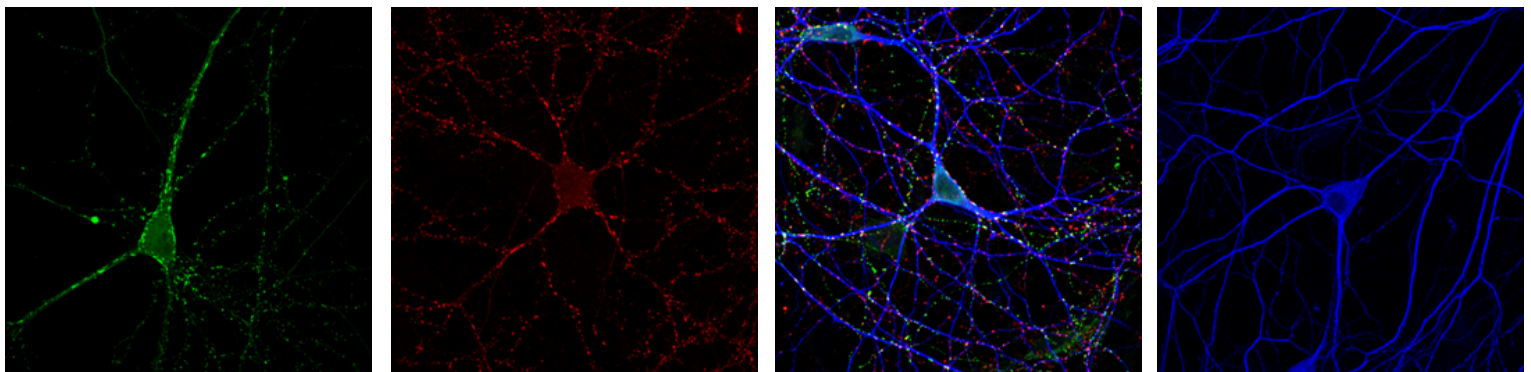


Tesina de grado  
Licenciatura en Ciencias Biológicas

# **Impacto de la exposición prenatal a cannabis vaporizado en sinapsis del hipocampo de ratas *in vitro***

Facundo Brizolara



Orientadora: Nathalia Vitureira  
Co-orientadora: Andrea Cairus

Laboratorio de Comunicación Sináptica, Unidad Académica de  
Fisiología, Facultad de Medicina, UdelAR.

## Agradecimientos

A Nathalia, por abrirme las puertas del laboratorio, por escucharme y considerarme en cada instancia, por brindarme oportunidades, por siempre tener un consejo y una palabra de apoyo.

A Andrea, por siempre estar ahí, por enseñarme a ser un científico, por ayudarme en todo lo que podía, por siempre dar lo mejor de sí, por su paciencia y empatía.

A Josépe, por siempre estar atento y tener una palabra oportuna. A Beto y a Marce que con su buena onda siempre mejoran el día.

A Giuli, Vani, Mari, Mel, Iva y todos los del entepiso, por integrarme y hacerme sentir parte, nunca faltan las risas, ni los oídos, ni las palabras de apoyo.

A la URBE por el trabajo que realizaron con los animales.

Al Club Cannábico “La Planta” por donarnos el cannabis que se utilizó en este trabajo.

Al Departamento de Histología que muy amablemente nos permitió utilizar la sala de cultivo.

A Carmen, por enseñarme, apoyarme y ayudarme en todo lo que ha podido.

A Gabriela, por escucharme, por ayudarme a desarmar las palabras y luego volverlas a armar. Por mostrarme que la falta es un espacio para que algo nuevo se inscriba.

A mis amigos, ustedes me sostuvieron durante este proceso, fueron mi red, mi soporte, me escucharon quejarme y hablar maravillas de la carrera, me ayudaron a buscar y a construir sentido.

A Adrián, por todas las veces que me escuchó, por creer en mí, por ayudarme, por impulsarme a dar lo mejor. Por las risas, los llantos y todo lo que compartimos.

A mi hermano, que me acompañó en este proceso, que desde chiquito me está enseñando a vivir y a querer.

A mis padres, que me han apoyado en todo, me impulsan a seguir mis sueños, siempre me ayudan y me escuchan. Por enseñarme que puedo ser feliz y tener mis cosas sin hacerle mal a nadie. Que puedo construir con los demás y sin olvidar lo importante.

Este trabajo es colectivo, no hubiera sido posible sin el aporte de muchas personas, por eso agradezco muchísimo a todos los que contribuyeron en mayor o menor medida a su realización.

## Índice

|                                                                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumen.....</b>                                                                                                                                                                           | <b>4</b>  |
| <b>Introducción.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>5</b>  |
| Sistema Endocannabinoide (SEC).....                                                                                                                                                           | 5         |
| El Receptor CB1 y sus Mecanismos de Acción.....                                                                                                                                               | 6         |
| El Sistema Endocannabinoide como integrador neurofisiológico y el impacto del cannabis..                                                                                                      | 7         |
| Efecto prenatal del cannabis.....                                                                                                                                                             | 8         |
| <b>Hipótesis.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>11</b> |
| <b>Objetivo general.....</b>                                                                                                                                                                  | <b>11</b> |
| Objetivos específicos.....                                                                                                                                                                    | 11        |
| <b>Metodología.....</b>                                                                                                                                                                       | <b>11</b> |
| Muestra de cannabis.....                                                                                                                                                                      | 11        |
| Animales.....                                                                                                                                                                                 | 11        |
| Administración crónica de cannabis vaporizado.....                                                                                                                                            | 12        |
| Cultivos disociados de hipocampo.....                                                                                                                                                         | 12        |
| Preparación de placas de cultivo.....                                                                                                                                                         | 12        |
| Obtención de co-cultivos neurona/glia.....                                                                                                                                                    | 13        |
| Tratamiento con TTX.....                                                                                                                                                                      | 13        |
| Inmunocitoquímica (ICC).....                                                                                                                                                                  | 13        |
| Marcaje de células vivas con Sinaptotagmina 1.....                                                                                                                                            | 15        |
| Análisis de la abundancia de CB1R.....                                                                                                                                                        | 16        |
| Análisis de la intensidad y densidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras.....                                                                                                               | 16        |
| Caracterización del pool de reciclaje y tráfico vesicular en la terminal presináptica.....                                                                                                    | 16        |
| Análisis estadístico.....                                                                                                                                                                     | 17        |
| <b>Resultados.....</b>                                                                                                                                                                        | <b>17</b> |
| El CB1R se expresa mayormente en sinapsis inhibitoras.....                                                                                                                                    | 17        |
| La exposición prenatal a cannabis disminuye la intensidad de fluorescencia asociada a CB1R.....                                                                                               | 18        |
| La exposición prenatal a cannabis modifica la formación de contactos sinápticos excitadores e inhibidores.....                                                                                | 20        |
| La exposición prenatal a cannabis aumenta el tamaño del pool de vesículas de reciclaje y previene la plasticidad sináptica homeostática en cultivos disociados de hipocampo de las crías..... | 22        |
| Resumen de los resultados.....                                                                                                                                                                | 25        |
| <b>Discusión.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>26</b> |
| La disminución de CB1R podría ser el resultado de un mecanismo compensatorio.....                                                                                                             | 26        |
| Alteraciones en la maquinaria presináptica y el reciclaje de vesículas sinápticas.....                                                                                                        | 26        |
| La exposición prenatal a cannabis compromete la plasticidad homeostática sináptica.....                                                                                                       | 27        |
| Desbalance excitación-inhibición en la neurotransmisión hipocampal.....                                                                                                                       | 27        |
| Implicancias funcionales y conexión con patologías.....                                                                                                                                       | 29        |
| Consideraciones a futuro.....                                                                                                                                                                 | 30        |
| <b>Conclusiones.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>31</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>32</b> |

## Resumen

El cannabis, derivado del género *Cannabis*, es una de las drogas de uso adulto más consumidas. En el ámbito nacional, se ha detectado un aumento en su consumo, incluyendo mujeres embarazadas, influenciado por una baja percepción del riesgo. Esto es muy relevante ya que la exposición prenatal al cannabis se ha asociado con alteraciones cognitivas y en el desarrollo neurológico de los niños. El principal compuesto psicoactivo del cannabis,  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), actúa sobre los receptores CB1 (CB1R) del sistema endocannabinoide, clave en el desarrollo neurológico y en procesos fisiológicos.

En modelos animales, se observó que las crías de ratas expuestas prenatalmente a THC muestran menor peso al nacer y déficits en cognición, interacción social y neuroplasticidad. Hay evidencia de que la exposición prenatal a THC puede afectar el desarrollo sináptico. Sin embargo, la mayoría de estudios preclínicos han utilizado otras vías de administración como inyecciones intraperitoneales o subdérmicas, mientras que la inhalación pulmonar, común entre humanos, ha sido poco estudiada.

Este estudio se centra en evaluar los efectos de la exposición prenatal a cannabis vaporizado en la distribución y funcionalidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras del hipocampo. Se utilizaron crías neonatas de ratas derivadas de madres expuestas a cannabis vaporizado de forma crónica durante la gestación y se realizaron cultivos disociados de hipocampo los cuales se fijaron a 7 y 14 días *in vitro*.

Mediante técnicas de inmunocitoquímica, se analizó la intensidad de fluorescencia de CB1R en sinapsis excitadoras e inhibitoras, así como la abundancia y densidad de contactos sinápticos. Además, se analizó el tráfico vesicular a través del marcaje "live" de sinaptotagmina-1 para evaluar el reciclaje de vesículas sinápticas.

Los resultados revelaron una disminución en la intensidad de fluorescencia de CB1R en sinapsis excitadoras e inhibitoras. Por otra parte, se observó un aumento en el reciclaje de las vesículas sinápticas y alteraciones tanto en la abundancia como en la densidad de contactos excitadores e inhibidores. Estos cambios sugieren que la exposición prenatal a cannabis vaporizado es suficiente para promover alteraciones en la proporción y funcionalidad de las sinapsis, lo que podría impactar directamente en la fuerza sináptica de los circuitos implicados. Este estudio contribuye a la comprensión de los riesgos del consumo durante la gestación de cannabis y sus efectos en la funcionalidad del sistema nervioso.

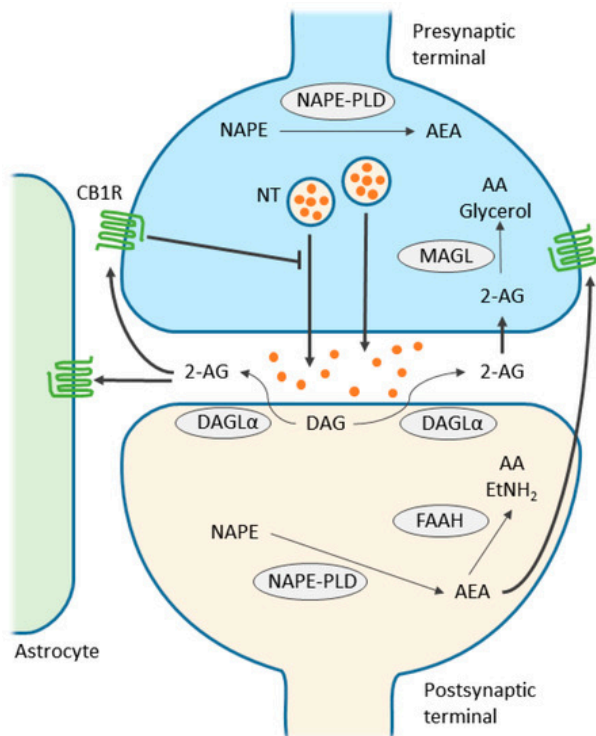
## Introducción

La palabra "cannabis" se utiliza de manera genérica para referirse a las drogas derivadas de plantas del género *Cannabis* (Small & Cronquist, 1976). Esta sustancia es una de las drogas recreativas más consumidas en todo el mundo, con un estimado de 219 millones de personas utilizando cannabis en 2021, lo que representa el 4.3% de la población adulta global (UNODC, 2023). A nivel nacional también se ha detectado un aumento en el consumo, especialmente en mujeres y mujeres embarazadas asociado a una baja percepción del riesgo (Barbié et al., 2020; Junta Nacional de Drogas, 2024). Diversas investigaciones han revelado que la exposición prenatal a cannabis puede ocasionar déficits en las funciones ejecutivas como la atención y la memoria a corto plazo, así como alteraciones en la neurotransmisión (Fried & Smith, 2001; Trezza et al., 2008).

## Sistema Endocannabinoide (SEC)

El principal compuesto psicoactivo del cannabis, el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), ejerce su acción sobre los receptores cannabinoides del sistema endocannabinoide (SEC) (Grotenhermen, 2005). Este sistema está compuesto por lípidos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido araquidónico, que actúan como neuromoduladores, junto con los receptores cannabinoides y las enzimas responsables de su síntesis y degradación (Sugiura et al., 1995). Su función es modular diversos procesos fisiológicos, como el dolor, la inflamación, el apetito y la respuesta al estrés (Grotenhermen, 2005).

