

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

PAULO SÉRGIO DE ALMEIDA AUGUSTO

**PROTEÇÃO MATERNO-FETAL DA EXPOSIÇÃO À COCAÍNA PELA IMUNIZAÇÃO
PRÉ-GESTACIONAL COM A VACINA ANTI-COCAÍNA**

Belo Horizonte – MG

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

PAULO SÉRGIO DE ALMEIDA AUGUSTO

**PROTEÇÃO MATERNO-FETAL DA EXPOSIÇÃO À COCAÍNA PELA IMUNIZAÇÃO
PRÉ-GESTACIONAL COM A VACINA ANTICOCAÍNA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina
da UFMG como requisito parcial para a obtenção
do grau de doutor em Medicina Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia

Coorientadores:

Prof. Dr. Ângelo de Fátima

Prof^a. Dra. Maila de Castro Lourenço das Neves

Belo Horizonte – MG

2020

Augusto, Paulo Sérgio de Almeida.

AU923p Proteção materno-fetal da exposição à cocaína pela imunização pré-gestacional com a vacina anti-cocaína [manuscrito]. / Paulo Sérgio de Almeida Augusto. - - Belo Horizonte: 2020.

140f.: il.

Orientador (a): Frederico Duarte Garcia.

Coorientador (a): Ângelo de Fátima.

Área de concentração: Psiquiatria.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cocaína. 2. Cocaína Crack. 3. Gravidez. 4. Imunoterapia. 5. Vacinas. 6. Hemocianinas. 7. Dissertação Acadêmica. I. Garcia, Frederico Duarte. II. Fátima, Ângelo de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 805

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
COLEGIADO DO CURSO PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

PROTEÇÃO MATERNO-FETAL DA EXPOSIÇÃO À COCAÍNA PELA IMUNIZAÇÃO PRÉ-GESTACIONAL COM A VACINA ANTI-COCAÍNA

PAULO SÉRGIO DE ALMEIDA AUGUSTO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia onze de setembro de 2020, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Frederico Duarte Garcia- Orientador
UFMG

Ângelo de Fátima
UFMG

Amaury Cantilino da Silva Junior
UFPE

Maila de Castro Lourenço das Neves
UFMG

Yael Abreu Villaça
UERJ

María Eugenia Gallardo Alba
Univeridade da Beira Interior

Paula Carolina Mendes Santos
UNI-BH

Belo Horizonte, 11 de setembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Angelo de Fatima, Professor do Magistério Superior**, em 14/09/2020, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Eugenia Gallardo Alba, Usuário Externo**, em 14/09/2020, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Duarte Garcia, Professor do Magistério Superior**, em 16/09/2020, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Carolina Mendes Santos, Usuário Externo**, em 17/09/2020, às 09:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yael de Abreu Villaça, Usuário Externo**, em 17/09/2020, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maila de Castro Lourenco das Neves, Professora do Magistério Superior**, em 22/09/2020, às 09:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amaury Cantilino da Silva Junior, Usuário Externo**, em 05/10/2020, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0257530 e o código CRC EF990EA5.

Dedico o grau de Doutor

A todos aqueles que lutam contra alguma dependência; àqueles que, por razões incertas, tentam amenizar sua realidade, ainda que por caminhos tortuosos.

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, pela vida e evolução.

À minha mãe, por todo seu amor, compreensão e confiança e por me ensinar a ser resiliente.

Ao meu pai, por ter me ensinado a ser corajoso, persistente e honesto.

Ao meu irmão, João Victor, pela amizade e companheirismo.

Ao Bethoven, nosso companheiro de meia idade, dócil e gentil.

À Adriana Godin, por ter me apresentado a este projeto e confiado na minha competência.

Ao Leo Netto e Angélica, que me acompanharam e auxiliaram no início dessa trajetória.

À minha grande amiga e irmã Anna Carolina, parceira de todos os momentos e inspiração como pessoa e profissional.

Ao Professor Dr. Frederico Garcia, pela confiança em mim depositada para a condução desse projeto e pelos conhecimentos compartilhados ao longo desses anos

Aos Professores Maila de Castro, Ângelo de Fátima, Gisele Goulart e Sordaini Caligiorne, por todo o apoio e contribuição para minha formação científica e humana.

Aos amigos e colegas do NAVeS, Ângela, Raíssa, Brian, Bruna, Karine, Larissa, Priscila, Paula, André, Marco, Luiza, Júlia e Mayra, pessoas de extrema competência, que contribuíram, cada um da sua forma, para que esse projeto fosse conduzido.

À minha família de Mutum, em especial minha avó, Manoelina, minhas tias Andreia e Ivani, minha madrinha Lúcia, meus primos Marcos, Júlio César, Gabriela, Sabrina e José Augusto, pelo apoio familiar.

Aos meus amigos da vida, Felipe Soares, Felipe Fernandes, Paty, Marcela Bini, Mívian e Wélter e Júlia Bellini, que, cada qual a sua maneira, conquistou sua importância na minha vida e contribuiu para minha evolução como ser humano.

Aos amigos do CEFET, Evelyn, Rafael, Bruno, Brunín, Luccas, Gabriel, Pri, Tamíris, Catiane, Ju, Elgen, Leo, Larissa, Camila, Rayana e Diego, pelos momentos incríveis no ensino médio e pela amizade que permanece até hoje.

Aos amigos de faculdade, Kennedy, Thaís, Morgana, Patrícia, Marianne e Júlia, que me acompanharam nos longos cinco anos de graduação, e até hoje, tornando-os menos difíceis e mais alegres.

Aos colegas do Biotério, Marcelo, Flávia e Zé Carlos, pela dedicação e profissionalismo no cuidado com os animais.

Aos pesquisadores, colegas e colaboradores do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, pelas contribuições e parceria no projeto.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, pela competência no trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

E aos demais que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e talvez a idade já tenha me feito esquecer de mencionar.

“Aquele que tem um porquê para viver pode suportar quase qualquer coisa.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A dependência à cocaína e crack é um problema mundial de saúde pública para o qual ainda não existem fármacos aprovados para o tratamento. A apresentação de moléculas de cocaína ao sistema imunológico por meio de estruturas químicas imunogênicas é capaz de induzir a produção de anticorpos que podem realizar antagonismo farmacocinético à droga, reduzindo seus efeitos sistêmicos e a autoadministração da droga. O estudo das imunoterapias é um campo promissor para o tratamento da dependência química à cocaína. O GNE-KLH é um imunoc conjugado que apresentou eficácia satisfatória na produção de anticorpos anti-cocaína e reversão dos efeitos da droga em ensaios pré-clínicos. A exposição pré-natal à cocaína e crack induz desfechos obstétricos e pós-natais negativos nas mães, feto, recém-nascido e na criança e adolescente. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar se a imunoterapia com GNE-KLH para a dependência à cocaína pode fornecer proteção materno-fetal contra desfechos negativos obstétricos e pós-natais associados à exposição pré-natal à droga. No primeiro experimento, ratas adultas receberam GNE-KLH (500 µL de emulsão 0,035 µL/mL, i.p.) ou placebo (adjuvante de Freund completo ou incompleto) nos tempos D0, 7, 21 e 42 e foram acasaladas no tempo D35. Determinou-se o ganho de peso durante a gestação, tempo de gestação, mortalidade materna, tamanho da ninhada e mortalidade de filhotes. No segundo experimento, as mães foram imunizadas conforme o protocolo anterior e receberam uma dose diária de 20 mg/kg de cocaína durante os dois períodos gestacionais avaliados. Os parâmetros gestacionais do primeiro experimento também foram avaliados neste segundo protocolo. O ELISA determinou a presença e a especificidade dos anticorpos IgG e IgM anti-cocaína no soro das mães e filhotes e no leite materno. O modelo de campo aberto determinou o efeito da cocaína na prole após o desmame e na idade adulta. Os resultados demonstram que: 1. ratas vacinadas com GNE-KLH produzem e mantem títulos de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína durante duas gestações, corroborando a eficácia da vacinação nas mães, 2. na presença da exposição gestacional à cocaína, houve redução dos desfechos obstétricos negativos nas ratas vacinadas, 3. encontramos presença de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes, confirmando a transferência passiva dos anticorpos, 4. encontramos presença de anticorpos IgG anti-cocaína no leite materno, confirmando um dos mecanismos de transferência desses anticorpos, 5. encontramos redução dos efeitos comportamentais da administração de cocaína nos filhotes após o desmame, mas não na idade adulta e, 6. os anticorpos apresentam especificidade pela droga, ratificando os resultados anteriores. Esses resultados sugerem que a imunoterapia com GNE-KLH para dependência à cocaína pode fornecer proteção materno-fetal contra desfechos negativos associados à exposição intrauterina à droga e no período pós-natal imediato.

Palavras-chave: cocaína, crack, exposição pré-natal, gestação, imunoterapia, vacina anti-cocaína, GNE-KLH.

ABSTRACT

Cocaine-crack dependence is a worldwide public health problem for which there is still no drugs approved for treatment. The introduction of cocaine molecules to the immune system through immunogenic chemical structures induces the production of antibodies that can perform pharmacokinetic antagonism reducing the drug's systemic effects and self-administration of the drug. The study of immunotherapies is a promising field for the treatment of cocaine dependence. In preclinical trials, GNE-KLH, an immunoconjugate, showed satisfactory efficacy in the production of anti-cocaine antibodies in rats and in reversing effects of the drug. Prenatal exposure to cocaine and crack induces negative obstetric and postnatal outcomes in mothers, fetuses, newborns, children and adolescents. In this context, the aim of the study was to assess whether immunotherapy with GNE-KLH for cocaine dependence can provide maternal-fetal protection against negative obstetric and postnatal outcomes associated with prenatal exposure to the drug. In the first experiment, adult female rats received GNE-KLH (500 μ L, emulsion 0,035 μ L/mL, intraperitoneally) or placebo (Freund's complete or incomplete adjuvant) at times D0, 7, 21 and 42 and mated on day 35. Weight gain during pregnancy, gestation time, maternal mortality, litter size and mortality rates of mothers and puppies were determined. In the second experiment, mothers were immunized according to the previous protocol and received a daily dose of 20 mg/kg of cocaine during the two gestational periods evaluated. The gestational parameters of the first experiment were also evaluated in this second protocol. ELISA determined the presence and specificity of IgG and IgM anti-cocaine antibodies in the serum of mothers and puppies and in the mother's breast milk. Open field test determined the cocaine's effect on the offspring after weaning and after reaching adulthood. The results demonstrate that: 1. female rats vaccinated with GNE-KLH produce and maintain IgG and IgM anti-cocaine antibody titers during two pregnancies, corroborating the effectiveness of vaccination in mothers, 2. in the presence of gestational exposure to cocaine, there was a reduction in negative obstetric outcomes in vaccinated rats, 3. we found the presence of anti-cocaine IgG antibodies in the puppies, confirming the passive transfer of antibodies, 4. we found the presence of anti-cocaine IgG antibodies in breast milk, confirming one of the mechanisms of antibody transfer, 5. we found a reduction in the behavioral effects of acute cocaine administration in puppies after weaning, but not after reaching adulthood, and 6. antibodies show specificity for the drug, confirming previous results. These results suggest that immunotherapy for cocaine dependence with GNE-KLH may provide maternal-fetal protection against negative outcomes associated with intrauterine exposure to the drug and in the postnatal period.

