weight reduction and β -cell protection in an obese rat model. *Phytomedicine.* 2012;19(7):575-82.

Li HL. An archaeological and historical account of cannabis sativa in china. *Economic Botany.* 1974;28(4):437-48.

Li K, et al. A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology.* 2013;71:255-63.

Lichtman AH, et al. The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. *Drug Alcohol Depend.* 2001;63(2):107-16.

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

Lowe RH, et al. Simultaneous quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human plasma using two-dimensional gas chromatography, cryofocusing, and electron impact-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1163(1-2):318-27.

Macarone M, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(5):277-96.

Mainous AG 3rd, Hueston WJ. Passive smoke and low birth weight. Evidence of a threshold effect. *Arch Fam Med*. 1994;3(10):875-8.

Mantzoros CS, et al. Effect of birth weight and maternal smoking on cord blood leptin concentrations of full-term and preterm newborns. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9):2856-61.

Matos R, et al. O Uso do Canabidiol no Tratamento da Epilepsia. *Rev Virtual Química*. 2017;9(2):786-814.

Mechoulam R, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 2005; 29;50(1):83-90.

Mechoulam R, Hanuš L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1-2):1-13.

Menezes JRL. Os efeitos da proibição da maconha sobre a saúde. *Rev Biologia*. 2014;13(1):24-7.

Metz TD, Stickrath EH. Marijuana use in pregnancy and lactation: a review of the evidence. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(6):761-78.

Meyer HC, Lee FS, Gee DG. The role of the endocannabinoid system and genetic variation in adolescent brain development. *Neuropsychopharmacology*. 2017;43:21–33.

Milner AD, et al. Effects of smoking in pregnancy on neonatal lung function. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999;80(1):F8-14.

Molica F, et al. Endogenous cannabinoid receptor CB1 activation promotes vascular smooth-muscle cell proliferation and neointima formation. *J Lipid Res*. 2013;54(5):1360-8.

Molica, F. et al. Cannabinoid receptor CB2 protects against balloon-induced neointima formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(5):H1064-74.

Montecucco F, Di Marzo V. At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(6):331-40.

Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. *Prog Chem Org Nat Prod*. 2017;103:103–31.

Morris CV, et al. Molecular mechanisms of maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment. *Eur J Neurosci*. 2011;34(10):1574-83.

Mukamal KJ, et al. An exploratory prospective study of marijuana use and mortality following acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2008;155(3):465-70.

Organização das Nações Unidas (ONU). <http://www.unric.org/pt>, 2014. Acesso em: 24/03/2015.

Pamplona FA, Takahashi RN. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. *J Psychopharmacol*. 2012;26(1):7-22.

Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis sativa, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;70(2):189-97.

Peat J, Björkstén B. Primary and secondary prevention of allergic asthma. *Eur Respir J Suppl*. 1998;27:28s-34s.

Pereira JR, et al. Cannabis sativa: aspectos relacionados ao consumo de maconha no contexto brasileiro. *RAHIS*. 2018;15(1):1-16.

Pratap B, Korniyenko A. Toxic effects of marijuana on the cardiovascular system. *Cardiovasc Toxicol*. 2012;12(2):143-8.

Pratap B, Korniyenko A. Toxic Effects of Marijuana on the Cardiovascular System. *Cardiovasc Toxicol*. 2012;12(2):143-8.

Quercioli A, et al. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J*. 2011;32:1369–78.

Rajesh, M. et al. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol*. 2008;153(2):347-57.

Rawitch AB, et al. Competition of delta 9-tetrahydrocannabinol with estrogen in rat uterine estrogen receptor binding. *Science*. 1977;197(4309):1189-91.

Raymundo PG, de Souza PRK. Cannabis sativa: os pros e contras do uso terapêutico de uma droga de abuso. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2007;3(13):23-30.

Rodondi N, et al. Marijuana use, diet, body mass index, and cardiovascular risk factors (from the CARDIA study). *Am J Cardiol*. 2006;98(4):478–84.

Rosenkrantz H, Braude M. Acute, subacute and 23-day chronic marijuana inhalation toxicities in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1974;28(3):428-41.

Saurel-Cubizolles MJ, Prunet C, Blondel B. Cannabis sativa use during pregnancy in France in 2010. *BJOG*. 2014;121(8):971-7.

Schaich CL, et al. Acute and chronic systemic CB1 cannabinoid receptor blockade improves blood pressure regulation and metabolic profile in hypertensive (mRen2)27 rats. *Physiol Rep*. 2014;2(8). pii: e12108.

Schauer GL, et al. Toking, vaping, and eating for health or fun: marijuana use patterns in adults, US, 2014. *Am J Prev Med*. 2016;50(1):1-8.

Schultes RE, et al. Cannabis sativa: an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*. 1974;23(9):337-67.

Scott JC, et al. Association of Cannabis With Cognitive Functioning in Adolescents and Young Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2018 Jun 1;75(6):585-95.

Sharma C, et al. Small Molecules from Nature Targeting G-Protein Coupled Cannabinoid Receptors: Potential Leads for Drug Discovery and Development. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:238482.

Singla S, Sachdeva R, Mehta JL. Cannabinoids and atherosclerotic coronary heart disease. *Clin Cardiol*. 2012;35(6):329-35.

Sirikantaramas S, et al. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol*. 2005;46(9):1578-82.

Smit E, Crespo CJ. Dietary intake and nutritional status of US adult marijuana users: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Public Health Nutr*. 2001;4(3):781-6.

Steffens S, Pacher P. Targeting cannabinoid receptor CB2 in cardiovascular disorders: promises and controversies. *Br J Pharmacol*. 2012;167(2):313-23.

Stein RT, et al. Influence of parental smoking on respiratory symptoms during the first decade of life: the Tucson Children's Respiratory Study. *Am J Epidemiol*. 1999;149(11):1030-7.

Takeda S, et al. $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol disrupts estrogen-signaling through up-regulation of estrogen receptor β (ER β). *Chem Res Toxicol*. 2013;26(7):1073-9.

Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology*. 2010;215(8):588-97.

Tennes K, Avitable N, Blackard C, et al. Marijuana: prenatal and postnatal exposure in the human. *NIDA Res Monogr*. 1985;59:48-60.

Thomas G, Kloner RA, Rezkalla S. Adverse cardiovascular, cerebrovascular, and peripheral vascular effects of marijuana inhalation: what cardiologists need to know. *Am J Cardiol*. 2014;113(1):187-90.

Touw M. The religious and medicinal uses of cannabis sativa in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*. 1981;13(1):23-34.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World drug report 2015. https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf, 2015. Acesso em: 10/06/2016.

Van Ornum M. Illegal drugs. A complete Guide to their history, Chemistry, use and Abuse. *J Neurosci Nursing*. 2003;35(4):233.

Varga K, et al. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J.* 1998;12(11):1035–44.

Wagner JA, et al. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(7):2048–54.

Yamaori S, et al. Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(11):1691-8.

Zogopoulos P, et al. The neuroprotective role of endocannabinoids against chemical-induced injury and other adverse effects. *J Appl Toxicol.* 2013;33(4):246-64.



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Efeitos da exposição à Cannabis sativa associada à poluição atmosférica urbana no remodelamento do miocárdio de camundongos jovens**”, protocolo nº **039/16** sob a responsabilidade de **Mariana Matera Veras** e **Janaina Iannicelli Torres**, apresentado pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 04.05.2016

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico BalbC
Nº de animais	35
Peso/Idade	20g/60 dias
Sexo	Macho/fêmea
Origem	Biotério do Instituto de Química

CEUA-FMUSP, 04 de Maio de 2016

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