Los principales mediadores lipídicos del SEC son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), que actúan sobre dos tipos principales de receptores: CB1R, ampliamente expresado en el sistema nervioso central (SNC), y CB2R, predominante en el sistema nervioso periférico y el sistema inmunológico (Lu & Mackie, 2021). La regulación de los endocannabinoides depende de enzimas como la FAAH (hidrolasa de amidas de ácidos grasos), encargada de degradar la AEA, y la MAGL (monoacilglicerol lipasa), responsable de la degradación del 2-AG (Figura 1; Zou & Kumar, 2018). Un rasgo distintivo de los endocannabinoides es su acción retrógrada: se sintetizan a demanda en la terminal postsináptica y actúan sobre los receptores presinápticos para modular la neurotransmisión (Grotenhermen, 2005; Martínez-Peña et al., 2021).



**Figura 1.** Distribución de las enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de los endocannabinoides en el sistema nervioso. Los endocannabinoides se producen en las terminales postsinápticas en respuesta a la activación neuronal. El 2-AG se sintetiza a partir de diacilglicerol (DAG) mediante la enzima diacilglicerol lipasa- $\alpha$  (DAGL $\alpha$ ), mientras que la AEA se genera a partir de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por la acción de la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD). Dado su carácter lipídico, los endocannabinoides, especialmente el 2-AG, atraviesan la membrana celular y viajan en sentido retrógrado para activar los receptores CB1 en las terminales presinápticas. La activación de CB1R inhibe la liberación de neurotransmisores al reducir la entrada de calcio. Además, el 2-AG también puede activar CB1R en los astrocitos, promoviendo la liberación de glutamato. El exceso de 2-AG en la hendidura sináptica es recaptado en la terminal presináptica y degradado por la MAGL en ácido araquidónico (AA) y glicerol. Por otro lado, la AEA, sintetizada en la terminal postsináptica, activa tanto CB1 intracelular como otros receptores no cannabinoides, como TRPV1. Aunque la señalización retrógrada es mediada principalmente por el 2-AG, la AEA también puede activar los CB1 presinápticos. La FAAH, presente principalmente en la terminal postsináptica, degrada la AEA en AA y etanolamina (EtNH<sub>2</sub>). Leyenda: Flechas delgadas: procesos enzimáticos. Flechas gruesas: translocación. Flechas con terminación roma: inhibición. *Tomado de Zou & Kumar, 2018.*

## El Receptor CB1 y sus Mecanismos de Acción

El receptor CB1 (CB1R) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) que interactúa principalmente con proteínas Gi/o, inhibiendo la adenilil ciclasa y reduciendo los niveles de AMPc, lo que conlleva a la modulación de diversas vías de señalización intracelular (Howlett et al., 2002). Su activación también suprime la entrada de calcio a través de la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), reduciendo así la liberación de neurotransmisores en la terminal presináptica (Lu & Mackie, 2021). Paralelamente, estimula canales de potasio rectificadores entrantes (GIRKs), promoviendo la hiperpolarización neuronal y modulando la excitabilidad de la célula (Lu & Mackie, 2021; Zou & Kumar, 2018).

A nivel intracelular, la activación del CB1R regula diversas cascadas de señalización, incluyendo la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como ERK1/2, p38 y JNK, que están involucradas en la proliferación celular, la plasticidad sináptica y la apoptosis (Wootten et al., 2018). También participa en la activación de la vía PI3K/Akt, que desempeña un papel crucial en la neuroprotección y la supervivencia celular, especialmente en situaciones de estrés o daño neuronal (Wootten et al., 2018). La activación de CB1R también contribuye a la neuroprotección al aumentar la expresión de BDNF (Blázquez et al., 2015). En enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Huntington, la regulación de este receptor cumple un rol en la progresión de estas patologías (Zou & Kumar, 2018). Adicionalmente, CB1R puede señalizar de manera independiente a las proteínas G a través de la vía de las  $\beta$ -arrestinas, lo que contribuye a su internalización, desensibilización y activación de rutas de señalización específicas (Nogueras-Ortiz & Yudowski, 2016).

En el sistema nervioso, el CB1R está altamente expresado en interneuronas GABAérgicas y en otros tipos neuronales, incluidas glutamatérgicas, colinérgicas, glicinérgicas y serotoninérgicas (Lu & Mackie, 2021). Se encuentra predominantemente en terminales sinápticas, donde regula la neurotransmisión, pero también en el soma, dendritas e incluso algunas mitocondrias, lo que sugiere un papel en la regulación del metabolismo energético neuronal (Zou & Kumar, 2018). Asimismo, se ha identificado la presencia funcional de CB1R en astrocitos, aunque su expresión en oligodendrocitos y microglía es menor y su función en estas células aún está en estudio (Lu & Mackie, 2021).

### **El SEC como integrador neurofisiológico y el impacto del cannabis**

El SEC regula múltiples procesos fisiológicos y neurológicos mediante su interacción con diversas vías de señalización. Su influencia va más allá del SNC, extendiéndose a tejidos periféricos como el hígado, el tejido adiposo y la piel, además de órganos reproductivos y anexos embrionarios (Lu & Mackie, 2021; Walker et al., 2019). Su expresión temprana en el desarrollo, desde los días gestacionales 12-14 en ratas (Berrendero et al., 1998; Vitalis et al., 2008) y la semana 19 en humanos (Mato et al., 2003), indica su papel clave en la maduración neuronal y la homeostasis (Walker et al., 2019).

El cannabis, a través del THC, modula el SEC al unirse a los CB1R y CB2R, ubicados en regiones cerebrales clave como el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala y los ganglios basales, así como en el sistema inmunológico y otros órganos (Grotenhermen, 2005). Su activación influye en la memoria, la regulación emocional, la coordinación motora y el metabolismo energético (Connor et al., 2021). A corto plazo, su consumo puede provocar déficits en memoria, alteraciones motoras y perceptivas, mientras que el uso crónico se asocia

con deterioro cognitivo, menor conectividad sináptica y un mayor riesgo de trastornos neuropsiquiátricos. A largo plazo, puede generar pérdida neuronal, episodios psicóticos y dependencia, con síntomas de abstinencia como irritabilidad y ansiedad (Connor et al., 2021).

### **Efecto prenatal del cannabis**

Diferentes investigaciones realizadas en seres humanos han revelado que los niños expuestos a cannabis durante el embarazo presentan alteraciones en el neurodesarrollo, un incremento en la impulsividad e hiperactividad, y una reducción en los procesos de atención y memoria (Fride et al., 2009). En términos generales, estas alteraciones no se han asociado con complicaciones graves durante el embarazo ni con malformaciones en el neonato al momento del parto, y tampoco están asociadas con menor cociente intelectual (IQ) en etapas posteriores del desarrollo. No obstante, se han observado alteraciones leves durante la etapa neonatal, como un aumento en los temblores, acompañados de sobresaltos o patrones de sueño alterados (Fried & Smith, 2001; Trezza et al., 2008).

A pesar de estos reportes, existen algunas discrepancias en los informes sobre el consumo de cannabis durante el embarazo en humanos. Mientras algunos estudios sugieren una asociación entre el consumo prenatal de cannabis y resultados adversos, como parto prematuro (Varner et al., 2014) y bajo peso al nacer (Hatch & Bracken, 1986), otros estudios no encuentran tales asociaciones (Mark et al., 2016). Esta disparidad puede atribuirse a variables relacionadas con factores sociodemográficos, como el estado nutricional materno, el consumo de otras sustancias junto con el cannabis, así como la potencia, frecuencia y duración del uso de cannabis. Otro factor importante es el método de consumo, siendo la inhalación pulmonar la vía principal en humanos (Moore et al., 2022).

Con respecto a esto, los modelos animales resultan ideales para explorar los efectos de la exposición prenatal sin contar con las variables propias de los estudios en humanos. De acuerdo con lo reportado en humanos, las crías de ratas expuestas prenatalmente al cannabis vaporizado poseen un menor peso al nacer (Weimar et al., 2023). Además, se han descrito alteraciones cognitivas y de interacción social (Trezza et al., 2008), y se ha vinculado con un deterioro en la neuroplasticidad, en la regulación emocional y en la memoria límbica (Castelli et al., 2023). Otros estudios han relacionado la exposición prenatal al agonista sintético WIN55,212-2 (WIN) del CB1R con alteraciones en el hipocampo, en la retención de memoria y particularmente, con un déficit en la potenciación a largo plazo (LTP) (Mereu et al., 2003; Pinky et al., 2023).



Por otro lado, estudios *in vitro* han revelado una disminución en la liberación de glutamato en cultivos de células del hipocampo obtenidos de crías nacidas de madres expuestas a WIN (Mereu et al., 2003). Además, otras investigaciones que utilizaron el mismo agonista en exposiciones prenatales, encontraron posteriormente en cerebros fijados alteraciones en la migración y proliferación de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Saez et al., 2014). En Vargish y cols. (2017) se encontró menor densidad y complejidad dendrítica en interneuronas que expresan el neuropéptido colecistoquinina (CCK), junto con alteraciones en su funcionalidad. Otras investigaciones reportaron que en neuronas de ratón la activación aguda de CB1R aumenta la cantidad de vesículas reclutadas en la terminal presináptica y lo vinculan con fosforilación dependiente de AMPc de las sinapsinas (Patzke et al., 2021).

La mayoría de los estudios preclínicos sobre los efectos del cannabis utilizan agonistas sintéticos y vías de administración que no reflejan el consumo humano habitual, como la vía oral o las inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. En contraste, la inhalación pulmonar es la principal forma de consumo en humanos, pero son escasos los estudios que emplean esta vía, especialmente en contextos de exposición prenatal. A pesar de esta limitación, algunos trabajos que utilizaron vaporización han demostrado que la exposición aguda en ratas adultas puede inducir alteraciones en la actividad electrocortical y en los períodos REM y no REM del sueño (Mondino et al., 2019), además de provocar hipotermia, hipolocomoción, hiperfagia y déficits en memoria y aprendizaje (Moore et al., 2022).

Más recientemente, estudios que han empleado la exposición prenatal a cannabis vaporizado (EPCV) en ratas reportaron alteraciones significativas en el comportamiento de la descendencia. En particular, se observaron déficits en la sociabilidad, donde las crías de madres expuestas emitieron una mayor cantidad de vocalizaciones ultrasónicas inducidas por aislamiento, indicativo de una mayor reactividad emocional y mostraron una menor frecuencia de comportamientos sociales investigativos (Weimar et al., 2020). Por otro lado, mediante el uso del laberinto acuático de Morris se identificaron alteraciones en la memoria espacial y de trabajo (Lei et al., 2023). Finalmente, a través de la prueba de Atención Basada en Objetos, se reportaron déficits atencionales durante la adolescencia en las crías de madres expuestas (Penman et al., 2024).

En resumen, el aumento del consumo de cannabis a nivel nacional —especialmente entre mujeres embarazadas y acompañado de una baja percepción del riesgo— (Barbié et al., 2020; Junta Nacional de Drogas, 2024), junto con la escasez de estudios que emplean cannabis en su forma natural y utilicen la inhalación pulmonar como vía de administración, motivaron la realización de este trabajo.

Dada la abundante bibliografía que describe déficits en la neurotransmisión y la memoria asociados a la exposición prenatal a cannabinoides (Vargish et al., 2017; Mereu et al., 2003; Saez et al., 2014), nos propusimos analizar el efecto de la EPCV en crías neonatas, mediante cultivos de hipocampo de ratas y la evaluación de distintos componentes involucrados en la funcionalidad sináptica. Específicamente nos centramos en los siguientes marcadores:

Dado que el cannabis ejerce sus efectos principalmente a través del CB1R (Zou & Kumar, 2018), su estudio resulta clave para comprender los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales la exposición prenatal a cannabis puede afectar el desarrollo y la funcionalidad de los circuitos neuronales. Además, alteraciones en la expresión o localización de CB1R podrían reflejar procesos compensatorios o disfunciones en la señalización endocannabinoide, con potencial impacto en la plasticidad sináptica y el comportamiento de la descendencia.

En segundo lugar, nos planteamos realizar un análisis global de proteínas transportadoras específicas de sinapsis excitadoras (como vGlut1) e inhibitoras (como vGat) lo que permite caracterizar el equilibrio entre los dos principales tipos de transmisión sináptica en el sistema nervioso central. Este balance excitación/inhibición es fundamental para el desarrollo y funcionamiento adecuado de los circuitos neuronales, y su alteración se ha asociado con diversas patologías neuropsiquiátricas (Gao et al., 2015; Bozzi et al., 2018). En el contexto de la exposición prenatal a cannabis, resulta particularmente relevante evaluar si existen modificaciones en la proporción o densidad de estos marcadores, ya que el sistema endocannabinoide regula activamente la liberación sináptica y la formación de conexiones neuronales durante el desarrollo (Lu & Mackie, 2021). Así, el estudio conjunto de vGlut1 y vGat permite obtener una visión más completa de los posibles desajustes sinápticos inducidos por la exposición, aportando evidencia sobre los mecanismos neurobiológicos subyacentes.