Keywords: cocaine, crack, prenatal exposure, pregnancy, immunotherapy, anti-cocaine vaccine, GNE-KLH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da cocaína	22
Figura 2 - Estrutura química dos principais haptenos da cocaína.....	41
Figura 3 - Teste da gota para verificação de estabilidade da emulsão. A ausência de dispersão da gota indica a integridade da emulsão preparada, como observado	54
Figura 4 - Fotomicrografia ótica demonstrando as fases do ciclo estral em ratas. (A). Metaestro (B.) Diestro (C). Proestro (D). Estro.....	56
Figura 5 - Linha do tempo do protocolo de avaliação da eficácia da imunização com GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas	60
Figura 6 - Escala temporal do protocolo de avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína durante a primeira gestação e o período entre gestações.....	61
Figura 7 - Escala temporal das coletas nos filhotes na primeira gestação.....	62
Figura 8 - Escala temporal do protocolo de avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína durante a segunda gestação.....	63
Figura 9 - Escala temporal das coletas nos filhotes na segunda gestação	63
Figura 10 - (A). Aparato utilizado para avaliação da atividade locomotora e exploratória de animais em modelo de campo aberto. (B.) Habituação e observação do comportamento dos filhotes durante o experimento.....	64
Figura 11 - Escala temporal da avaliação do comportamento locomotor e exploratório dos filhotes no modelo de campo aberto logo após o desmame	64
Figura 82 - Escala temporal da avaliação comportamental dos animais no modelo de campo aberto no protocolo de sensibilização tardia à cocaína	65
Figura 93 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do primeiro experimento.....	67
Figura 14 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do primeiro experimento.....	68
Figura 15 - Evolução da massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), durante os períodos pré-gestacional e gestacional das mães vacinadas e não vacinadas no primeiro experimento.....	69
Figura 16 - Evolução do ganho de massa corporal médio, expressa em gramas (g), durante os períodos pré-gestacional e gestacional das mães vacinadas e não vacinadas no primeiro experimento.....	70

Figura 17 - Número médio de filhotes nascidos vivos em mães vacinadas e não vacinadas.....	71
Figura 18 - Número médio de filhotes após o desmame em mães vacinadas e não vacinadas...	72
Figura 109 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína no desmame, expressos em densidade óptica (DO), em filhotes de mães vacinadas e não vacinadas.....	72
Figura 2011 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína no desmame, expressos em densidade óptica (DO), em filhotes de mães vacinadas e não vacinadas.....	73
Figura 21 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do segundo experimento	74
Figura 22 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do segundo experimento	76
Figura 23 - Evolução da massa corporal absoluta média em mães vacinadas e não vacinadas, expresso em gramas (g), durante a primeira gestação do segundo experimento	77
Figura 24 - Evolução do ganho de massa corporal médio em mães vacinadas e não vacinadas, expresso em gramas (g) durante a primeira gestação do segundo experimento	78
Figura 25 - Evolução da massa corporal absoluta média em mães vacinadas e não vacinadas, expressa em gramas (g) durante a segunda gestação do segundo experimento	78
Figura 26 - Evolução do ganho de massa corporal médio em mães vacinadas e não vacinadas, expressa em gramas (g), durante a segunda gestação do segundo experimento	79
Figura 27 - Tempo médio das gestações, expresso em dias, em mães vacinadas e não vacinadas	80
Figura 28 - Número médio de filhotes nascidos vivos em mães vacinadas e não vacinadas.....	81
Figura 29 - Número médio de filhotes após o desmame em mães vacinadas e não vacinadas...	82
Figura 30 - Evolução da massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), após o desmame em filhotes da primeira gestação de mães vacinadas e não vacinadas	82
Figura 31 - Evolução do ganho de massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), após o desmame em filhotes da primeira gestação de mães vacinadas e não vacinadas	83
Figura 31 - Evolução do ganho de massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), após o desmame em filhotes da primeira gestação de mães vacinadas e não vacinadas	84
Figura 33 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 14 dias após o desmame da segunda gestação.....	85
Figura 34 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 21 dias após o desmame da primeira gestação	85

Figura 35 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 14 dias após o desmame da segunda gestação	86
Figura 36 - Distância percorrida média, em metros (m), após tratamento com cocaína, por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas	86
Figura 37 - Número médio de entradas no centro do aparato de observação, após tratamento com cocaína, realizadas por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas	87
Figura 38 - Gráficos de locomoção em filhotes de mães vacinadas, na parte superior, e de mães não vacinadas, na parte inferior. (A) Basal de filhotes de mães vacinadas. (B) Pós-tratamento com cocaína de filhotes de mães vacinadas. (C) Basal de filhotes de mães não vacinadas. (D) Pós-tratamento com cocaína de filhotes de mães não vacinadas	88
Figura 39 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	89
Figura 40 - Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	90
Figura 41 - Evolução da massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	90
Figura 42 - Evolução do ganho de massa corporal médio, expresso em gramas (g), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	91
Figura 43 - Distância percorrida, em metros (m), por filhotes de filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no desafio salina/cocaína do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	91
Figura 44 - Distância percorrida, em metros (m), por filhotes de filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no desafio cocaína do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	92
Figura 45 - Distância percorrida, em metros (m), por filhotes de filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no desafio salina do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína	92
Figura 46 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas quando em diluições crescentes da amostra	93

Figura 47 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas na diluição 1:100	93
Figura 48 - Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas quando em diluições crescentes da amostra	94
Figura 49 -Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas na diluição 1:100	95
Figura 50 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), em mães vacinadas e não vacinadas e filhotes de mães vacinadas e não vacinadas, da primeira gestação, quando em adsorção com concentrações crescentes de cocaína.....	97
Figura 51 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), em mães vacinadas e não vacinadas e filhotes de mães vacinadas e não vacinadas, da segunda gestação, quando em adsorção com concentrações crescentes de cocaína	97
Figura 52 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas quando em adsorção com concentrações crescentes de cocaína	98
Figura 53 - Metabólitos ativos da cocaína. (A). Norcocaína e (B). Cocaetileno	111
Figura 54 - Calixarenos: estrutura geral	113

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
*	Indica diferença estatística significativa
>	Maior que
<	Menor que
®	Marca registrada
™	Marca comercial (do inglês <i>trade mark</i>)
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µmol	Micromol
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>Bovine serum albumin</i>)
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD	Grupamento de diferenciação (do inglês <i>Cluster of differentiation</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D	Dia
D1	Receptor Dopaminérgico 1
DP	Desvio padrão
EDC	1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)

FcRn	Receptor neonatal Fc
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Força G
g	Gramas
GEQOB	Grupo de Pesquisas em Química Orgânica e Biológica
GNC	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anti-cocaína
GND	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anti-cocaína
GNE	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anti-cocaína
GNT	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anti-cocaína
h	Horas
i.p.	Intraperitoneal
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IFA	Insumo farmacêutico ativo
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kg	Quilograma
KLH	Hemocianina do molusco <i>Megathura crenulata</i>
L	Litro
Log	Logaritmo
m	Metros
mg	Miligramas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Concentração micromolar (micromol por litro)
mm	Milímetros

mol	Quantidade de matéria
n	Número de animais por grupo experimental
N	Concentração normal (equivalentes-gramas por litro)
NAVeS	Núcleo de Estudos em Vulnerabilidade à Saúde
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade de Significância
p/v	Concentração em peso por volume
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
r	Coefficiente de determinação
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
Tc ^{99m}	Tecnécio metaestável
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>)
TT	Toxicoide Tetânico
UFMG-VAC4N2	Vacina derivada da molécula de calixareno
UFMG-VAC8N2	Vacina derivada da molécula de calixareno
UI	Unidade Internacional
v	Volume
vs	versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Cocaína e dependência química	21
1.2 Epidemiologia do uso de cocaína e crack	23
1.3 Formas de consumo da cocaína	24
1.4 Farmacodinâmica da cocaína	24
1.5 Consequências do uso da cocaína	25
1.6 O uso da cocaína e a gestação	26
1.6.1 <u>Epidemiologia do uso da cocaína durante a gestação</u>	27
1.6.2 <u>Potenciais mecanismos de ação da cocaína durante a gestação</u>	28
1.6.3 <u>Efeitos gestacionais do uso da cocaína</u>	29
1.6.4 <u>Consequências fetais e ao recém-nascido do uso de cocaína</u>	30
1.6.5 <u>Evolução e prognóstico da criança e do adolescente expostos à cocaína durante o período gestacional</u>	34
1.7 Farmacoterapia para o tratamento da dependência química à cocaína	36
1.8 O Sistema imunológico no tratamento da dependência química	38
1.9 Vacinas anti-cocaína e o GNE-KLH	40
1.9.1 <u>Os haptenos</u>	40
1.9.2 <u>Os adjuvantes</u>	42
1.9.3 <u>As vacinas testadas</u>	43
1.10 A vacinação na proteção da exposição intrauterina à cocaína e crack	43
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	46
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Animais Experimentais	50
4.2 Drogas, fármacos e reagentes	51
4.3 Preparo dos reagentes, soluções e suspensões, doses e vias de administração	52

4.3.1 <u>Preparo do hapteno GNE</u>	52
4.3.2 <u>Conjugação GNE-KLH/GNE-BSA</u>	53
4.3.3 <u>Purificação dos imunocombinados</u>	53
4.3.4 <u>Preparo da formulação do imunocombinado GNE-KLH</u>	54
4.3.5 <u>Preparo da solução de cocaína</u>	55
4.4 Determinação das fases do ciclo estral e acasalamento	55
4.5 Dosagem de anticorpos anti-cocaína – ELISA Indireto.....	57
4.5.1 <u>Etapa 1: Fixação do combinado GNE-BSA</u>	57
4.5.2 <u>Etapa 2: Diluição e incubação das amostras</u>	57
4.5.3 <u>Etapa 3: Revelação e leitura da placa</u>	58
4.6 Dosagem de anticorpos anti-cocaína – Ensaio de competição.....	58
4.7 Análise estatística	59
4.8 Protocolos Experimentais.....	59
4.8.1 <u>Experimento 1 – Avaliação da eficácia do GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas</u>	59
4.8.2 <u>Experimento 2 – Avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína</u>	61
4.8.3 <u>Avaliação do comportamento locomotor e exploratório dos filhotes em modelo de campo aberto</u>	63
4.8.4 <u>Coleta de leite materno</u>	66
5 RESULTADOS.....	67
5.1 Experimento 1 – Avaliação da eficácia do GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas.....	67
5.1.1 <u>Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães</u>	67
5.1.2 <u>Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães</u>	68
5.1.3 <u>Ganho de massa corporal das mães</u>	69
5.1.4 <u>Tamanho da ninhada, mortalidade materna e tempo de gestação</u>	71
5.1.5 <u>Mortalidade de filhotes</u>	71
5.1.6 <u>Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes</u>	72
5.1.7 <u>Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nos filhotes</u>	73

5.2 Experimento 2 – Avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína	73
5.2.1 <u>Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães</u>	73
5.2.2 <u>Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães</u>	75
5.2.3 <u>Ganho de massa corporal das mães</u>	76
5.2.4 <u>Tempo de gestação</u>	79
5.2.5 <u>Tamanho da ninhada e mortalidade materna</u>	80
5.2.6 <u>Mortalidade de filhotes</u>	80
5.2.7 <u>Ganho de massa corporal dos filhotes</u>	81
5.2.8 <u>Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes</u>	83
5.2.9 <u>Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nos filhotes</u>	84
5.2.10 <u>Atividade locomotora em modelo de campo aberto – efeito agudo da administração de cocaína</u>	86
5.2.11 <u>Atividade locomotora em modelo de campo aberto – efeito da sensibilização tardia à cocaína</u>	88
5.2.12 <u>Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína no leite materno</u>	92
5.2.13 <u>Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína no leite materno</u>	94
5.2.14 <u>Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína – ensaio de competição</u>	95
6 DISCUSSÃO	99
6.1 Avaliação dos resultados experimentais	99
6.1.2 <u>Produção de anticorpos IgG e IgM nas mães vacinadas</u>	99
6.1.2 <u>Presença de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes</u>	103
6.1.3 <u>Presença de anticorpos anti-cocaína no leite materno</u>	104
6.1.4 <u>Atenuação do efeito agudo da cocaína nos filhotes</u>	106
6.1.5 <u>Especificidade dos anticorpos IgG à cocaína</u>	109
6.2 Limitações do Estudo	112
6.3 Perspectivas	113
6.3.1 <u>Desenvolvimento de novas moléculas imunogênicas</u>	113
6.3.2 <u>As vacinas UFMG-VAC4N2 e UFMG-VAC8N2</u>	114
7 CONCLUSÃO	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

1 INTRODUÇÃO

O uso de drogas é um problema mundial de saúde pública. O estudo das terapias imunológicas constitui uma área promissora de pesquisa para o desenvolvimento de tratamentos para a dependência química em cocaína e crack, um transtorno psiquiátrico de considerável relevância social e ainda sem um tratamento farmacológico eficiente e seguro. O uso de cocaína e crack durante a gestação é um problema ainda mais grave, por induzir efeitos deletérios não apenas nas mães usuárias, mas também nos filhos, os quais podem apresentar diversos transtornos psiquiátricos na infância e adolescência associados à exposição pré-natal à droga. Dessa forma, na presente tese, abordaremos uma aplicação inédita e inovadora das terapias imunológicas: a proteção materno-fetal da exposição à cocaína durante a gravidez e amamentação.

O presente trabalho será apresentado em 7 capítulos. No capítulo 1, introdução, iremos rever conceitos básicos sobre a cocaína e as consequências de seu uso durante a gestação. Nos capítulos 2 e 3, abordaremos as justificativas, hipóteses e os objetivos gerais e específicos do trabalho. No capítulo 4, descreveremos os métodos utilizados no estudo e, no capítulo 5, os resultados obtidos por meio desses métodos. No capítulo 6, discutiremos os resultados, baseados nos conhecimentos prévios encontrados na literatura técnico-científica. Finalmente, no capítulo 7 apresentaremos as conclusões do trabalho.

1.1 Cocaína e dependência química

A cocaína (**Figura 1**) é um alcaloide tropânico extraído das folhas da planta *Erythroxylum coca*, popularmente conhecida nos países andinos como “coca”, e cultivada em regiões de clima seco das Américas do Sul e Central, México, Indonésia e Leste da Índia (GOLDSTEIN *et al.*, 2009; De GIOVANNI & MARCHETTI, 2012).

Estudos antropológicos mostram que o uso das folhas de coca em rituais religiosos era comum entre os povos andinos (GOLDSTEIN *et al.*, 2009). Ainda hoje, na cultura tradicional desses povos, a folha de coca é consumida na forma mascada ou em infusões, com objetivo de melhorar a disposição e o ânimo de quem a consome

(STALEY, 2006; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; CHASIN *et al.*, 2014). A folha de coca apresenta, em média, concentrações de 3 a 5% de cocaína, dependendo da região cultivada e do método de extração utilizado (JENKINS *et al.*, 1996). Essa concentração é baixa para produzir um efeito intenso e duradouro, como o buscado pelos usuários quando ela é usada como droga de abuso (JENKINS *et al.*, 1996; GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

A folha de coca foi introduzida na Europa por Joseph de Jussieu em 1750 e, apenas em 1855, a cocaína foi extraída e purificada pelo químico alemão Friederich Gaedcke (CALATAYUD & GONZÁLEZ, 2003; GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

Os efeitos terapêuticos da cocaína são múltiplos, sendo que o efeito anestésico foi o primeiro a ser descoberto pelo químico austríaco Albert Niemann em 1865. Os efeitos psicotrópicos da cocaína foram identificados pelo fisiologista Wassili von Arep em 1879 (CALATAYUD & GONZÁLEZ, 2003; GOLDSTEIN *et al.*, 2009). Na segunda metade do século XIX, a cocaína teve seu uso terapêutico difundido por Freud, com o propósito de aliviar os sintomas da depressão e curar a dependência à morfina. No entanto, casos de intoxicações e óbitos associados ao uso dessa substância levaram, em 1914, à proibição do consumo e comercialização de quaisquer produtos que a contivesse (GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

Na década de 70 houve um aumento no abuso de cocaína, o que é considerado o início de um grande problema de saúde pública mundial, que perdura até os dias atuais (CALATAYUD & GONZÁLEZ, 2003; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2017).

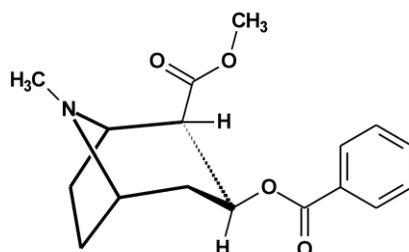


Figura 12 - Estrutura química da cocaína.

Fonte: SAUVAIN *et al.* (1997).

1.2 Epidemiologia do uso de cocaína e crack

O uso e a dependência à cocaína e ao crack, um derivado fumável da cocaína, são causas importantes de morbidade e mortalidade e tornaram-se, desde o início dos anos 1990, um fenômeno de saúde pública conhecido como *epidemia do crack* (CORNER & O'BRIEN, 1996; CORNISH *et al.*, 1996; BUTLER *et al.*, 2017).

Em 2017, estima-se que 18 milhões de pessoas consumiram cocaína no mundo, representando 0,4 % da população com idade entre 15 e 64 anos. Esse dado indica um aumento global do uso da droga em relação à última estimativa, do ano de 2013. O aumento do consumo da droga foi observado nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia e em países da Europa Ocidental e Central e América do Sul, incluindo o Brasil (UNODC, 2019).

No Brasil, o III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas, realizado pelo ICICT/Fiocruz (Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz) traçou o panorama mais atual sobre o uso de cocaína e crack no país. Nesse levantamento, foram entrevistados cerca de 17 mil brasileiros, com idades entre 12 e 62 anos. A cocaína em pó é apontada, nessa pesquisa, como a segunda droga mais consumida no país: 3,1% relataram já ter consumido a substância. Nos 30 dias anteriores à pesquisa, 0,3% dos entrevistados afirmaram ter feito uso de cocaína. Aproximadamente 1,4 milhão de pessoas entre 12 e 65 anos relataram ter feito uso de crack e similares alguma vez na vida, o que corresponde a 0,9% da população da pesquisa, com um diferencial pronunciado entre homens (1,4%) e mulheres (0,4%). Nos 12 meses anteriores ao levantamento, o uso dessa droga foi reportado por 0,3% da população (BASTOS *et al.*, 2017). Apesar da amostra coletada ser domiciliar, não englobando usuários em situações especiais, tais como: moradores de rua e detentos, os dados ainda mostram um número significativo de usuários no país.

Outro estudo realizado pela Fiocruz também avaliou o quantitativo de usuários de crack e/ou similares que são menores de idade. Nesse levantamento, para as capitais do Brasil, observou-se que, dentre os 370 mil usuários de crack e/ou similares estimados, cerca de 14% eram menores de idade, representando aproximadamente 50 mil crianças

e adolescentes que utilizam a droga (BASTOS & BERTONI, 2014). Trata-se de um dado preocupante, haja visto as consequências do uso da droga nessa idade.

O número de mortes associadas ao uso de cocaína e crack vem crescendo nas últimas décadas, sendo resultado principalmente de overdoses, acidentes e, sobretudo, da violência (LARANJEIRA *et al.*, 2014; BASTOS *et al.*, 2017).