Por último, nos interesaba la sinaptotagmina-1 (Stg-1), un sensor de calcio fundamental para la liberación rápida de neurotransmisores, ya que actúa como un componente central de la maquinaria presináptica que regula la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática (Geppert et al., 1994). Su estudio resulta especialmente relevante en el contexto de la exposición prenatal a cannabis, dado que se ha demostrado que la señalización endocannabinoide modula la liberación sináptica tanto excitadora como inhibitora (Lu & Mackie, 2021). Evaluar los niveles de Stg-1 permite explorar si la exposición altera aspectos funcionales de la sinapsis presináptica, y podría contribuir a comprender mecanismos compensatorios o adaptativos frente a perturbaciones en la actividad sináptica inducidas por la modulación de CB1R. Por tanto, el análisis de Stg-1 ofrece una vía para estudiar no sólo la

presencia de sinapsis, sino su funcionamiento. A partir de esto, planteamos la siguiente hipótesis y objetivos.

### **Hipótesis**

Postulamos que la EPCV altera, tanto estructural como funcionalmente, a los contactos sinápticos del hipocampo.

### **Objetivo general**

Evaluar el impacto de la EPCV en sinapsis hipocampales de rata *in vitro*.

### **Objetivos específicos**

Luego del tratamiento crónico con cannabis vaporizado nos proponemos:

- 1- Caracterizar la abundancia del receptor CB1.
- 2- Analizar la formación de sinapsis excitadoras e inhibitoras.
- 3- Caracterizar la funcionalidad sináptica.

### **Metodología**

#### **Muestra de cannabis**

Actualmente el Laboratorio de Comunicación Sináptica dispone de flores frescas de *Cannabis sativa* L. que fueron donadas por el club cannábico "La Planta". En colaboración con el Dr. Carlos García del Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Química de la UdelaR, se determinó que dichas flores contienen un 14,7% de THC total y <0,05% de cannabidiol (CBD). Para la realización de este proyecto se cuenta con licencia de investigación otorgada por el Instituto de Regulación y Control de Cannabis (IRCCA) a Nathalia Vitoreira, como responsable científica, con fecha del 29/4/2022.

#### **Animales**

Se emplearon ratas de la cepa Sprague-Dawley provenientes de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, Udelar. Se seleccionaron hembras en proestro mediante frotis y se colocaron con los machos durante una noche para confirmar el estado de gestación de manera precisa.

Los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum* y se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad invertido 12/12 hrs y temperatura controlada ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Todos los procedimientos experimentales contaron con la aprobación de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Medicina (nº de protocolo 070151-000003-22, “Efecto de la exposición prenatal a cannabis vaporizado en el desarrollo y funcionalidad del sistema nervioso”. Responsable: Nathalia Viturera).

### **Administración crónica de cannabis vaporizado**

Se empleó un enfoque experimental *in vivo*, utilizando una cámara de vaporización que permite exponer a las ratas gestantes al cannabis vaporizado.

Para las sesiones experimentales, se siguió el protocolo de experimentación descrito por Mondino y colaboradores (2019). Brevemente, la cámara de vaporización consiste en una caja de plástico de 4,6 litros de capacidad conectada a un vaporizador (Herbalizer HA, Clovershield, Inc., CA, EE.UU.) donde se colocaban las flores de cannabis. Durante cada sesión experimental, una única rata fue colocada en la cámara por un período de 10 minutos, utilizando dosis de 200 mg de flores de cannabis vaporizado en cada sesión, la dosis utilizada se tomó de Mondino y cols. (2019). En el caso del grupo control, se replicó el procedimiento, pero se utilizó aire en lugar de cannabis. Con el objetivo de realizar una exposición crónica al cannabis en las ratas gestantes, este protocolo se repitió cada 24 horas desde el día E8 hasta E21.

Todos los procedimientos de vaporización se realizaron bajo una campana de extracción de gases, y la cámara de vaporización fue limpiada con alcohol 30% antes de colocar al siguiente animal.

### **Cultivos disociados de hipocampo**

#### **Preparación de placas de cultivo**

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio (12 mm, espesor N°0), previamente tratados mediante el siguiente protocolo: inmersión en ácido nítrico durante toda la noche, seguido de 20 lavados con agua desionizada y 15 lavados con etanol al 95-99%. Posteriormente, los cubreobjetos se almacenaron en etanol al 99% hasta su uso. Antes de la siembra celular, los cubreobjetos tratados se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos y se recubrieron con poli-D-lisina (20  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) en PBS durante la noche.

## **Obtención de co-cultivos neurona/glia**

Tras la decapitación de los animales neonatos, los cerebros fueron extraídos en una cámara de flujo laminar y transferidos a un medio de disección compuesto por HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco) y HEPES (10 mM, Sigma) a 4 °C. A continuación, se realizó la disección de los hipocampos, los cuales fueron seccionados en fragmentos de 4 a 6 partes y sumergidos en 3 ml de una solución enzimática que contenía: papaína (20 U, Sigma), EDTA (0.5 mM),  $\text{CaCl}_2$  (1.5 mM), L-cisteína (0.2 mg/ml) y DNasa (0.1 mg/ $\mu\text{l}$ ). La digestión enzimática se llevó a cabo mediante una incubación de 18 minutos a 37 °C.

Posteriormente, el tejido fue lavado dos veces con medio de glía BME (Basal Medium Eagle, Gibco), suplementado con glucosa (16 mM, Sigma), suero bovino fetal (FBS, 10%, Gibco), piruvato (1 mM, Gibco), HEPES (0.01 M, Sigma) y penicilina/estreptomicina (100 U/ml; 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Gibco). Luego, se realizó la disgregación mecánica del tejido en 2 ml de medio de neurona NB (Neurobasal, Gibco), suplementado con glucosa (34 mM), B27 (2.5%, Gibco), GlutaMAX (2 mM, Gibco) y penicilina/estreptomicina (100 U/ml; 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Gibco). El volumen se ajustó a 5 ml y la suspensión celular se centrifugó a 1000 RPM durante 5 minutos (min).

El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de medio de neurona, y las células fueron contadas utilizando la cámara de Neubauer con azul de tripán (5%) para diferenciar las células viables de las no viables. Se sembraron  $6 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos (Greiner BIO-ONE, #662160) y se mantuvieron en estufa a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Transcurridos 4 días desde la siembra, los co-cultivos fueron tratados con el antimitótico citosina- $\beta$ -D-arabinofuranósido (AraC, 4  $\mu\text{M}$ ) para prevenir el crecimiento excesivo de células gliales. Finalmente, las células fueron incubadas en una estufa de  $\text{CO}_2$  durante 14-15 días in vitro (DIV).

## **Tratamiento con TTX**

Tras 14-15 DIV, los cultivos fueron tratados durante 24-48 horas con tetrodotoxina (TTX, 1  $\mu\text{M}$ ), un bloqueante específico de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, con el objetivo de inducir la plasticidad sináptica homeostática (PSH). Paralelamente, se utilizaron cultivos no tratados como control de la función sináptica basal.

## **Inmunocitoquímica (ICC)**

Los cultivos de 7 y 14 DIV fueron fijados con paraformaldehído (PFA, 4%) durante 15 min a temperatura ambiente (TA). Tras la fijación, las células fueron permeabilizadas con PBS-Tritón

0,1% y bloqueadas durante 30 min a TA con una solución de PBS-Tritón 0,1% que contenía 0,2 M de glicina y 10% de suero bovino fetal (FBS).

Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-Tritón 0,1% con 5% de FBS y se incubaron durante 2 horas (h) a TA. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS-Tritón 0,1% (5 min por lavado) y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos en PBS-Tritón 0,1% con 5% de FBS durante 1h a TA. Finalmente, se realizaron lavados sucesivos con PBS-Tritón 0,1% y PBS, y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando medio de montaje de base acuosa (Fluoromount™; Sigma). Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio confocal (Leica TCS SP5 II, Facultad de Medicina) y se analizaron utilizando el software FIJI (ImageJ, versión 1.54p). El diseño experimental se detalla en la **Figura 2**. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, junto con sus respectivas diluciones, se detallan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Detalle de los anticuerpos utilizados en el ensayo de inmunocitoquímica.

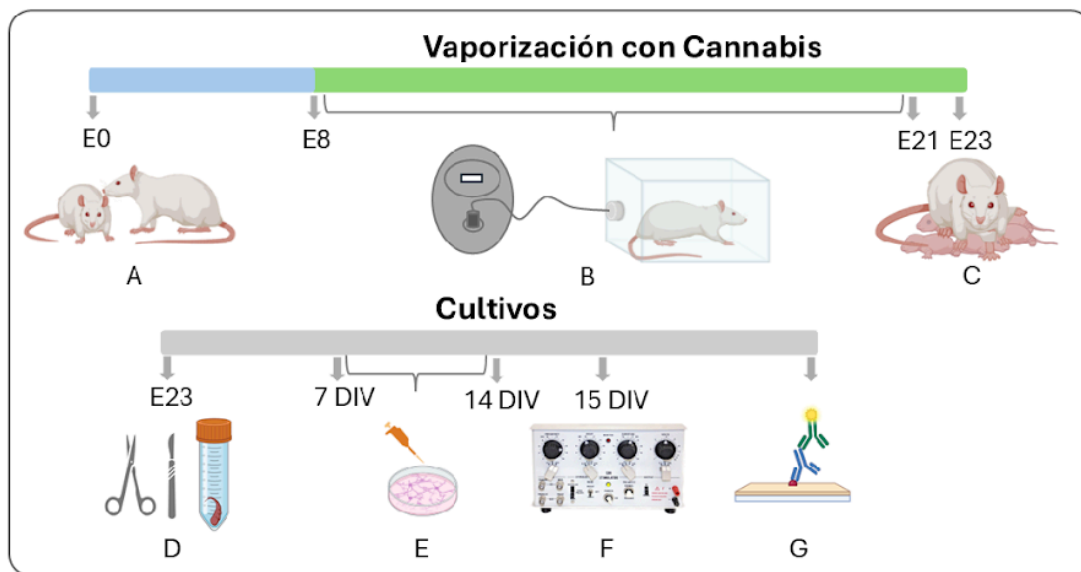
| Anticuerpo                                                           | Especie | Casa comercial y N° de catálogo | Dilución | Descripción                                                    |
|----------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ CB1R                                                        | Ratón   | Synaptic System #258011         | 1:3000   | Receptor del sistema endocannábico de tipo 1.                  |
| $\alpha$ vGAT                                                        | Ratón   | Synaptic System #131011         | 1:500    | Transportador vesicular de GABA.                               |
| $\alpha$ vGAT                                                        | Conejo  | Synaptic System #131003         | 1:500    | Transportador vesicular de GABA.                               |
| $\alpha$ vGlut1                                                      | Conejo  | Synaptic System #135303         | 1:7000   | Transportador vesicular de glutamato-1.                        |
| $\alpha$ MAP2                                                        | Pollo   | Abcam #ab5392                   | 1:3000   | Proteína asociada a microtúbulos.                              |
| $\alpha$ Stg-1                                                       | Conejo  | Synaptic System #105102         | 1:100    | Sinaptotagmina-1                                               |
| IgY H&L (Alexa Fluor® 647) preadsorbed                               | Cabra   | Abcam #ab150175                 | 1:300    | Anticuerpo secundario anti-pollo conjugado a Alexa Fluor 647.  |
| IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488        | Cabra   | Invitrogen #A11001              | 1:500    | Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488   |
| IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488        | Cabra   | Invitrogen #A11070              | 1:500    | Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488. |
| IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568 | Burro   | Invitrogen #A10037              | 1:500    | Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 568   |
| IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568        | Cabra   | Invitrogen #A11011              | 1:500    | Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 568. |

## Marcaje de células vivas con Sinaptotagmina 1

Para el marcaje *in vivo* con el anticuerpo dirigido contra el dominio luminal de Stg-1 (1:100, Synaptic System), los co-cultivos de 15 DIV fueron expuestos a un estímulo eléctrico de 600 PA a 10 Hz por 60 s en presencia del anticuerpo a TA. Este estímulo fue suficiente para inducir la exocitosis de las vesículas sinápticas (VS) del pool de reciclaje. Se siguieron los protocolos descritos en Rafael y cols. (2024) y Vitureira y cols. (2012)

Durante la estimulación, los co-cultivos se mantuvieron en una solución extracelular basal (EBS) con un pH de 7,4 y una osmolaridad de 300 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O, compuesta por (en mM): 130 NaCl, 2,5 KCl, 2,2 CaCl<sub>2</sub>, 1,5 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glucosa y 10 HEPES. Tras la estimulación, los co-cultivos se dejaron en reposo durante 60 s para permitir la endocitosis compensatoria y la consecuente internalización del anticuerpo.

Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con EBS, fijadas con PFA al 4% y montadas según el protocolo previamente descrito, para la posterior adquisición de imágenes mediante microscopía confocal.



**Figura 2. Esquematización de la metodología de trabajo.** (A) Se colocan machos con hembras durante 24 hs, (B) Se vaporizan los animales cada 24 hs por 10 min con 200 mg de cannabis, (C) Nacimiento de crías. (D) Se realiza la disección del hipocampo y los cultivos, (E) Se fijan cultivos a 7 y 14 DIV, (F) Tratamos con TTX 24 hs antes, luego realizamos un marcaje “live” de Stg-1 y posterior fijación con PFA, (G) Se realizan ICC.

## **Análisis de la abundancia de CB1R**

Se llevaron a cabo triple ICC utilizando anticuerpos específicos. En primer lugar, anticuerpos anti-CB1R, anti-vGlut1 que detecta al transportador de glutamato presente en las VS y anti-MAP2 específico contra la proteína asociada a microtúbulos presente en el soma y las dendritas de las neuronas. Por otro lado, se realizaron triple ICC con anticuerpos anti-CB1R anti-vGat específico contra el transportador de GABA presentes en las terminaciones de las neuronas GABAérgicas y anti-MAP2. Estas ICC se realizaron en cultivos a 14 DIV provenientes de animales control y prenatalmente expuestos a cannabis

La cuantificación de la expresión proteica se realizó a partir de la medición de la intensidad de fluorescencia. Esta se considera una aproximación válida para estimar niveles relativos de proteína, dado que la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos a la proteína de interés, bajo condiciones experimentales estandarizadas (Taylor & Levenson, 2006).

Para cuantificar la expresión de CB1R por campo medimos la media intensidad de fluorescencia en áreas de  $0.024\text{mm}^2$ . Para la cuantificación en contactos sinápticos excitadores o inhibidores, primero se definieron los contactos sinápticos como aquellos puntos positivos para CB1R y que presenten superposición parcial o completa con vGlut1 o vGAT, y que estén localizados sobre dendritas positivas para MAP2. Para cada contacto sináptico se cuantificó la intensidad media de fluorescencia asociada a CB1R, tanto en sinapsis excitadoras como inhibitoras, mediante la utilización del software FIJI (ImageJ, versión 1.54p).

## **Análisis de la intensidad y densidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras**

A 7 y 14 DIV se realizaron triple ICC utilizando anticuerpos anti-vGlut1, anti-vGat y anti-MAP2 y se cuantificó a) la densidad de contactos vGlut o vGAT- positivos en aposición con las dendritas marcadas con MAP2 y b) intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 y vGAT, para estimar cambios en la función sináptica basal, utilizando el software FIJI (ImageJ, versión 1.54p).

## **Caracterización del pool de reciclaje y tráfico vesicular en la terminal presináptica**

Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente para marcaje “live” de Stg-1, los contactos sinápticos se definieron como aquellos puntos Stg-1-positivos localizados sobre dendritas MAP2-positivas.



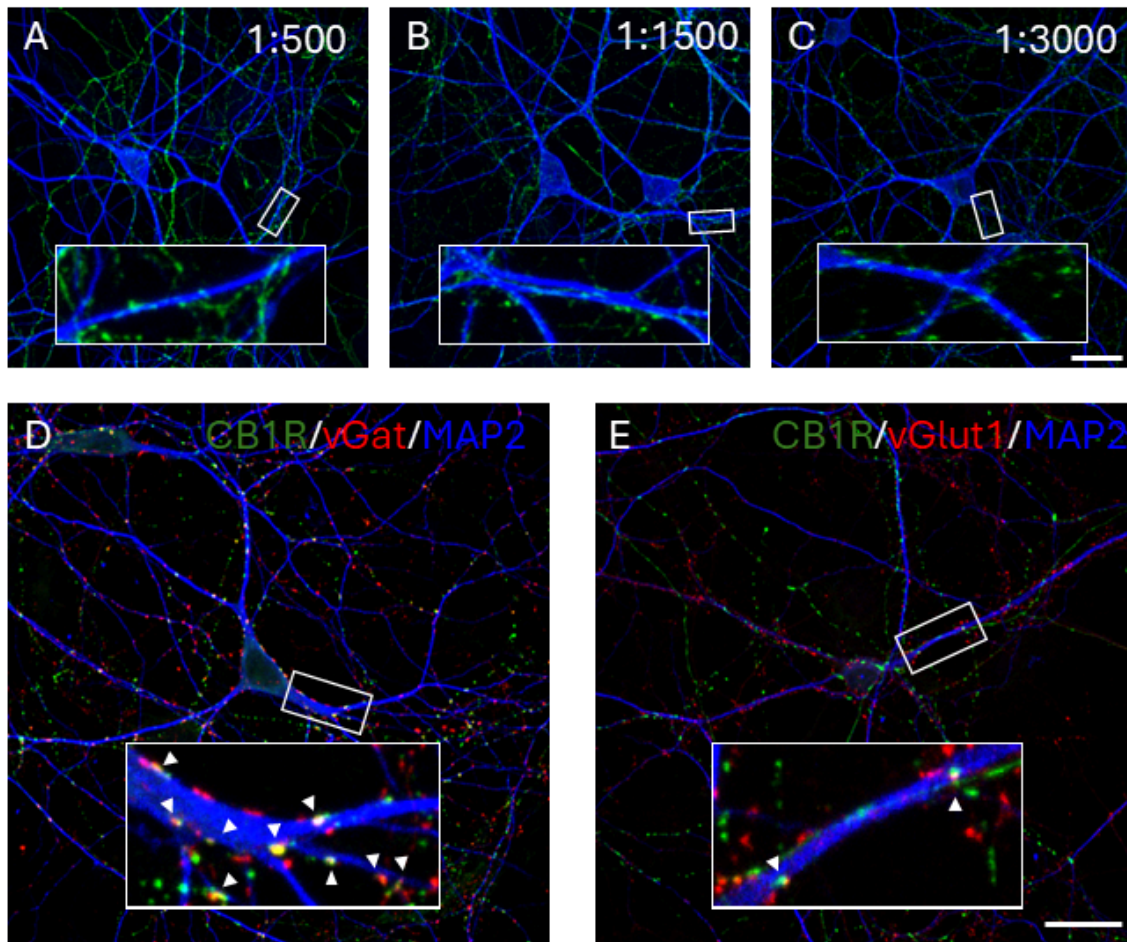
## **Análisis estadístico**

Todos los datos experimentales se analizaron utilizando GraphPad Prism 8 (California Corporation). Se evaluó la distribución de los datos mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. Si los datos seguían una distribución normal, se aplicaron pruebas paramétricas, como la prueba t de Student o ANOVA seguido de la prueba de Tukey, y los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. En caso de que los datos no cumplieran con los criterios de normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U, y los resultados se presentan como mediana (rango intercuartil). Para cada experimento, se comparó el grupo control con los grupos experimentales. La prueba estadística utilizada en cada análisis se indica en el texto y/o en las leyendas de las figuras. Se consideró significancia estadística para  $p < 0.05$ . En las figuras: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; ns: estadísticamente no significativo.

## **Resultados**

### **El CB1R se expresa mayormente en sinapsis inhibitoras**

Para alcanzar el objetivo específico 1, se realizaron triple ICC en cultivos de hipocampo de 14 DIV, siguiendo lo detallado en la metodología para CB1R. Inicialmente probamos distintas diluciones del anticuerpo contra CB1R, seleccionando la dilución 1:3000 por ser la que permitió una mejor individualización del receptor a nivel sináptico (Figura 3, A, B y C). Por otro lado, observamos la presencia de CB1R en neuronas hipocampales, con un marcaje preferentemente axonal, debido a que su expresión no coincidía en su mayoría con MAP2. Además, cualitativamente se observa que el CB1R está presente tanto en sinapsis excitadoras (vGlut1 positivas) como inhibitoras (vGat positivas) aunque en mayor proporción en estas últimas (Figura 3, D y E).

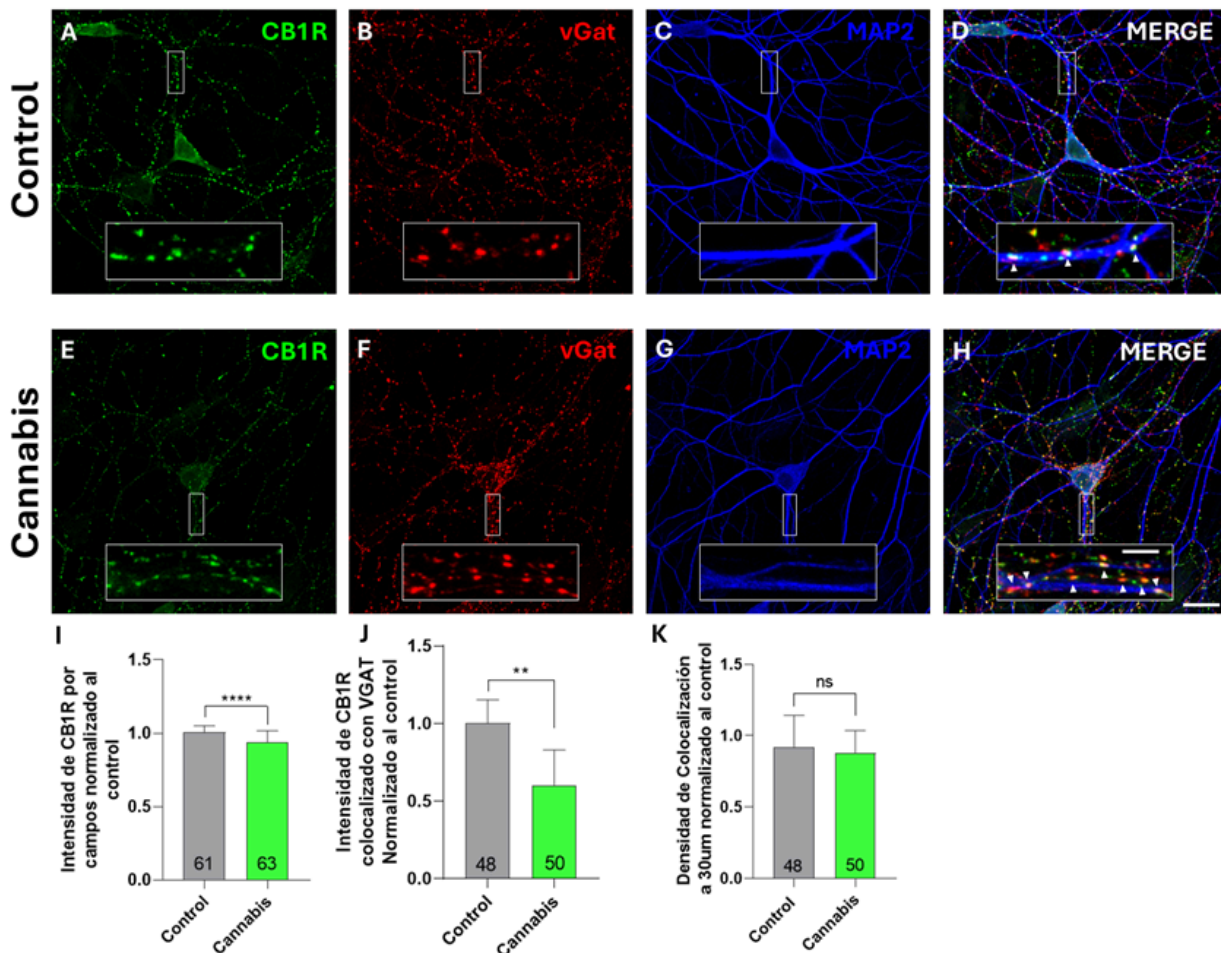


**Figura 3. CB1R se expresa en neuronas hipocámpales tanto en sinapsis excitadoras como inhibitoras, aunque con mayor presencia en estas últimas.** Imágenes representativas de distintas diluciones del anticuerpo contra CB1R (verde): 1:500 (A), 1:1500 (B) y 1:3000 (C), junto con MAP2 (azul). En (D), se muestra un triple marcaje con CB1R (verde), vGat (rojo) y MAP2 (azul) para sinapsis inhibitoras; y en (E), un triple marcaje con CB1R (verde), vGlut1 (rojo) y MAP2 (azul) para sinapsis excitadoras. Las barras de escala corresponden a 20  $\mu$ m, y en las regiones ampliadas (4X), a 5  $\mu$ m. Las flechas indican botones sinápticos con colocalización parcial o total entre CB1R y vGAT o entre CB1R y vGlut1.