1.3 Formas de consumo da cocaína

As formas mais comuns de consumo de cocaína são por aspiração, injeção intravenosa ou fumada. O cloridrato de cocaína é um pó cristalino, hidrossolúvel, que pode ser ministrado por via aspirada pelas narinas, sendo absorvido pela mucosa nasal ou diluído em meio aquoso e injetado por via intravenosa (CHASIN *et al.*, 2014).

A base livre de cocaína, chamada de pasta base ou crack, é insolúvel em água e tem alto ponto de fusão e ebulição. Dessa forma, ela pode ser aquecida, evaporada e inalada pelas vias aéreas pelo consumidor. A absorção da droga ocorre pelos pulmões, que, por ter uma grande área superficial, aumenta a velocidade e extensão da absorção, evita o mecanismo de primeira passagem e acelera a chegada da droga ao cérebro. Essa farmacocinética produz um efeito mais rápido e mais intenso, que leva, por consequência, à dependência mais rapidamente (CALATAYUD & GONZÁLEZ, 2003; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; CHASIN *et al.*, 2014).

1.4 Farmacodinâmica da cocaína

A partir da corrente sanguínea, a cocaína pode atuar em órgãos periféricos, como o coração, vasos sanguíneos e musculatura ocular. A droga pode ser sequestrada pelos adipócitos, em razão da grande lipofilicidade da molécula e pode também atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Após passar pela BHE, a cocaína pode se acumular no sistema nervoso central (SNC), produzindo efeitos característicos da estimulação do sistema nervoso simpático e no circuito de recompensa, onde aumenta as concentrações de dopamina. Essas ações no SNC são percebidas pelo usuário como euforia, sensação de bem-estar e desinibição (KINSEY *et al.*, 2010). Tais efeitos são provocados pelo acúmulo de catecolaminas nas junções sinápticas, devido à inibição do transportador

pré-sináptico pela droga (KELLER & SNYDER-KELLER, 2000; CHASIN *et al.*, 2014). Além do efeito simpatomimético, a cocaína é um potente anestésico local, atuando no bloqueio de canais de sódio nos neurônios sensoriais e canais de potássio ATP-dependentes, além de interferir no transporte de íons cálcio intracelular (DU *et al.*, 2006; LUFT & MENDES, 2007; CHASIN *et al.*, 2014).

1.5 Consequências do uso da cocaína

O uso da cocaína está associado a um aumento da vulnerabilidade às doenças psiquiátricas. Entre os indivíduos que usam cocaína uma vez, 16% tornam-se dependentes (PIANCA *et al.*; 2014). Além disso, a exposição continuada à droga induz uma infrarregulação (*downregulation*) da neurotransmissão dopaminérgica, que pode estar associada aos sintomas de disforia, anergia, abulia e apatia (SHORTER & KOSTEN, 2011; CHASIN *et al.*, 2014; PIANCA *et al.*; 2014). Os usuários de cocaína também podem apresentar transtornos de humor e sintomas característicos de quadros psicóticos agudos (BOLANOS & NESTLER, 2004; NESTLER, 2004). As complicações psiquiátricas e somáticas são descritas em ao menos 50% dos usuários de grandes quantidades de crack (LEVIN *et al.*, 2008).

Além dos efeitos psicossomáticos, o uso crônico de cocaína pode provocar alterações em outros sistemas fisiológicos. Os efeitos estimulante e vasoconstritor da droga podem ocasionar complicações cardiovasculares importantes como taquicardia, elevação da pressão arterial, infarto do miocárdio e angina pectoris (GOLDSTEIN *et al.*, 2009; KIM & PARK, 2019). O uso da cocaína, principalmente na forma inalada, frequentemente também provoca danos ao sistema respiratório. A vasoconstrição local produzida pela droga e a irritação induzida pelos contaminantes provocam lesões no epitélio nasal, produzindo inflamação, que se manifesta na forma de rinorreia, sangramentos nasais, rinite e sinusite. O uso do crack, pelas razões descritas acima e pela temperatura da fumaça aspirada, pode provocar danos diretamente ao tecido pulmonar, podendo levar à fibrose, exacerbação do quadro de asma, edema e hemorragia pulmonar, hipertensão pulmonar e pneumonite intersticial (RESTREPO *et al.*, 2007).

As substâncias utilizadas como veículo da droga e os contaminantes oriundos do processo de refino são um problema à parte, podendo induzir complicações diversas ou exacerbar aquelas relacionadas à droga. Tais substâncias compreendem metais pesados, resíduos de solventes orgânicos, silicatos e excipientes utilizados na fabricação de comprimidos, como talco, óxido de titânio e estearato de magnésio (RESTREPO *et al.*, 2007).

Há, ainda, evidências de que alguns dos metabólitos da cocaína possuem efeitos hepatotóxicos, podendo produzir necrose do parênquima hepático e alterações nos níveis de bilirrubina e de enzimas no fígado (CHASIN *et al.*, 2014; GRAZIANI *et al.*, 2016). O uso de estimulantes também é associado à mortalidade elevada e aumento da incidência de infecção pelo HIV e hepatite C (ORSON *et al.*, 2009; CALPE-LÓPEZ *et al.*, 2019).

1.6 O uso da cocaína e a gestação

O uso de drogas durante a gestação, em especial a cocaína, tornou-se um problema de considerável relevância social. As drogas, quando consumidas na gravidez, podem produzir efeitos nocivos às gestantes, ao feto, aos neonatos e as crianças em desenvolvimento (CAMARGO & MARTIN, 2014). Mulheres que consomem cocaína o fazem, usualmente, em idade fértil. O início da gravidez, para muitas mulheres, passa despercebido e o uso da droga pode ocorrer até a constatação da amenorreia ou até a confirmação da gravidez (BASTOS & BERTONI, 2014; CHASIN *et al.*, 2014). O consumo da cocaína, sobretudo do crack, acaba por deixar a mulher em situação de vulnerabilidade, seja para obtenção da droga, por meio da prostituição, seja pela exposição a situações de risco ou pela exclusão social que sobrevém do uso de droga (BASTOS & BERTONI, 2014).

A ausência de tratamentos eficazes para a dependência à droga e o número relativamente elevado de mulheres usuárias de crack em situação de vulnerabilidade, geralmente sem acesso à auxílio pré-natal de qualidade, tornam esse problema ainda mais grave (BASTOS & BERTONI, 2014, PEREIRA *et al.*, 2018).

1.6.1 Epidemiologia do uso da cocaína durante a gestação

As mulheres parecem ser mais vulneráveis a desenvolver dependência à cocaína (ROTH *et al.*, 2004; EVANS & FOLTIN, 2005) e, além disso, podem evoluir mais rapidamente da primeira exposição para a dependência (BECKER, 2016).

Uso de cocaína durante a gestação geralmente se associa a outros fatores de vulnerabilidade, tais como: comorbidades psiquiátricas, isolamento social, pobreza, trauma e violência doméstica (KISSIN *et al.*, 2001; OEI *et al.*, 2010). O uso de substâncias durante a gestação pode variar de acordo com a raça e etnia da mulher (FINNIGAN, 2013). O consumo de drogas ilícitas não supera o consumo de tabaco e álcool, também entre as mulheres grávidas, contudo este uso acarreta efeitos consideráveis nas mulheres grávidas e em seus fetos (LAMY *et al.*, 2015). Dessa forma, o uso de drogas na gravidez é tratado como um problema de saúde pública no Brasil, nos EUA e no Canadá (FINNIGAN, 2013; BASTOS & BERTONI, 2014). Nos EUA, a estimativa mais recente é de que 5% das mulheres grávidas fazem uso de uma ou mais drogas (WENDELL, 2013) e que há cerca de 750.000 grávidas expostas à cocaína a cada ano (CAIN *et al.*, 2013).

Um dos mais importantes estudos sobre uso de cocaína na gestação é o *Maternal Lifestyles Study* (MLS), realizado pelo *National Institute of Child Health and Human Development*, nos EUA. Na primeira fase, foram recrutadas 19.079 grávidas, das quais 11.811 concordaram em participar do estudo. Na segunda fase, com os resultados, foi possível identificar metabólitos provenientes da cocaína ou opiáceos no mecônio de 1.185 crianças, ou seja, 10% das análises realizadas (BAUER *et al.*, 2002).

No Brasil, existem poucos dados relacionados à exposição pré-natal à cocaína. Em um estudo realizado em Porto Alegre, no ano de 1999, 739 grávidas foram avaliadas, as quais 16 delas (2,4%) afirmaram fazer uso de cocaína e, em 25 casos (3,4%), a utilização foi confirmada por meio da análise do mecônio (CUNHA *et al.*, 2001). Em 2012, na cidade de Maringá, foi executado um estudo transversal em 25 unidades básicas de saúde com 394 gestantes, dentre as quais 0,51% relatou fazer uso de álcool, cocaína ou maconha (KASSADA *et al.*, 2013). Em São Paulo, estudo realizado a partir de fios de

cabelo das gestantes demonstrou que a taxa de exposição à cocaína juntamente com o álcool foi de 1,7% (ROCHA *et al.*, 2016).

Numa pesquisa quantitativa realizada pela Fiocruz, entre os anos de 2011 e 2013, abrangendo todo o território nacional, foi relatado que mulheres tem um padrão de uso mais intenso da cocaína e do crack quando comparadas aos homens. Os dados referentes ao tempo médio e frequência de uso sugerem um uso mais prolongado por parte dos homens, embora com frequências mais intensas por parte das mulheres. Entre os homens, o tempo médio do consumo de crack foi de, aproximadamente, 83,9 meses e, entre as mulheres, 72,8. Com relação ao número de pedras usadas em um mesmo dia, as mulheres, em média, relataram consumir 21 pedras, enquanto os homens 13 pedras de crack. Mais de um terço dos usuários de crack no Brasil – 39,5% informaram não ter usado preservativo ou outra forma de contracepção em nenhuma das relações sexuais vaginais no mês anterior à entrevista. Além disso, 10% das mulheres entrevistadas nessa pesquisa relataram estarem grávidas e mais da metade já haviam engravidado ao menos uma vez após terem iniciado o uso da droga (BASTOS & BERTONI, 2014).

Esses dados alertam para o número de crianças expostas durante o período intrauterino à droga. Ainda, a dependência à cocaína e, principalmente, ao crack induz um quadro de risco para gestações não desejadas, pois o padrão de consumo está associado a estupros, prestação de favores sexuais e prostituição sem uso de preservativos (CHASIN *et al.*, 2014).

1.6.2 Potenciais mecanismos de ação da cocaína durante a gestação

A farmacocinética da cocaína depende da via de uso, a qual condicionará a velocidade de absorção, a dinâmica de concentração plasmática, a velocidade de início e duração do efeito. A biodisponibilidade da droga é de aproximadamente 70% quando consumida por via respiratória, de 60-80% por via intranasal, variando com a experiência do usuário, e de 100% por via injetável (CHASIN *et al.*, 2014).

As principais complicações maternas relacionadas ao uso de cocaína são as cardiovasculares. A hipertensão decorrente da estimulação adrenérgica e o aumento da agregação plaquetária elevam o risco de infarto agudo do miocárdio e isquemia cerebral.

A estimulação de receptores beta-adrenérgicos no miocárdio e a estimulação central hipotalâmica aumentam a frequência e sobrecarga cardíacas e a pressão sistólica. Somado aos efeitos cardíacos, ocorre ainda uma vasoconstrição periférica e um aumento da demanda cardíaca por oxigênio (PLESSINGER & WOODS, 1990; CHASIN *et al.*, 2014).

A gestação pode aumentar a toxicidade cardíaca da cocaína devido a maior sensibilidade do músculo cardíaco na presença da progesterona (PLESSINGER & WOODS, 1990; KUCZKOWSKI, 2007). Ainda, a atividade das colinesterases é reduzida nesse período, aumentando a meia-vida das monoaminas e da cocaína e prolongando seus efeitos (CHASIN *et al.*, 2014).

Os efeitos cardiovasculares não são dose dependentes e podem ser potencializados pelo uso concomitante de outras drogas e fármacos, tais como: maconha, tabaco, álcool e anestésicos locais (KUCZKOWSKI, 2007; CHASIN *et al.*, 2014), associações frequentes em usuários de cocaína e crack (BASTOS *et al.*, 2017).

O acúmulo da droga nos hepatócitos, juntamente com os efeitos cardiovasculares, pode levar à ruptura hepática. No parto, o uso prévio de cocaína pode induzir comportamento combativo, trombocitopenia, hipotensão resistente à efedrina e alterações na percepção de dor devido a modificações nos receptores opioides. Estudos indicam, também, que o uso de cocaína pode ocasionar hiperreflexia, proteinúria, edema e convulsões (PLESSINGER & WOODS, 1993; TOWERS *et al.*, 1993).

1.6.3 Efeitos gestacionais do uso da cocaína

A cocaína tem ações sistêmicas e efeitos deletérios durante a gestação. Estudos com modelos animais demonstraram que fêmeas tratadas com cocaína durante a gestação apresentaram menor ganho de peso nesse período (CHURCH *et al.*, 1990; JOHNS *et al.*, 1992; PEEKE *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1995; TONKISS *et al.*, 1995; ISO *et al.*, 2000; MALANGA *et al.*, 2007; McMURRAY *et al.*, 2008; McMURRAY *et al.*, 2013; DOW-EDWARDS *et al.*, 2014). A visualização e a intensidade desse efeito, porém, são condicionados a variáveis como espécie, dose, frequência, duração e até mesmo via de administração da droga. A cocaína também induz, nas fêmeas grávidas, uma diminuição

do consumo alimentar (CHURCH *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1995), aumento do consumo hídrico (CHURCH *et al.*, 1990; PEEKE *et al.*, 1994) e alterações na interação com os filhotes no período de amamentação (TONKISS *et al.*, 1995). No parto, foram observados aumento do número de natimortos (CHURCH *et al.*, 1990, ISO *et al.*, 2000) e redução do tamanho da ninhada (CHURCH *et al.*, 1990; TONKISS *et al.*, 1995) em fêmeas tratadas com cocaína durante a gestação.

Estudos observacionais em mulheres que consumiram cocaína durante a gestação sugerem que essa droga pode produzir uma série de complicações para a gestante (CAMARGO & MARTIN, 2014; SMID *et al.*, 2019). Gestantes que utilizam cocaína apresentam risco elevado de descolamento da placenta (HOFFMAN *et al.*, 2016), hipertensão arterial sistêmica, eventos hemorrágicos e tromboembólicos e ganho de peso consideravelmente menor em relação a gestantes que não utilizam a droga (SILVA *et al.*, 1995; TONKIS *et al.*, 1995; REN *et al.*, 2004; CHASIN *et al.*, 2014). Além disso, em animais e humanos, observa-se que grande parte das grávidas não apresentam o comportamento adequado de maternagem, abandonado ou reduzindo a interação com a prole após o parto, o que impacta diretamente no desenvolvimento dos filhotes (McMURRAY *et al.*, 2008; STRATHEARN & MAYES, 2011; NEPHEW & FEBO, 2012). O consumo de cocaína durante a gestação ainda está relacionado a indução de abortos (CHASIN *et al.*, 2014), depressão pós-parto (SINGER *et al.*, 1997) e hiperprolactinemia crônica, alteração hormonal que pode induzir alterações no ciclo menstrual e infertilidade (MELLO & MENDELSON, 1997; PATKAR *et al.*, 2002).

1.6.4 Consequências fetais e ao recém-nascido do uso de cocaína

De forma semelhante ao processo que ocorre no SNC, a cocaína atravessa facilmente a placenta por difusão passiva, devido a sua lipofilicidade, e se acumula no cordão umbilical, no miométrio e na membrana placentária, sendo absorvida pelo feto (De GIOVANNI & MARCHETTI, 2012; CHASIN *et al.*, 2014). A cocaína é encontrada no sangue de cordão umbilical, urina, mecônio, cabelo, tecidos e líquido amniótico (CHASIN *et al.*, 2014). O efeito da cocaína é aumentando potencialmente nos fetos, uma vez que a atividade das enzimas responsáveis pela metabolização da droga em produtos inativos

ainda não está completamente desenvolvida (CHASIN *et al.*, 2014). Esse efeito, associado a imaturidade da BHE e do SNC como um todo, torna o feto mais susceptível a potenciais danos neurobiológicos (De GIOVANNI & MARCHETTI, 2012; CHASIN *et al.*, 2014). Ainda, o potente efeito vasoconstritor da cocaína pode reduzir significativamente a chegada de nutrientes, oxigênio e outros elementos essenciais ao desenvolvimento do feto, podendo ocasionar alterações, entre as quais, a redução do peso ao nascer (BAUER *et al.*, 2005; McMURRAY *et al.*, 2008).

Estudos observacionais em humanos relacionados às concentrações de cocaína no leite materno após administração intranasal pelas mães são escassos, porém, devido às propriedades físico-químicas da droga, é esperado que alguma quantidade de droga seja encontrada no leite após atravessar as barreiras epiteliais por transporte passivo (CHASIN *et al.*, 2014). Dado à imaturidade dos sistemas digestivo e nervoso do recém-nascido, mesmo pequenas quantidades transferidas por meio do leite materno podem ser absorvidas, prolongando à exposição também para o período de amamentação (CRESSMAN *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2016). Além disso, mães que utilizam cocaína durante a gestação geralmente iniciam a amamentação mais tardiamente em relação às que não utilizam a droga, induzindo ainda mais danos à saúde do recém-nascido (ENGLAND *et al.*, 2003; BAUER *et al.*, 2005).

Os estudos em modelos animais citados na subseção anterior também evidenciaram efeitos da exposição pré-natal à cocaína na prole a curto e longo prazo. Os resultados relatados a seguir referem-se sempre ao efeito observado na prole de mães expostas à droga no período gestacional em comparação ao grupo controle. CHURCH *et al.* (1990), demonstraram aumento da mortalidade pós-natal e menor peso ao nascer dos filhotes relacionados às maiores doses de cocaína administradas nas ratas. No estudo de JOHNS *et al.* (1992), os filhotes apresentaram desenvolvimento corporal mais lento em relação ao peso e tamanho. Resultados semelhantes quanto ao desenvolvimento dos filhotes também foram observados por PEEKE *et al.* (1994) e SILVA *et al.* (1995). Neste último, também foi evidenciado significativa redução do crescimento cerebral nos filhotes. TONKISS *et al.* (1995) demonstraram que os filhotes apresentaram deficiências no desenvolvimento corporal, tais como: atraso na abertura dos olhos, no desdobramento da orelha e no desenvolvimento auditivo. Outro estudo do

mesmo grupo demonstrou também retardos no desenvolvimento ósseo, entre os quais, atrasos no desenvolvimento do osso do calcânhar, das vértebras caudais e das falanges dos membros posteriores (TONKISS *et al.*, 1995).

Evidências em modelos animais também apontam para alterações neurofisiológicas, anatômicas e bioquímicas a longo prazo na prole de mães expostas à cocaína durante a gestação. No estudo desenvolvido por SALAS-RAMIREZ *et al.* (2010), os filhotes adultos de ratos apresentaram maior atividade locomotora em modelo de campo aberto quando tratados com cocaína e prejuízos na memória visual e espacial. Esses filhotes também apresentaram aumento da densidade de neurônios no núcleo accumbens. Deficiências de atenção e memória também foram demonstradas em filhotes de coelhos por THOMPSON *et al.* (2005) e de ratos por CHOI *et al.* (1998) e por GENDLE *et al.* (2003). MORROW *et al.* (2002), utilizando teste feito com objetos, indicaram menor capacidade de exploração dos ratos adolescentes e adultos expostos à cocaína no período gestacional, indicando prejuízos na memória de curto prazo.

McMURRAY *et al.* (2015), evidenciaram um aumento de tamanho em regiões cerebrais em filhotes, tais como: o giro do cíngulo e o corpo caloso, podendo afetar funções cognitivas de memória e aprendizagem. Outro estudo do mesmo grupo demonstrou que os filhotes apresentaram níveis máximos de vocalização mais baixos (McMURRAY *et al.*, 2013). Alterações neuroanatômicas também foram encontradas por REN *et al.* (2004). Nesse estudo, os filhotes apresentaram crescimento cerebral pós-natal, espessura cortical total e espessura cortical suprangular menores. Além disso, o número total de células corticais se apresentava reduzido em adultos expostos à cocaína durante a vida uterina.