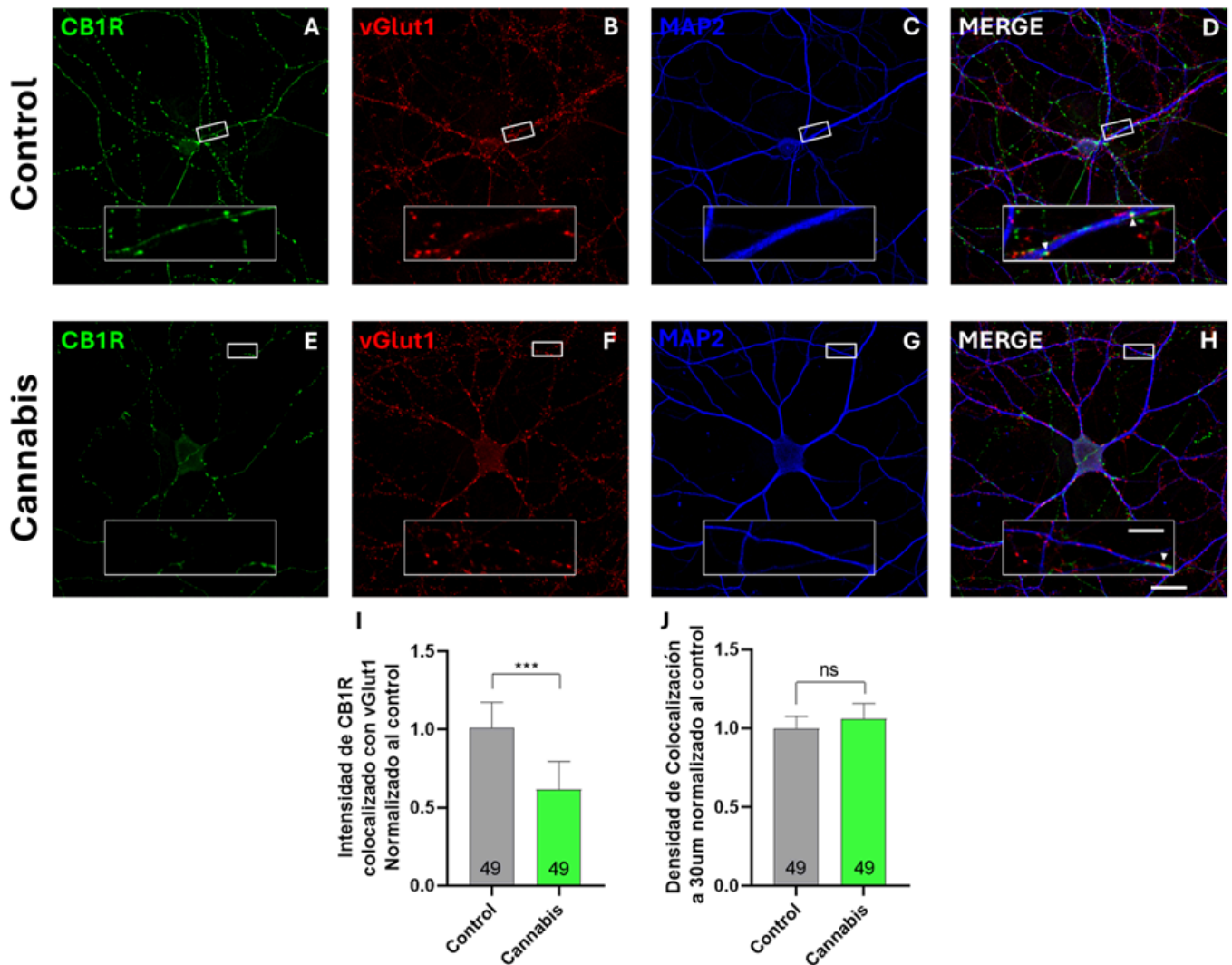
### La EPCV disminuye la intensidad de fluorescencia asociada a CB1R

A continuación analizamos la abundancia de CB1R total en cultivos disociados de hipocampo (14DIV). Así, observamos una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia asociada a este marcador por campo (Figura 4I) (control:  $1,00 \pm 0,01$ ; cannabis:  $0,93 \pm 0,02$ ;  $p < 0,0001$ , datos normalizados al control). Luego, investigamos la abundancia y densidad del CB1R en sinapsis excitadoras e inhibitoras. Para ello, cuantificamos la intensidad y densidad de fluorescencia asociada a CB1R que colocaliza parcial o completamente con vGat o vGlut1. Evidenciamos una disminución estadísticamente significativa en la abundancia de CB1R en sinapsis inhibitoras en cultivos control en comparación con cultivos derivados de hembras tratadas prenatalmente con cannabis (Figura 4J) (control:  $1,00 \pm 0,03$ ; cannabis:  $0,65 \pm 0,04$ ;  $p < 0,01$ , datos normalizados al control). Sin embargo, no se observaron diferencias en la

densidad de puntos CB1R/vGat positivos entre condiciones (Figura 4K) (control:  $1,00 \pm 0,05$ ; cannabis:  $0,87 \pm 0,05$ ; ns,  $p > 0,05$ ). Asimismo, observamos una disminución en la intensidad de fluorescencia asociada a CB1R que colocaliza con vGlut1 (Figura 5I) (control:  $1,00 \pm 0,04$ ; cannabis:  $0,65 \pm 0,04$ ;  $p < 0,001$ , datos normalizados al control). No obstante, la densidad de esta señal no mostró diferencias significativas (Figura 5J) (control:  $1.00 \pm 0.07$ ; cannabis:  $1.06 \pm 0,10$ ; ns,  $p > 0,05$ ).



**Figura 4. La EPCV reduce la intensidad de fluorescencia de CB1R en sinapsis inhibitoras.** Imágenes representativas de co-cultivos control (A-D) y expuestos a cannabis (E-H). Se utilizó un triple marcaje para CB1R (verde), vGat (rojo) y MAP2 (azul). (I) Cuantificación de la intensidad de CB1R por campo normalizado al control. (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CB1R colocalizado con vGat, normalizada con respecto al control. (K) Cuantificación de la densidad de colocalización normalizada a 30 μm. Las barras de calibración corresponden a 20 μm y, en la región ampliada (4X), a 5 μm. Los números dentro de las barras indican la cantidad de neuronas analizadas por condición, en 3-4 experimentos independientes. Las flechas señalan botones sinápticos con colocalización parcial o total de CB1R y vGat en la imagen combinada (Merge).  $p^{**} < 0,01$ ; ns: estadísticamente no significativo (prueba de Mann-Whitney).



**Figura 5. La EPCV reduce la intensidad de fluorescencia de CB1R en sinapsis excitadoras.** Imágenes representativas de co-cultivos control (A-D) y expuestos a cannabis (E-H). Se utilizó un triple marcaje para CB1R (verde), vGlut1 (rojo) y MAP2 (azul). (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CB1R colocalizado con vGlut1, normalizada con respecto al control. (J) Cuantificación de la densidad de colocalización normalizada a 30 μm. Las barras de calibración corresponden a 20 μm y, en la región ampliada (4X), a 5 μm. Los números dentro de las barras indican la cantidad de neuronas analizadas por condición, en 3 experimentos independientes. Las flechas señalan botones sinápticos con colocalización parcial o total de CB1R y vGlut1 en la imagen combinada (Merge). p \*\*\* < 0,001; ns: estadísticamente no significativo (prueba de Mann-Whitney).

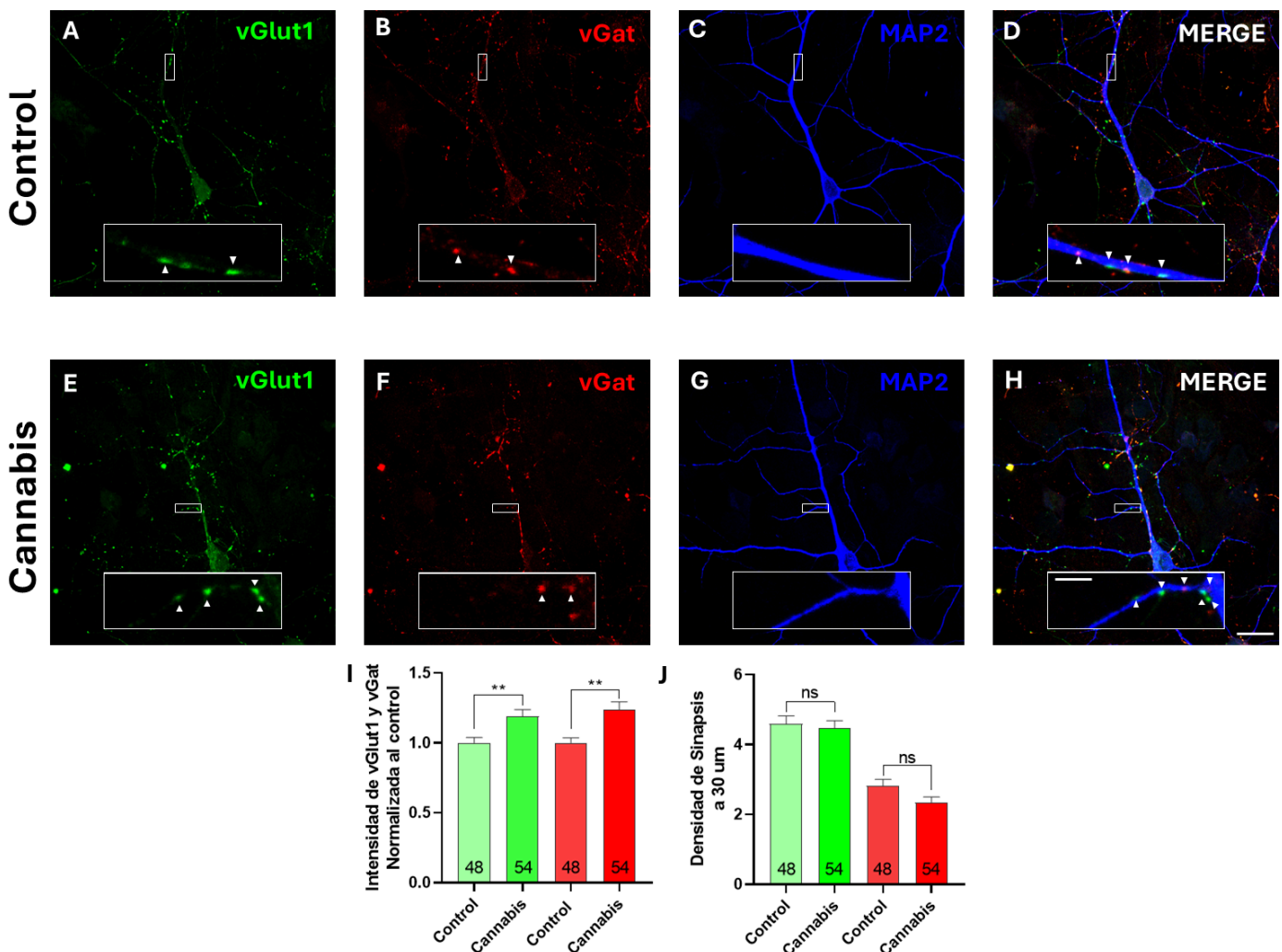
### La EPCV modifica la formación de contactos sinápticos excitadores e inhibidores

Para determinar el impacto de la EPCV en la formación de contactos sinápticos excitadoras e inhibitoras, se realizó una triple ICC para vGlut1, vGat y MAP2 y se analizó la densidad de estos contactos (vGlut1 y vGat-positivos, respectivamente, con superposición parcial o completa con dendritas MAP2 positivas) en cocultivos de hipocampo a 7 y 14 DIV.