Alterações comportamentais também foram relatadas em modelos animais. No estudo realizado por DOW-EDWARDS *et al.* (2014), ratos adolescentes apresentaram aumento significativo no tempo de permanência em compartimento condicionado em resposta à administração de cocaína, no modelo de preferência condicionada por lugar. MALANGA *et al.* (2008), demonstraram resultado semelhante para camundongos machos adultos nascidos de mães expostas à droga na gestação. Esses resultados indicam maior predisposição à dependência em filhotes expostos à droga na gestação. THOMPSON *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes em filhotes de coelhos. Os

autores demonstraram deficiência de atenção e memória e desenvolvimento pela preferência de lugar em filhotes machos adultos.

Quanto às alterações bioquímicas e genéticas, SASAKI *et al.* (2014) demonstraram que a exposição pré-natal à droga está associada à regulação positiva do gene DRD1, codificador dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 no córtex pré-frontal na prole na idade adulta. Já no estudo de ZHAO *et al.* (2015), camundongos adolescentes apresentaram prejuízos nas funções cognitivas, possivelmente associados a um efeito epigenético de hipermetilação no gene IGF-II DMR2 no hipocampo. SITHISARN *et al.* (2011) demonstraram aumento dos níveis de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) nos filhotes na idade adulta. No estudo realizado por KELLER & SNYDER-KELLER (2000), a dopamina e seus metabólitos tiveram suas concentrações aumentadas na região nigroestriatal e no núcleo accumbens em filhotes de ratas após o desmame, retornando ao normal no início da idade adulta. Houve também aumento da inervação serotoninérgica após o nascimento, assim como aumento significativo nos níveis de serotonina e seus metabólitos na região do estriado, desenvolvimento de preferência de lugar em filhotes adultos e maior susceptibilidade a convulsões induzidas por cocaína. Por fim, McMURRAY *et al.* (2008) demonstraram, em filhotes de ratos, elevação dos níveis de mRNA de ocitocina na região do núcleo paraventricular do hipotálamo, indicando maior produção de ocitocina nesses animais.

As consequências mais comuns da exposição pré-natal à cocaína encontradas em estudos observacionais em humanos são: nascimento precoce, baixo peso e pequeno tamanho gestacional (Dos SANTOS *et al.*, 2018), dificuldades respiratórias, infartos cerebrais e intestinais, redução da circunferência cefálica, alterações do desenvolvimento cardíaco (KELLER & SNYDER-KELLER, 2000; MEYER & ZHANG, 2009), síndrome do desconforto respiratório agudo e deficiência de nutrientes, síndrome de morte súbita infantil (BAUER *et al.*, 2005), e hipertonia e redução dos reflexos motores no recém-nascido (REN *et al.*, 2004; BUCKINGHAM-HOWES *et al.*, 2013).

No período neonatal, os recém-nascidos expostos à cocaína também apresentam alterações comportamentais, tais como: maior grau de tremores, choro e irritabilidade, além de serem mais sensíveis aos estímulos ambientais dos (KELLER & SNYDER-KELLER, 2000; SANTOS *et al.*, 2018). A prole ou o feto se tornam mais suscetíveis à

dependência prematura, entre outros fatores associados à inibição da recaptação de neurotransmissores responsáveis pela atenção e processamento de informações (CHOI *et al.*, 1998). A exposição pré-natal à cocaína também aumenta o risco de convulsões em recém-nascidos (SCHER *et al.*, 2000; LESTER *et al.*, 2002) e possivelmente está relacionada à teratogênese, resultando em má-formação fetal, embora os estudos ainda não sejam conclusivos (Dos SANTOS *et al.*, 2018).

1.6.5 Evolução e prognóstico da criança e do adolescente expostos à cocaína durante o período gestacional

Nos estudos com modelos animais, foi demonstrado que a exposição pré-natal à cocaína induz alterações comportamentais e cognitivas, alterações na sensibilidade, distribuição e densidade de receptores dopaminérgicos (KUBRUSLY & BHIDE, 2010), alteração da migração neuronal durante o desenvolvimento cerebral embrionário (LEE *et al.*, 2010; McCARTHY *et al.*, 2011), redução do número de receptores GABAérgicos no córtex pré-frontal e aumento da expressão de receptores glutamatérgicos (McCARTHY & BHIDE, 2012), redução da densidade de células da glia (LIDOW, 1995) e redução da neurogênese no desenvolvimento embrionário (LEE *et al.*, 2008). Tais achados podem ajudar a compreender a fisiopatologia na qual a cocaína produz alterações neuropsiquiátricas a longo prazo em humanos expostos à droga durante a gestação.

Nos estudos observacionais em humanos, os efeitos a longo prazo da exposição pré-natal à cocaína ainda são controversos. As evidências apontam que podem ocorrer alterações neuroanatômicas e bioquímicas persistentes nas vias dopaminérgicas e serotoninérgicas em diversas regiões do SNC (KELLER & SNYDER-KELLER, 2000). Essas alterações podem ser as causas do observável aumento do risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas, tais como: depressão, esquizofrenia e transtornos de ansiedade (KELLER & SNYDER-KELLER, 2000; LAMY *et al.*, 2015). Uma possibilidade é que a exposição pré-natal à cocaína tenha efeitos diretos no desenvolvimento da estrutura ou função do cérebro, aumentando a vulnerabilidade das crianças (MAYES, 2002).

Sabe-se que crianças expostas a altos níveis de cocaína durante a gestação comumente apresentam redução da circunferência da cabeça e microcefalia (BADA *et al.*, 2002; BAUER *et al.*, 2005; SINGER *et al.*, 2008; AKYUZ *et al.*, 2014). De fato, estudos de imagem demonstraram diferenças neuroanatômicas entre crianças expostas e não-expostas à cocaína durante a gestação. Estruturas cerebrais corticais e subcorticais, como o corpo caloso (DOW-EDWARDS *et al.*, 2006), núcleo caudado (RAO *et al.*, 2007; RIVKIN *et al.*, 2008), globo pálido (LIU *et al.*, 2013), o tálamo, o putâmen (AKYUZ *et al.*, 2014) tem uma redução volumétrica em crianças expostas à cocaína, enquanto a amígdala um aumento, quando comparadas as crianças não expostas. Uma hipótese é que tais anormalidades possam estar relacionadas às alterações comportamentais e dificuldades cognitivas apresentadas por essas crianças e adolescentes (RAO *et al.*, 2007).

Estudos observacionais demonstraram também que crianças ou adolescentes que sofreram exposição pré-natal à cocaína podem desenvolver comportamento disruptivo (RICHARDSON *et al.*, 1993; ACCORNERO *et al.*, 2011), alterações no crescimento e no raciocínio abstrato (RICHARDSON *et al.*, 2015), no controle inibitório (BRIDGETT & MAYES, 2011) e na capacidade de atenção (CARMODY *et al.*, 2011). Outras alterações apresentadas por crianças ou adolescentes expostos à cocaína durante a gestação incluem déficit de atenção visual, alterações no processamento perceptivo, dificuldade de atenção sustentada, redução da memória processual e visuoespacial e alterações na regulação emocional (HEFFELFINGER *et al.*, 2002; SINGER *et al.*, 2005, SINGER *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009, MINNES *et al.*, 2010). Nas crianças com idade pré-escolar também foi encontrada correlação com atraso no desenvolvimento da linguagem e deficiências no raciocínio verbal (BANDSTRA *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2004; MORROW *et al.*, 2004).

Com relação às alterações comportamentais, crianças expostas à cocaína no período gestacional apresentam maior agressividade e comportamento desafiador, retraimento social, nervosismo, irritabilidade e medo quando comparado a crianças da mesma idade não expostas à droga (BADA *et al.*, 2007). Foi demonstrado, também, que, tais crianças apresentam déficits sociais e emocionais, tais como: embotamento afetivo, insegurança e apego, personalidades passivas e retraídas, mudanças repentinas de

humor e dificuldades para socializar com outras crianças (RODNING *et al.*, 1989; GITTNER & McPHERSON, 1990).

Embora existam evidências biológicas apontando os efeitos da exposição pré-natal à cocaína, tais efeitos devem ser considerados dentro de um contexto ambiental e de desenvolvimento, no qual devem ser avaliados a estrutura familiar, condições socioeconômicas e educacionais. Além disso, devem ser considerados os efeitos comportamentais da droga na mãe, que incluem parentalidade insensível, estresse e depressão materna, fatores que afetam diretamente o desenvolvimento da criança (NAIR *et al.*, 2008; YOMUTO *et al.*, 2008).

A extensão e gravidade das consequências da exposição pré-natal à cocaína estão relacionadas com a dose e frequência de uso no período gestacional, (LIDOW, 2003; LAMY *et al.*, 2015) e, ainda, parecem ter desfechos diferentes no recém-nascido e na criança quando ocorrem em períodos distintos da gestação (MARTIN *et al.*, 2016). Foi demonstrado, por exemplo, que o uso da droga durante o primeiro e segundo trimestre de gestação aumenta o número de reflexos neurológicos anormais, enquanto que o uso durante o segundo e terceiro trimestre reduz a maturidade locomotora e o tônus muscular (RICHARDSON *et al.*, 1996).

A associação de várias drogas durante o período gestacional pela mãe torna difícil a avaliação dos desfechos dos estudos que avaliam as consequências da exposição pré-natal a droga a longo prazo. Os dados devem ser analisados com cautela, considerando as variações nos padrões de uso e sociodemográficas (BASTOS *et al.*, 2017).

1.7 Farmacoterapia para o tratamento da dependência química à cocaína

Atualmente, nenhum fármaco está aprovado para tratamento da dependência à cocaína e crack. Os tratamentos farmacológicos empregados têm como alvo principal o controle sintomático da síndrome de abstinência, conjunto de sintomas que surgem após uma interrupção ou redução abrupta do uso da substância (PIANCA *et al.*, 2014). A farmacoterapia eficaz e segura para o tratamento da dependência à cocaína seria aquela que reduziria o consumo da droga, a intensidade da fissura pela droga (*craving*) e a

gravidade das consequências negativas produzidas pela droga, melhorando, assim, a qualidade de vida do paciente (KINSEY *et al.*, 2010; PIANCA *et al.*, 2014).