A 7 DIV, se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia asociada a vGlut1 (Figura 6, I) (control:  $1,00 \pm 0,04$ ; cannabis:  $1,19 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) y de manera similar

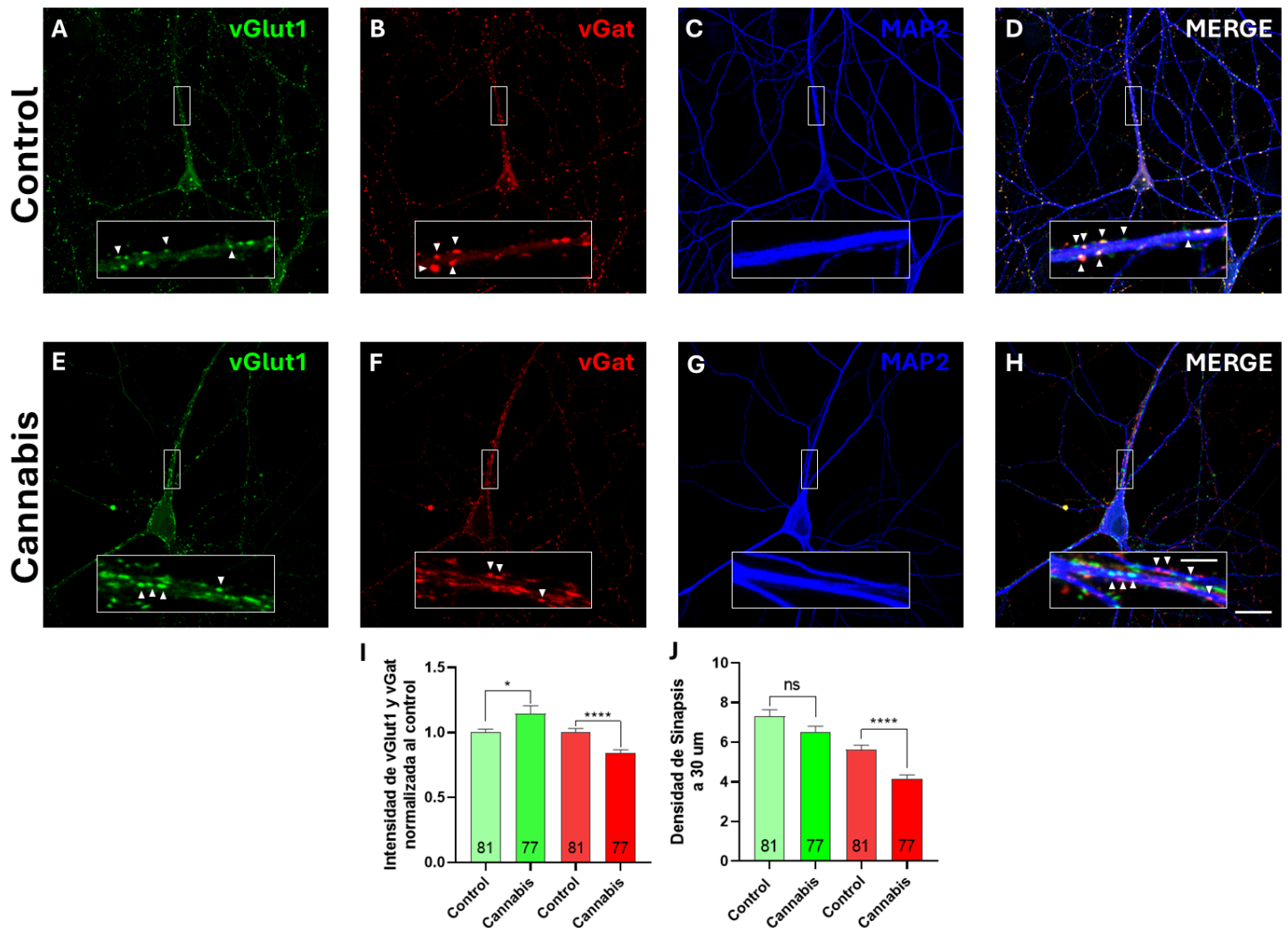


encontramos un incremento en la intensidad de vGat (Figura 6, I) (control:  $1,00 \pm 0,03$ ; cannabis:  $1,24 \pm 0,06$ ;  $p < 0,01$ ), aunque no se encontraron cambios en la densidad de contactos sinápticos excitadores (Figura 6, J) (control:  $4,59 \pm 0,22$ ; cannabis:  $4,47 \pm 0,21$ ;  $p > 0,05$ ) ni inhibidores (Figura 6, J) (control:  $2,81 \pm 0,19$ ; cannabis:  $2,35 \pm 0,15$ ;  $p > 0,05$ ). A 14 DIV, la abundancia de vGlut1 permaneció elevada (Figura 7, I) (control:  $1,00 \pm 0,03$ ; cannabis:  $1,14 \pm 0,06$ ;  $p < 0,05$ ), mientras que en contraste la intensidad de vGat se redujo significativamente (Figura 7, I) (control:  $1,00 \pm 0,03$ ; cannabis:  $0,84 \pm 0,02$ ;  $p < 0,0001$ ). Además, se evidenció una disminución en la densidad de sinapsis inhibitoras (Figura 7, J) (control:  $5,62 \pm 0,22$ ; cannabis:  $4,16 \pm 0,19$ ;  $p < 0,0001$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas en la densidad de sinapsis excitadoras (Figura 7, J) (control:  $7,32 \pm 0,32$ ; cannabis:  $6,53 \pm 0,28$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 6. La EPCV altera la abundancia de vGlut1 y vGat en cultivos de 7 DIV.** Imágenes representativas de co-cultivos control (A-D) y expuestos a cannabis (E-H). Se utilizó un triple marcaje para vGlut1 (verde), vGat (rojo) y MAP2 (azul) en cultivos 7 DIV. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de vGlut1 en verde y vGat en rojo, normalizada con respecto al control. (J) Cuantificación de la densidad de sinapsis normalizada a 30 μm de vGlut1 en verde y vGat en rojo. Las barras de calibración corresponden a 20 μm y, en la región ampliada (4X), a 5 μm. Los

números dentro de las barras indican la cantidad de neuronas analizadas por condición, en 3 experimentos independientes. Las flechas señalan botones sinápticos positivos para vGlut1 (A,E), para vGat (B,F) y que poseen colocación total o parcial con MAP2 (Merge).  $p^{**} < 0,01$ ; ns: estadísticamente no significativo (prueba de t-student).



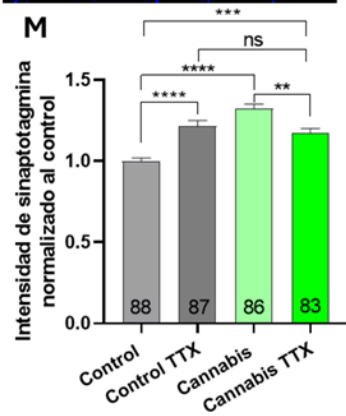
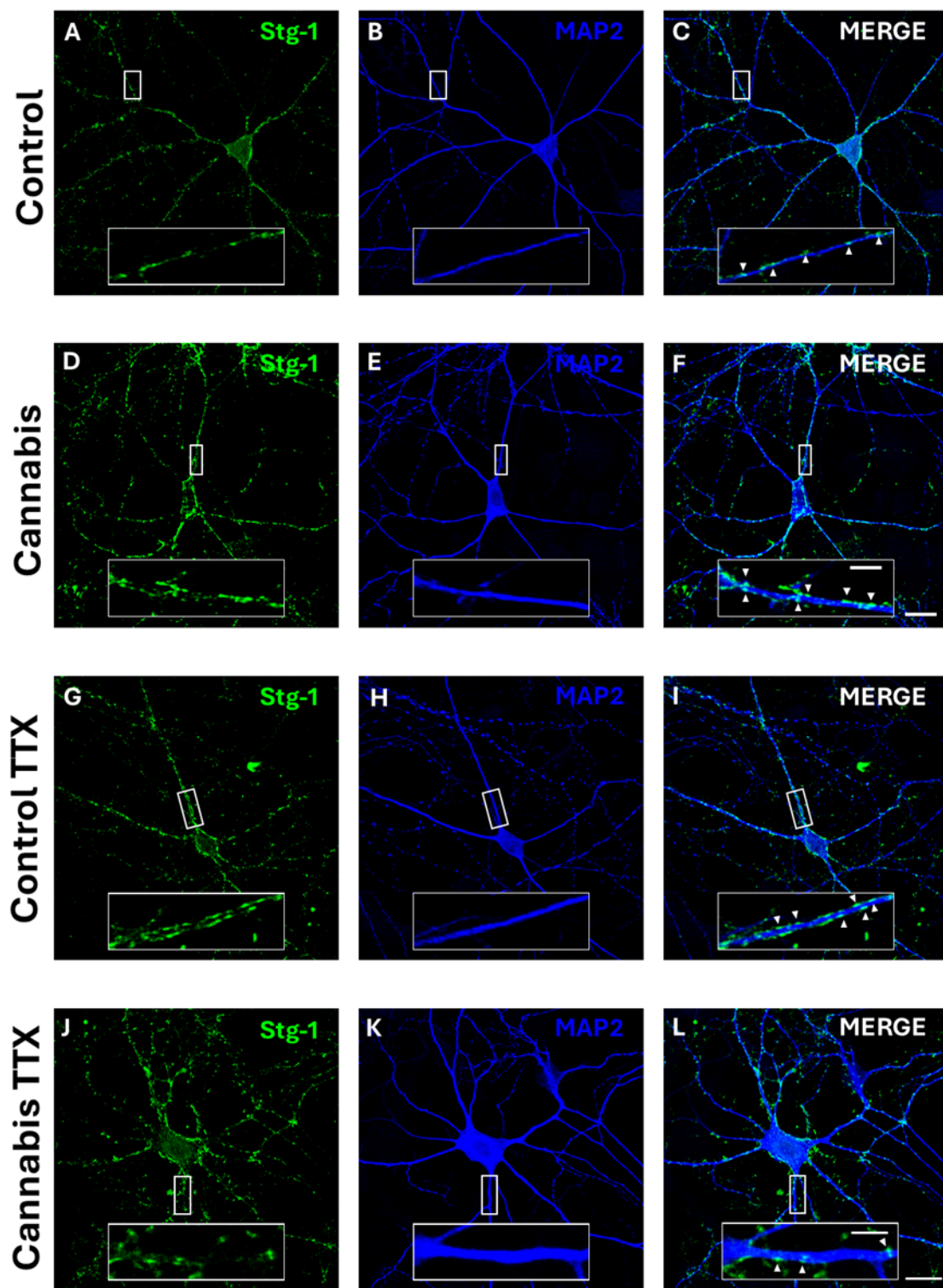
**Figura 7. La EPCV modifica la abundancia de vGlut1 y vGat, y la densidad de contactos inhibitorios en cultivos de 14 DIV.** Imágenes representativas de co-cultivos control (A-D) y expuestos a cannabis (E-H). Se utilizó un triple marcaje para vGlut1 (verde), vGat (rojo) y MAP2 (azul) en cultivos de 14 DIV. (I) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de vGlut1 (verde) y vGat (rojo), normalizada con respecto al control. (J) Cuantificación de la densidad sináptica normalizada a 30 μm para vGlut1 (verde) y vGat (rojo). Las barras de calibración corresponden a 20 μm y, en la región ampliada (4X), a 5 μm. Los números dentro de las barras indican la cantidad de neuronas analizadas por condición, en 4 experimentos independientes. Las flechas señalan botones sinápticos positivos para vGlut1 (A, E), para vGat (B, F) y aquellos con colocación total o parcial con MAP2 (Merge). \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns: estadísticamente no significativo (prueba t de Student).

### La EPCV aumenta el tamaño del pool de vesículas de reciclaje y previene la plasticidad sináptica homeostática en cultivos disociados de hipocampo de las crías

Para evaluar el impacto de la exposición prenatal a cannabis vaporizado en la funcionalidad de la terminal presináptica, analizamos el pool de reciclaje de vesículas sinápticas un marcaje

"live" de Stg-1, siguiendo el protocolo descrito en la metodología (Figura 2) (Rafael et al., 2024). Primero analizamos los cultivos derivados de crías control y de madres tratadas con cannabis e identificamos un incremento en la intensidad de fluorescencia de Stg-1 (Figura 8, M) (control:  $1,00 \pm 0,02$ ; cannabis:  $1,32 \pm 0,03$ ;  $p < 0,0001$ ; datos normalizados al control). Estos resultados sugieren que el pool de reciclaje de vesículas sinápticas se incrementa luego del EPCV.

Debido al rol del SEC en la regulación sináptica, y con el objetivo de analizar cómo la EPCV puede interferir con mecanismos fundamentales del funcionamiento neuronal decidimos estudiar su efecto sobre la PSH. Para ello, tratamos los cultivos con TTX ( $1 \mu\text{M}$ , 24 h) y analizamos la fluorescencia asociada a Stg-1. Según lo esperado, frente a la supresión crónica de la actividad, las neuronas provenientes del grupo control tratados con TTX aumentan de manera compensatoria el tamaño del pool de vesículas sinápticas en comparación con los cultivos control no tratados (Figura 8, M) (control:  $1,00 \pm 0,02$ ; control TTX:  $1,21 \pm 0,04$ ;  $p < 0,0001$ ). En cambio, las neuronas de cultivos del grupo cannabis no logran realizar este ajuste compensatorio en el tamaño del pool de vesículas sinápticas (cannabis:  $1,32 \pm 0,03$ ; cannabis TTX:  $1,17 \pm 0,03$ ;  $p < 0,01$ ; todos los datos normalizados al control).





**Figura 8. La EPCV altera el reciclaje de las vesículas sinápticas en situación basal y frente a cambio de la actividad sináptica.** Imágenes representativas de co-cultivos control (A-C), cannabis (D-F), control tratado con TTX 24 hs (G-I) y cannabis tratado con TTX (J-L). Se realizó un doble marcaje para sinaptotagmina-1 (verde) y MAP2 (azul). (M) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de sinaptotagmina-1, normalizada con respecto al control. Las barras de calibración corresponden a 20  $\mu\text{m}$  y, en la región ampliada (4X), a 5  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican botones sinápticos con colocalización parcial o total entre Stg-1 y MAP2 (Merge). Los números dentro de las barras indican la cantidad de neuronas analizadas por condición en 4 experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ ; ns: estadísticamente no significativo (prueba ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey).

## Resumen de los resultados

Logramos caracterizar la expresión de CB1R en nuestros cultivos y observamos, de forma cualitativa, una mayor colocalización con sinapsis inhibitoras (Figura 3, D y E). Además, determinamos una disminución en la intensidad de fluorescencia de CB1R por campo y tanto en sinapsis excitadoras como inhibitoras (Figura 4, I, J y Figura 5, I).

Por otro lado, a nivel global observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia de vGat a 7 DIV, seguido de una disminución a los 14 DIV. En contraste, la intensidad de vGluT1 mostró un aumento sostenido tanto a 7 como a 14 DIV (Figura 6, I y Figura 7, I). Asimismo, hallamos una menor densidad de contactos inhibitoras a 14 DIV (Figura 7, J).

Finalmente, encontramos un incremento en la intensidad de fluorescencia de Stg-1. Sin embargo, al tratar con TTX los cultivos derivados de crías de madres expuestas, no se evidenció el ajuste homeostático compensatorio esperado (Figura 8, M).

## Discusión

### La disminución de CB1R podría ser el resultado de un mecanismo compensatorio

Uno de los objetivos de este trabajo fue analizar el efecto de la EPCV sobre la expresión del CB1R. Nuestros resultados muestran una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia asociada a CB1R tanto a nivel general como a nivel sináptico (Figura 4, I, J; Figura 5, I). Una posible explicación para esta disminución es un proceso de internalización y degradación del receptor en respuesta a la EPCV crónica, un fenómeno ampliamente documentado en la regulación de GPCRs (Calebiro & Godbole, 2018). Cabe destacar que, si bien la intensidad de fluorescencia no permite una cuantificación absoluta de la proteína, su uso bajo condiciones experimentales controladas es ampliamente aceptado como una medida relativa válida (Taylor & Levenson, 2006). En este sentido, los resultados obtenidos reflejarían cambios genuinos en la expresión de CB1R entre condiciones.

Por otro lado, se ha reportado que la exposición crónica al THC puede inducir una regulación a la baja de CB1R, promoviendo mecanismos de desensibilización, internalización y tolerancia en distintas áreas del cerebro de roedores (De Salas-Quiroga et al., 2020; Vargish et al., 2017; Zehra et al., 2018). En este contexto, el estudio de Hsieh y cols (1999) demuestra que la internalización del CB1R varía según la duración y tipo de estimulación agonista, lo que podría explicar la menor expresión del receptor en nuestros cultivos derivados de crías expuestas prenatalmente a cannabis. Si la activación del CB1R durante el desarrollo embrionario fue sostenida, esto podría haber desencadenado su desensibilización progresiva, internalización y posterior degradación lisosomal, reduciendo así su disponibilidad en la membrana de la terminal presináptica. Adicionalmente, el estudio de Gyombolai y cols (2013) sugiere que la internalización sostenida del CB1R está mediada por  $\beta$ -arrestina2 ( $\beta$ -arr2). En este sentido, la EPCV podría haber promovido un mayor reclutamiento de  $\beta$ -arr2, acelerando la internalización del receptor y limitando su capacidad de modular la neurotransmisión. Esta pérdida de CB1R no solo afectaría la homeostasis endocannabinoide, sino que también podría contribuir al desbalance en la neurotransmisión excitadora e inhibitoria observado en nuestros análisis.

### Alteraciones en la maquinaria presináptica y el reciclaje de vesículas sinápticas

En nuestro estudio, encontramos que la EPCV genera un aumento de la Stg-1 (Figura 8, M), lo que sugiere un cambio en el pool de reciclaje de vesículas sinápticas. Esto se debe a que nuestro protocolo de marcaje “live” debido a las características de la estimulación, induce la exocitosis de las vesículas del pool de reciclaje, aumentando así su disponibilidad para la liberación. El estudio de Patzke et al. (2021) demostró que la activación aguda del CB1R por agonistas cannabinoides incrementa la reserva de vesículas sinápticas mediante la

fosforilación de sinapsinas, lo que revela un mecanismo no descrito previamente, en el cual la activación prolongada del CB1R regula la disponibilidad de vesículas en terminales presinápticos.

Nuestros hallazgos podrían reflejar un mecanismo homeostático de plasticidad sináptica, donde la activación crónica del CB1R durante el desarrollo embrionario habría promovido un aumento en la disponibilidad de vesículas como una respuesta compensatoria a la reducción de la probabilidad de liberación del neurotransmisor (pr) inducida por CB1R. Sin embargo, esta alteración también podría representar un estado patológico, consecuencia de la disrupción del SEC y sus mecanismos de señalización y regulación. La alteración en el equilibrio entre movilización y liberación de vesículas podría impactar la homeostasis sináptica, contribuyendo al desbalance excitatorio-inhibitorio que observamos en nuestros cultivos.

### **La EPCV compromete la PSH**

La PSH es un mecanismo adaptativo mediante el cual las neuronas compensan cambios en la actividad para mantener la estabilidad funcional de las redes neuronales (Murthy et al., 2001; Thiagarajan et al., 2005; Vitureira et al., 2012). Frente a una supresión prolongada de la actividad como la inducida por TTX las neuronas típicamente responden aumentando el tamaño del pool de reciclaje (Figura 8, M) (Rafael et al., 2024). En cambio los cultivos derivados de crías EPCV no lograron realizar ese ajuste (Figura 8, M). En Salgado Mendialdúa y cols. (2018) comprueban que la administración aguda de THC, puede modificar el proteosoma sináptico, alterando la expresión de diversas proteínas clave en la señalización sináptica. Es posible que la EPCV modifique la expresión de proteínas esenciales para la inducción de la PSH, interfiriendo con la capacidad de las neuronas de activar este tipo de respuesta adaptativa. Por otra parte, existe la posibilidad de que el sistema ya esté saturado, debido a que la EPCV aumenta la abundancia de Stg-1, quizás enmascarando el efecto de la PSH.

### **Desbalance excitación-inhibición en la neurotransmisión hipocampal**

En esta investigación, encontramos un aumento en la intensidad de vGlut1 en cultivos derivados de crías de madres expuestas a cannabis (Figura 6, I; Figura 7, I) tanto a 7 DIV como a 14 DIV. Estudios previos (Mutch et al., 2011; Wilson et al., 2005) han demostrado que un incremento en vGlut1 está asociado a una mayor pr de glutamato, lo que sugiere una alteración en la fuerza sináptica de estas neuronas. La disminución de CB1R observada en nuestros cultivos podría explicar estos hallazgos, ya que este receptor modula negativamente la liberación de glutamato en sinapsis glutamatérgicas. Su reducción podría disminuir la

inhibición presináptica, aumentando la neurotransmisión excitadora. Además, se ha demostrado que la activación de CB1R regula la homeostasis del glutamato, afectando la expresión de transportadores y receptores, lo que altera el balance de excitación/inhibición (Colizzi et al., 2016). Nuestros resultados refuerzan esta idea. También encontramos una menor densidad de contactos inhibidores (Figura 7, J), lo que podría potenciar aún más este efecto. CB1R está presente principalmente a nivel de sinapsis inhibidoras (Katona et al., 1999; Figura 3) y desempeña un papel clave en la diferenciación neuronal, sinaptogénesis y migración axonal durante el desarrollo (Mato et al., 2003; Oudin et al., 2011; Harkany et al., 2008). Estudios previos han demostrado que la exposición prenatal a cannabis altera la maduración de neuronas corticales, afectando su conectividad y funcionalidad en la adultez, además de modificar la expresión de genes de plasticidad sináptica (de Salas-Quiroga et al., 2015). Por otra parte, en Vargish y Cols (2017) se estudió específicamente el impacto de la exposición prenatal a cannabinoides en interneuronas CCK hipocampales, en concordancia con nuestros resultados observaron una reducción en la densidad de sinapsis inhibidoras y una alteración en la transmisión GABAérgica, también observaron déficits en la interacción social que incluso persistían en la adultez. En línea con estos hallazgos, en de Salas-Quiroga y cols (2020) encontraron alteraciones a largo plazo en la funcionalidad de interneuronas CCK hipocampales, y lo vinculan con alteraciones en la memoria espacial y el funcionamiento normal del hipocampo y como particularidad habiendo diferencias entre machos y hembras. Por lo tanto, la EPCV podría estar afectando la formación y estabilización de las sinapsis, alterando procesos críticos en el desarrollo y funcionamiento neuronal.

En contraste, encontramos un aumento en la abundancia de vGat a 7 DIV (Figura 6, I), seguido de una disminución a 14 DIV (Figura 7, I). El desarrollo sináptico en cultivos neuronales es un proceso dinámico, caracterizado por una fase inicial de sobreproducción de sinapsis, seguida de una eliminación progresiva de conexiones inmaduras o inefficientes (Van pelt et al., 2005). A los 7 DIV, las sinapsis GABAérgicas podrían encontrarse en una etapa temprana de formación y estabilización, mientras que a los 14 DIV, la red neuronal ya habría ajustado su conectividad, reduciendo el número de sinapsis inhibidoras. Durante este proceso, las redes neuronales experimentan ráfagas de actividad sincronizada ("network bursts"), las cuales se vuelven más organizadas y eficientes con el tiempo (Van pelt et al., 2005). Esto podría estar relacionado con la reducción de sinapsis inhibidoras a 14 DIV, si estas ya no fueran necesarias para modular la excitabilidad del sistema.

A diferencia de vGluT1, donde un aumento en su expresión está asociado con una mayor pr de glutamato, en el caso de vGat no podemos establecer una relación directa con la funcionalidad sináptica. No obstante, la variación en la intensidad de vGat sugiere un ajuste en la regulación

de su expresión, lo que podría influir en la dinámica de la transmisión sináptica y la maduración de los circuitos neuronales.

En conjunto, estos resultados sugieren un desbalance en la transmisión sináptica, caracterizado por un aumento en la excitación y una reducción de la inhibición, lo que podría tener implicaciones en funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje, dado que se trata de células hipocampales.

### **Implicancias funcionales y conexión con patologías**

Hemos demostrado que la exposición prenatal al cannabis genera efectos duraderos en la funcionalidad y distribución de sinapsis hipocampales. Una de las cuestiones clave es determinar si estos cambios impactan en otros niveles del desarrollo de las crías expuestas. En nuestro laboratorio, se han realizado experimentos de comportamiento en ratas adolescentes expuestas prenatalmente a cannabis, evaluando su desempeño en pruebas de memoria. Los resultados muestran que estas ratas presentan déficits en memoria, lo que sugiere que las alteraciones observadas en nuestros cultivos podrían estar involucradas en los mecanismos responsables de estos déficits cognitivos (Resultado sin publicar).

Además, se realizaron estudios electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratas juveniles que revelaron una alteración en el reclutamiento axonal presináptico (Resultado sin publicar), lo que indica que la exposición prenatal a cannabis no solo impacta en la modulación sináptica temprana, sino que también afecta la conectividad funcional en circuitos hipocampales más maduros. En conjunto, estos hallazgos respaldan la idea de que la EPCV induce cambios sostenidos y duraderos en la organización y función de los circuitos neuronales, con implicaciones directas en la cognición y la memoria.

Investigaciones sugieren que los niños expuestos a cannabis durante la gestación pueden presentar dificultades de atención, problemas de memoria y comportamientos agresivos en etapas posteriores de su desarrollo (Fried & Smith, 2001; Trezza et al., 2008). En línea con estos hallazgos, nuestro estudio aporta evidencia de que la exposición prenatal a cannabis genera un desbalance en la transmisión excitadora e inhibidora, un mecanismo fundamental en la regulación de la actividad neuronal.

Este desajuste en la homeostasis sináptica es un rasgo neurobiológico común en diversas patologías neuropsiquiátricas, incluyendo esquizofrenia, epilepsia y trastornos del espectro autista (TEA) (Gao et al., 2015; Bozzi et al., 2018). Si bien no se ha establecido una relación causal directa, quizás la EPCV aumente la vulnerabilidad a estas condiciones, ya sea al afectar

la correcta maduración de circuitos neuronales o alterando mecanismos de plasticidad sináptica esenciales para el desarrollo cognitivo.