Diversas classes farmacológicas têm sido estudadas e empregadas de forma diferente do aprovado em bula, uso conhecido como “*off-label*”, para o tratamento dos sintomas e transtornos associados à dependência à cocaína e ao *crack*. Fármacos antidepressivos são utilizados no tratamento da disforia e sintomas de ansiedade associados à interrupção abrupta do uso da droga (REGIER *et al.*, 1990; PANI *et al.*, 2011). O dissulfiram é empregado para o tratamento de pacientes que fazem associação do consumo de etanol e cocaína, considerando o alto índice de associação dessas drogas e a potencialização dos efeitos da cocaína pelo etanol (REGIER *et al.*, 1990). Os anticonvulsivantes e o lítio podem ser úteis em pacientes com transtorno bipolar associado à dependência à cocaína (BEAULIEU *et al.*, 2012). Os fármacos antipsicóticos, principais agentes bloqueadores da dopamina, podem beneficiar no controle de pacientes que apresentam sintomas psicóticos (KUHAR & PILLOTTI, 1996; PIANCA *et al.*, 2014).

O uso de psicoestimulantes como “substitutos legais” da cocaína tem sido estudado como tratamento, embora ainda sem evidências clínicas consistentes. Fármacos que possuem efeitos similares ao da droga poderiam ser utilizados como “terapia de substituição”, com menores efeitos adversos. Dentre essas substâncias, podemos citar os análogos da anfetamina, os inibidores do apetite, agonistas dopaminérgicos e antagonistas da cocaína. No entanto, esses medicamentos não se mostraram eficazes para o tratamento da dependência de cocaína, até então (SCHUBINER *et al.*, 2002; CASTELLS *et al.*, 2010; RUSH & STOOPS, 2012; MINOZZI *et al.*, 2015).

Apesar dos múltiplos estudos clínicos empregando diferentes farmacoterapias, não há evidências clínicas relevantes de que as classes farmacológicas citadas sejam eficazes para o tratamento da dependência química. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas alternativas, como a imunofarmacoterapia.

1.8 O Sistema imunológico no tratamento da dependência química

Um dos tratamentos mais promissores para a dependência química é a estratégia imunológica (KINSEY *et al.*, 2014). Essa abordagem baseia-se no uso de uma substância imunogênica capaz de induzir a produção ativa de anticorpos antidroga (KINSEY *et al.*, 2009; HEEKIN *et al.*, 2017). Assim, quando a droga administrada se encontra livre na corrente sanguínea, ela se liga aos anticorpos, os quais podem neutralizar a droga e acelerar seu metabolismo (CARRERA *et al.*, 2004). A ligação do anticorpo produz um aumento da massa molecular do complexo droga-anticorpo, o que, teoricamente, impede ou reduz a passagem da droga pela BHE (KINSEY *et al.*, 2009; HEEKIN *et al.*, 2017). Por ser um mecanismo semelhante ao obtido nas vacinas contra bactérias e vírus, a estratégia imunológica para tratamento da dependência química foi popularmente nomeada de “vacina antidroga” (KINSEY *et al.*, 2009; MORENO & JANDA, 2009). Desde a década de 1970, pesquisadores têm realizado estudos para desenvolver vacinas contra uma série de drogas de abuso, tais como: nicotina, cocaína, metanfetamina, oxicodona e heroína (HEEKIN *et al.*, 2017). Alguns estudos clínicos foram conduzidos desde então, porém sem terem obtido um sucesso suficiente para justificar o registro de uma dessas vacinas para uso clínico (CARRERA *et al.*, 2004; KINSEY *et al.*, 2014; BREMER & JANDA, 2017; HEEKIN *et al.*, 2017)

As vacinas antidrogas usualmente tem como insumo farmacêutico ativo (IFA) uma molécula composta pela droga modificada conjugada a um carreador, o qual é uma substância de alto peso molecular e sabidamente imunogênica. A droga é acoplada ao carreador, produzindo um conjugado imunogênico, ou imunoconjugado. Para potencializar a imunogenicidade do composto formado, são adicionados adjuvantes à formulação, ou seja, uma substância que potencializa a imunogenicidade. Os adjuvantes induzem uma resposta inflamatória intensa no local de injeção, ativando, primeiramente a imunidade inata (KINSEY *et al.*, 2009; ORSON *et al.*, 2009, SOMPAYRAC, 2016).

O imunoconjugado e o adjuvante, quando inoculados, induzem o sistema imunológico a produzir anticorpos com afinidade pela droga (KINSEY *et al.*, 2009; ORSON *et al.*, 2009). Os macrófagos fagocitam e degradam o imunoconjugado e as células dendríticas apresentam o epitopo resultante ligado ao Complexo Principal de

Histocompatibilidade (MHC) classe II para linfócitos T CD4⁺, que, então, induzem a maturação dos linfócitos B, por meio da IL-2 e, posteriormente, a produção de anticorpos específicos contra a droga, (MORENO & JANDA, 2009; ABBAS, 2015; BREMER & JANDA, 2017). Esse mecanismo de ação, denominado resposta imunológica humoral T-dependente, é fundamental para que haja memória imunológica e eficácia da vacinação por longos períodos (ABBAS, 2015; BREMER & JANDA, 2017).

Os anticorpos produzidos modificam a farmacocinética da droga, reduzindo sua fração livre na corrente sanguínea, potencialmente atenuando os efeitos da autoadministração da droga e a liberação de dopamina no núcleo accumbens, reduzindo, assim, seus efeitos benéficos (ORSON *et al.*, 2009; KINSEY *et al.*, 2010, HEEKIN *et al.*, 2017). Além de bloquear a passagem pela BHE, os anticorpos produzidos pela vacina podem também ter um efeito catalítico, acelerando a metabolização da droga em moléculas inativas (KINSEY *et al.*, 2010; HEEKIN *et al.*, 2017).

Para que uma molécula seja imunogênica, ou seja, tenha a capacidade de induzir uma resposta imunológica, é necessário que ela seja estranha ao organismo (não *self*), tenha alto peso molecular (geralmente > 1000 g/mol) e alguma complexidade química (SOMPAYRAC, 2016).

Ser estranha ao organismo é necessário para que o mesmo não produza anticorpos contra si e, dessa forma, não induza efeitos adversos e doenças autoimunes (MORENO & JANDA, 2009; SOMPAYRAC, 2016). Moléculas com peso molecular menor que 1000 g/mol, ou seja, a maior parte das drogas de abuso, também não são imunogênicas. A complexidade química refere-se não somente ao peso molecular, mas sobretudo a forma como uma substância é estruturada quimicamente. A complexidade química é necessária para que, num mecanismo de tentativa e erro, o sistema imunológico possa encontrar um ponto de ligação à estrutura química da molécula. A baixa complexidade estrutural faz com que o sistema imunológico não identifique um sítio de ligação e reconhecimento como não *self*. Isso é o que ocorre, por exemplo, com os homopolímeros de aminoácidos ou polissacarídeos simples, com alto peso molecular, porém raramente capazes de induzir uma boa resposta imunogênica, uma vez que não possuem a complexidade química necessária (MORENO & JANDA, 2009; SOMPAYRAC, 2016).

Nos estudos clínicos realizados até agora, uma das limitantes da eficácia das vacinas antidrogas é a baixa imunogenicidade. Tal característica leva a produção de anticorpos em baixas concentrações e de baixa afinidade, reduzindo a eficácia desses anticorpos no bloqueio da ação da droga (KINSEY *et al.*, 2009; KINSEY *et al.*, 2014).

1.9 Vacinas anti-cocaína e o GNE-KLH

1.9.1 Os haptenos

A cocaína é uma molécula estranha ao organismo, mas não possui peso molecular e complexidade química necessários para induzir uma resposta imunológica considerável, sendo denominada, por isso, hapteno. As moléculas haptênicas podem ser peptídeos ou outras pequenas estruturas químicas utilizadas como sítios de reconhecimento para a produção de anticorpos específicos, mas que, por si só, não estimulam a resposta imunológica necessária para tal produção (MORENO & JANDA, 2009; KINSEY *et al.*, 2010). Apesar da falta de imunogenicidade da cocaína, alguns estudos relataram a produção espontânea de anticorpos anti-cocaína em usuários que consumiam altas doses da droga (MARTELL *et al.*, 2009). Os mecanismos pelo qual a cocaína se torna imunogênica nesses indivíduos ainda são incertos. Supõe-se que a exposição repetida à droga e seus contaminantes seja um possível fator indutor de resposta imunológica (ORSON *et al.*, 2014). Essa imunização passiva pela droga, além de aumentar a demanda pela quantidade de substância consumida, parece interferir na eficácia de uma possível vacina anti-cocaína. Isso se deve, possivelmente, ao comprometimento da resposta imunológica pela cocaína e/ou imunomodulação induzida pelos contaminantes da droga (ORSON *et al.*, 2014).

As moléculas de cocaína podem ser modificadas para se tornar bons ligantes para carreadores, cuja conjugação pode tornar a substância imunogênica. Com relação a vacina para tratamento da dependência à cocaína, os principais haptenos desenvolvidos para estudos de imunogenicidade são o GNE, o GNC, o GND, o GNT e a succinil-norcocaína (**Figura 2**) (CAI *et al.*, 2013; KIMISHIMA *et al.*, 2016).

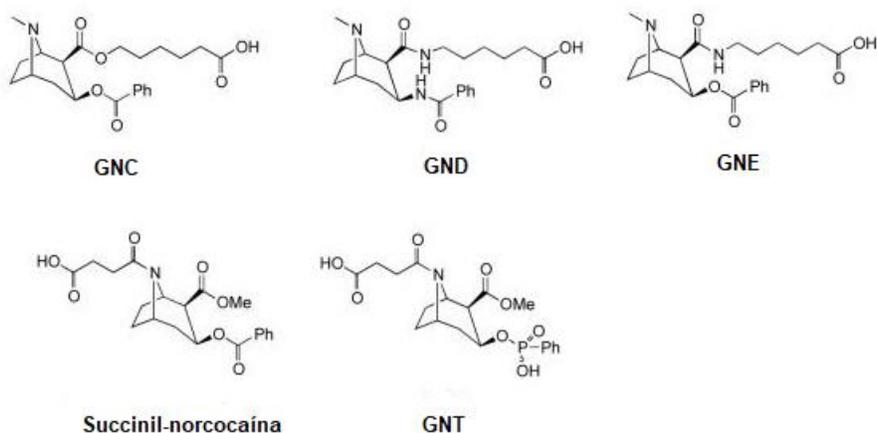


Figura 13 - Estrutura química dos principais haptenos da cocaína.