### **Consideraciones a futuro**

Si bien la intensidad de fluorescencia constituye una medida indirecta de la abundancia proteica, la robustez de los resultados podría fortalecerse mediante la cuantificación de las mismas proteínas por Western blot, complementando además con el análisis de los niveles de ARNm. De esta forma, se lograría una mayor precisión y validación de los hallazgos obtenidos.

Para comprender mejor los mecanismos que subyacen a los cambios observados en este estudio, futuras investigaciones podrían enfocarse en el análisis de la expresión de genes relacionados con la plasticidad sináptica, lo que permitiría evaluar cómo la exposición prenatal a cannabis modula la regulación transcripcional de estos procesos.

Asimismo, sería relevante cuantificar las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de endocannabinoides mediante Western blot, lo que proporciona información sobre posibles alteraciones en la señalización endocanabinoide y su impacto en la homeostasis sináptica.

Por otro lado, para evaluar los efectos a largo plazo de la exposición prenatal a cannabis, se podrían realizar estudios en ratas adultas, utilizando electrofisiología para examinar la actividad sináptica en diferentes regiones cerebrales y cuantificando la expresión de CB1R en tejido postnatal, lo que ayudaría a determinar si las alteraciones encontradas en cultivos se mantienen en etapas posteriores del desarrollo.

## Conclusiones

La EPCV induce cambios duraderos en la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. Nuestros hallazgos demuestran que la EPCV altera la modulación presináptica y genera un desbalance en la neurotransmisión excitadora e inhibidora. Estos cambios podrían afectar la sinaptogénesis, el reciclaje de vesículas y la conectividad funcional en el hipocampo, impactando la homeostasis neuronal y la plasticidad sináptica a largo plazo.

Este estudio resalta los riesgos del consumo de cannabis durante el embarazo. La alteración del equilibrio sináptico y la reducción de CB1R observadas en nuestros modelos pueden afectar la memoria y el aprendizaje, respaldando la necesidad de una mayor concientización sobre los posibles efectos adversos del cannabis en el desarrollo fetal.



## Bibliografía

- Barbié, F., Camacho, A., Bardecio, J., & Álvarez, L. (2020). Autodeclaración del consumo de marihuana, tabaco, alcohol y derivados de cocaína en embarazadas en 2016 y 2020, Montevideo, Uruguay [Monografía].
- Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Hernandez, M. L., Romero, J. U. L. I. A. N., Cebeira, M., Miguel, R. D., ... & Fernandez-Ruiz, J. J. (1998). Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*, 125(16), 3179-3188.
- Blázquez, C., Chiarlone, A., Bellocchio, L., Resel, E., Pruunsild, P., García-Rincón, D., ... & Guzmán, M. (2015). The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death & Differentiation*, 22(10), 1618-1629.
- Bozzi, Y., Provenzano, G., & Casarosa, S. (2018). Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: A focus on excitation/inhibition imbalance. *European Journal of Neuroscience*, 47(6), 534-548.
- Calebiro, D., & Godbole, A. (2018). Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 32(2), 83-91.
- Castelli, V. P., Lavanco, G., Feo, S., D'Amico, C., Micale, V., Kuchař, M., Plescia, F., Brancato, A., & Cannizzaro, C. (2023). Prenatal exposure to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol affects hippocampus-related cognitive functions in the adolescent rat offspring: Focus on specific markers of neuroplasticity. *Pharmaceutics*, 15(2), 692.
- Colizzi, M., McGuire, P., Pertwee, R. G., & Bhattacharyya, S. (2016). Effect of cannabis on glutamate signalling in the brain: A systematic review of human and animal evidence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 64, 359–381.
- Connor, J. P., Stjepanović, D., Le Foll, B., Hoch, E., Budney, A. J., & Hall, W. D. (2021). Cannabis use and cannabis use disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 16.
- de Salas-Quiroga, A., Díaz-Alonso, J., García-Rincón, D., Remmers, F., Vega, D., Gómez-Cañas, M., ... & Galve-Roperh, I. (2015). Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13693-13698.
- de Salas-Quiroga, A., García-Rincón, D., Gómez-Domínguez, D., Valero, M., Simón-Sánchez, S., Paraíso-Luna, J., ... & Galve-Roperh, I. (2020). Long-term hippocampal interneuronopathy drives sex-dimorphic spatial memory impairment induced by prenatal THC exposure. *Neuropsychopharmacology*, 45(5), 877-886.
- Fride, E., Gobshtis, N., Dahan, H., Weller, A., Giuffrida, A., & Ben-Shabat, S. (2009). The endocannabinoid system during development: emphasis on perinatal events and delayed effects. *Vitamins & hormones*, 81, 139-158.

Fried, P. A., & Smith, A. (2001). A literature review of the consequences of prenatal marijuana exposure. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(1), 1-11.

Gao, R., & Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Current Molecular Medicine*, 15(2), 146-167.

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717-727.

Grotenhermen, F. (2005). Cannabinoids. *Current Drug Targets. CNS & Neurological Disorders*, 4(5), 507-530.

Gyombolai, P., Boros, E., Hunyady, L., & Turu, G. (2013). Differential  $\beta$ -arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 372(1-2), 116-127.

Harkany, T., Keimpema, E., Barabás, K., & Mulder, J. (2008). Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1-2), S84-S90.

Hatch, E. E., & Bracken, M. B. (1986). Effect of marijuana use in pregnancy on fetal growth. *American Journal of Epidemiology*, 124(6), 986-993.

Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., & Mackie, K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Neurochemistry*, 73(2), 493-501.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., ... & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, 54(2), 161-202.

Junta Nacional de Drogas. (2024). *VII Encuesta nacional sobre consumo de drogas en población general*.

Katona, I., Sperlagh, B., Sík, A., Káfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4544-4558.

Lei, A., Breit, K. R., & Thomas, J. D. (2023). Prenatal alcohol and tetrahydrocannabinol exposure: Effects on spatial and working memory. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1192786.

Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the endocannabinoid system. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607-615.

Mark, K., Desai, A., & Terplan, M. (2015). Marijuana use and pregnancy: Prevalence, associated characteristics, and birth outcomes. *Archives of Women's Mental Health*, 19(1), 105-111.

Martínez-Peña, A. A., Perono, G. A., Gritis, S. A., Sharma, R., Selvakumar, S., Walker, O. S., Gurm, H., Holloway, A. C., & Raha, S. (2021). The impact of early life exposure to cannabis:

The role of the endocannabinoid system. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8576.

Mato, S., Del Olmo, E., & Pazos, A. (2003). Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *European Journal of Neuroscience*, 17(9), 1747-1754.

Mereu, G., Fà, M., Ferraro, L., Cagiano, R., Antonelli, T., Tattoli, M., Ghiglieri, V., Tanganelli, S., Gessa, G. L., & Cuomo, V. (2003). Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4915–4920.

Mondino, A., Cavelli, M., González, J., Santana, N., Castro-Zaballa, S., Mechoso, B., Bracesco, N., Fernández, S., García-Carnelli, C., Castro, M. J., Umpiérrez, E., Murillo-Rodríguez, E., Torterolo, P., & Falconi, A. (2019). Acute effect of vaporized cannabis on sleep and electrocortical activity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 179, 113-123.

Moore, C. A., Stiltner, J. W., Davis, C. M., & Weerts, E. M. (2021). Translational models of cannabinoid vapor exposure in laboratory animals. *Behavioural Pharmacology*, 33(2 & 3), 63-89.

Murthy, V. N., Schikorski, T., Stevens, C. F., & Zhu, Y. (2001). Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron*, 32(4), 673-682.

Mutch, S. A., Kensel-Hammes, P., Gadd, J. C., Fujimoto, B. S., Allen, R. W., Schiro, P. G., ... & Chiu, D. T. (2011). Protein quantification at the single vesicle level reveals that a subset of synaptic vesicle proteins are trafficked with high precision. *Journal of Neuroscience*, 31(4), 1461-1470.

Nogueras-Ortiz, C., & Yudowski, G. A. (2016). The multiple waves of cannabinoid 1 receptor signaling. *Molecular pharmacology*, 90(5), 620-626.

Oudin, M. J., Gajendra, S., Williams, G., Hobbs, C., Lalli, G., & Doherty, P. (2011). Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *Journal of Neuroscience*, 31(11), 4000-4011.

Patzke, C., Dai, J., Brockmann, M. M., Sun, Z., Fenske, P., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2021). Cannabinoid receptor activation acutely increases synaptic vesicle numbers by activating synapsins in human synapses. *Molecular Psychiatry*, 26(11), 6253–6268.

Penman, S. L., Roeder, N. M., Wang, J., Richardson, B. J., Freeman-Striegel, L., Krayevsky, A., ... & Thanos, P. K. (2024). Vaporized  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol exposure in utero has negative effects on attention in a dose-and sex-dependent manner. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 242, 173808.

Pinky, P. D., Bloemer, J., Smith, W. D., Du, Y., Heslin, R. T., Setti, S. E., ... & Suppiramaniam, V. (2023). Prenatal Cannabinoid Exposure Elicits Memory Deficits Associated with Reduced PSA-NCAM Expression, Altered Glutamatergic Signaling, and Adaptations in Hippocampal Synaptic Plasticity. *Cells*, 12(21), 2525.

Rafael, A., Tizzoni, M., Justet, C., Cairus, A., Abudara, V., & Vitureira, N. (2024). Glial Cx43 hemichannels and neuronal Panx1 hemichannels and P2X7 receptors orchestrate presynaptic homeostatic plasticity. *Cellular Signalling*, 117, 111113.

Saez, T. M., Aronne, M. P., Caltana, L., & Brusco, A. H. (2014). Prenatal exposure to the CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 alters migration of early-born glutamatergic neurons and GABAergic interneurons in the rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry*, 129(4), 637–648.

Salgado-Mendialdúa, V., Aguirre-Plans, J., Guney, E., Reig-Viader, R., Maldonado, R., Bayes, A., ... & Ozaita, A. (2018).  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol modulates the proteasome system in the brain. *Biochemical pharmacology*, 157, 159-168.

Small, E., & Cronquist, A. (1976). A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, 25(4), 405–435.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., ... & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 215(1), 89-97.

Taylor, C. R., & Levenson, R. M. (2006). Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 49(4), 411-424.

Thiagarajan, T. C., Lindskog, M., & Tsien, R. W. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron*, 47(5), 725-737.

Trezza, V., Cuomo, V., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2008). Cannabis and the developing brain: Insights from behavior. *European Journal Of Pharmacology*, 585(2-3), 441-452.

United Nations Office on Drugs and Crime. (2023). *World Drug Report 2023*

Van Pelt, J., Vajda, I., Wolters, P. S., Corner, M. A., & Ramakers, G. J. (2005). Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro. *Progress in brain research*, 147, 171-188.

Vargish, G. A., Pelkey, K. A., Yuan, X., Chittajallu, R., Collins, D., Fang, C., & McBain, C. J. (2017). Persistent inhibitory circuit defects and disrupted social behaviour following in utero exogenous cannabinoid exposure. *Molecular psychiatry*, 22(1), 56-67.

Varner, M. W., Silver, R. M., Hogue, C. J., et al. (2014). Association between stillbirth and illicit drug use and smoking during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 123(1), 113-125.

Vitalis, T., Lainé, J., Simon, A., Roland, A., Leterrier, C., & Lenkei, Z. (2008). The type 1 cannabinoid receptor is highly expressed in embryonic cortical projection neurons and negatively regulates neurite growth in vitro. *The European Journal of Neuroscience*, 28(9), 1705–1718.

Vitureira, N., Letellier, M., & Goda, Y. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: From single synapses to neural circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 516-521.

Walker, O. L. S., Holloway, A. C., & Raha, S. (2019). The role of the endocannabinoid system in female reproductive tissues. *Journal of ovarian research*, 12(1), 3.

Weimar, H. V., Malena, A. N., Ginder, D., Brown, A. M., Glodosky, N. C., Baglot, S. L., Hill, M. N., & McLaughlin, R. J. (2023). Determining impacts of prenatal cannabis exposure on cannabis vapor self-administration using a novel response-contingent vapor model in pregnant rat dams. *Addiction Neuroscience*, 6, 100071.

Weimar, H. V., Wright, H. R., Warrick, C. R., Brown, A. M., Lugo, J. M., Freels, T. G., & McLaughlin, R. J. (2020). Long-term effects of maternal cannabis vapor exposure on emotional reactivity, social behavior, and behavioral flexibility in offspring. *Neuropharmacology*, 179, 108288.

Wilson, N. R., Kang, J., Hueske, E. V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J. G., ... & Liu, G. (2005). Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1.

Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M., & Sexton, P. M. (2018). Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(10), 638-653.

Zehra, A., Burns, J., Liu, C. K., Manza, P., Wiers, C. E., Volkow, N. D., & Wang, G. J. (2018). Cannabis addiction and the brain: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 13, 438-452. *Journal of Neuroscience*, 25(26), 6221-6234.

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833.