Fonte: CAI et al. (2013). Modificado.

Esses haptenos da cocaína são nada mais que a molécula da droga ligada a espaçadores, cadeias carbônicas funcionalizadas, que, além de permitir o acoplamento da molécula a um carreador, aumenta a estabilidade química da substância, principalmente a resistência ao processo de hidrólise (SAKURAI *et al.*, 1996; CAI *et al.*, 2013).

Estudos prévios mostraram que, apesar do GNC ser o hapteno que induz maiores títulos de anticorpos e com maior afinidade pela cocaína, sua maior susceptibilidade à hidrólise faz com que essas vantagens não se traduzam em efeitos pré-clínicos significativos, como, por exemplo, a diminuição do comportamento hiperlocomotor induzido pela droga em modelo de campo aberto em animais (CARRERA *et al.*, 1995; CARRERA *et al.*, 2001; CAI *et al.*, 2013). O GND também induz produção de altos títulos de anticorpos, porém o processo de síntese apresenta um baixo rendimento, o que torna pouco viável a utilização para a produção em maiores escalas numa possível vacina anti-cocaína (KIMISHIMA *et al.*, 2016). CARRERA et al. (2001) sintetizaram o GND-KLH – molécula de GND acoplada à hemocianina do molusco *Megathura crenulata* (KLH) - que induziu a produção de anticorpos anti-cocaína de alta afinidade em ratos. Esses anticorpos reduziram a atividade locomotora induzida pela cocaína em modelo de campo aberto e a concentração da droga no corpo estriado e cerebelo dos ratos vacinados.

O GNE é o hapteno que possui maior estabilidade química em relação aos citados anteriormente, sendo susceptível apenas à hidrólise pela butirilcolinesterase. Nos estudos pré-clínicos, o GNE acoplado ao KLH, GNE-KLH, ou à flagelina induziu a produção de níveis elevados de anticorpos IgG anti-cocaína de alta afinidade pela droga e que atenuaram o efeito hiperlocomotor induzido pela cocaína em ratos (CAI *et al.*, 2013; LOCKNER *et al.*, 2015). Por estas razões, tem sido o hapteno mais empregado nesses modelos experimentais (CAI *et al.*, 2013; KIMISHIMA *et al.*, 2016). A succinil-norcocaína (KOSTEN *et al.*, 2014; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2014), uma forma modificada de um dos metabólitos da droga, e o GNT (CAI *et al.*, 2013), também foram testados como haptenos em estudos pré-clínicos, demonstrando bons resultados na produção de anticorpos anti-cocaína

As principais moléculas carreadoras utilizadas nos estudos de vacinas anti-cocaína são a albumina sérica bovina (BSA), o KLH (BAGASRA *et al.*, 1992; CARRERA *et al.*, 1995, KOSTEN *et al.*, 2014) , o toxicoide tetânico (TT) e a proteína de um adenovírus (DDR5) (GADJOU *et al.*, 2006). Algumas preparações conjugando-se a cocaína ou seus derivados a tais proteínas carreadoras foram testadas, ainda com uma resposta imunológica razoável em termos clínicos (GADJOU *et al.*, 2006). O desenvolvimento de moléculas carreadoras que induzam uma resposta imunogênica adequada é essencial para o sucesso desse tratamento contra a dependência à cocaína.

1.9.2 Os adjuvantes

A escolha do adjuvante de resposta imunológica também é crítica para o funcionamento de uma vacina antidroga. O adjuvante completo de Freund, composto por esqualeno, em sua formulação incompleta, e esqualeno e o bacilo Calmet-Guérin inativado, na sua forma completa, produz uma resposta imunológica de alta intensidade. Contudo, seu uso em humanos é restrito à vacinação contra tuberculose, devido aos efeitos adversos, tais como: dores, febre, necrose tecidual e abscessos (SCHEIBNER, 2000).

Os compostos de alumínio tem sido os mais utilizados nas preparações de vacinas, pela sua eficácia na indução de uma resposta imunológica local e pela maior

segurança em relação a outros adjuvantes. Apesar de serem indutores mais fracos da resposta celular, em relação ao adjuvante de Freund, esses compostos diminuem a taxa de liberação do antígeno e aumentam a duração da interação destes com o sistema imunológico (MOHAN *et al.*, 2013, BONAM *et al.*, 2017).

1.9.3 As vacinas testadas

O estudo clínico mais recente com uma vacina anti-cocaína foi realizado com uma molécula constituída pela succinil-norcocaína (metabólito ativo da cocaína) com a toxina do *Vibrio cholerae* subunidade B, bactéria causadora da cólera, como proteína carreadora (TA-CD). Os resultados demonstraram boa tolerância da vacina em 3 aplicações por 2 meses, porém os anticorpos produzidos apresentaram baixa afinidade pela droga, não resultando em efeitos clínicos significativos (KOSTEN *et al.*, 2014). Os estudos foram conduzidos até a fase III, na qual os autores consideraram o tratamento como ineficiente, apesar da produção de anticorpos em 2/3 dos pacientes (KOSTEN *et al.*, 2014).

1.10 A vacinação na proteção da exposição intrauterina à cocaína e crack

A vacinação durante a gestação é uma estratégia eficaz para induzir no feto a imunidade para uma variedade de doenças as quais o sistema imunológico do recém-nascido não seria capaz de reagir de maneira satisfatória (SIMISTER, 2003; ABU-RAYA *et al.*, 2020).

As imunoglobulinas (Ig), produzidas pela mãe por imunização ativa, são transferidas ao feto, conferindo a imunização contra diversos agentes patógenos (KISKOVA *et al.*, 2019; ABU-RAYA *et al.*, 2020). A imunoglobulina G (IgG) é o isotipo de anticorpo mais comumente encontrado nos fetos e no recém-nascido em mamíferos, sendo o único isotipo capaz de atravessar a placenta. Esses anticorpos conferem proteção de longo prazo contra uma série de infecções (SIMISTER, 2003, BØNNELYKKE *et al.*, 2008, SIEGRIST & ASPINALL, 2009; BØNNELYKKE *et al.*, 2010).

Os anticorpos IgG são divididos em subclasses baseadas em pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas.

São elas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (VIDARSSON *et al.*, 2014). As subclasses IgG1 e IgG3 normalmente estão associadas a respostas imunes a antígenos proteicos, enquanto a IgG2 está associada a resposta a antígenos polissacarídeos e a IgG4 é estimulada por citocinas de resposta Th2 (SCHROEDER & CAVACINI, 2010). Todas essas subclasses são capazes de atravessar a placenta, embora em níveis diferentes devido às afinidades distintas aos receptores placentários. No feto, o IgG1 é a subclasse mais comumente encontrada, seguido pela IgG4, IgG3 e IgG2 (COSTA-CARVALHO *et al.*, 1996; Van den BERG *et al.*, 2010). A transferência materno-fetal de IgG pela placenta ocorre principalmente a partir do terceiro trimestre de gestação (MALEK *et al.*, 1994), protegendo o feto durante os 6 primeiros meses de vida enquanto o recém-nascido desenvolve seu próprio sistema imunológico (PALMEIRA *et al.*, 2012).

O IgG materno é transferido da mãe para o feto através da passagem por duas barreiras, a primeira é o sinciciotrofoblasto da placenta e a segunda são as células endoteliais dos capilares fetais (SIMISTER, 2003). O sinciciotrofoblasto corresponde a uma camada de células embrionárias sinciciais originadas do trofoblasto, tendo como uma de suas funções a regulação do transporte de nutrientes de soluto de forma ativa e passiva (KIDIMA, 2015). Sabe-se que o mecanismo de passagem de anticorpos materno-fetal envolve o receptor neonatal Fc (FcRn) (FIRAN *et al.*, 2001; OBER *et al.*, 2004, LOZANO *et al.*, 2018). A molécula de IgG materna se liga ao FcRn e é, então, internalizada através de endossomos no sinciciotrofoblasto. A acidificação do meio no interior do endossomo protege o complexo formado da degradação. Finalmente, o endossomo se funde ao lado fetal do sinciciotrofoblasto e libera o complexo, onde o pH fisiológico promove a separação da IgG do FcRn (KRISTOFFERSEN, 1996; VAUGHN & BJORKMAN, 1998).

Adicionalmente, o leite materno transfere para o recém-nascido, além da IgG, a imunoglobulina A (IgA) (BRANDTZAEG, 2003). Embora todos os isotipos de imunoglobulinas possam ser encontrados no leite materno, a IgA é aquela presente em maior proporção (DEMERS-MATHIEU *et al.*, 2018). Esse anticorpo confere imunidade de mucosas de órgãos como: estômago, intestino e boca, conferindo proteção contra infecções já na superfície. A IgA também está presente no sangue, saliva, lágrimas, secreções respiratórias, intestinais e urinárias (HANSON *et al.*, 2002).

A produção de IgA anti-cocaína nas mães e sua possível transferência ao recém-nascido via leite materno seria de considerável importância quando tratamos da dependência em cocaína e crack, uma vez que o padrão mais comum de uso da droga envolve o primeiro contato com a mucosa nasal. Assim, a presença de IgA reduziria o efeito da droga já no momento da administração.

Embora não seja transferida ao feto via placenta e esteja presente em pequenas concentrações no leite materno (DEMERS-MATHIEU *et al.*, 2018), a produção de imunoglobulina M (IgM) nas mães é um fator importante, pois confere imunidade a curto prazo e participa ativamente da produção de imunoglobulinas de maior especificidade ao antígeno e de duração mais longa (MANZ *et al.*, 2005; YU & LIN, 2016). Além disso, a avaliação dos níveis de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães, juntamente com outros anticorpos, pode ajudar a compreender os mecanismos da resposta imunológica induzida por uma vacina antidroga e prever sua efetividade terapêutica (SHEN *et al.*, 2012).

Sendo assim, os anticorpos IgG e IgA anti-cocaína produzidos pela mãe por meio de imunização ativa, poderiam, também, ser transferidos ao feto, evitando ou reduzindo os efeitos nocivos da droga no feto e recém-nascido. Nesse contexto, a imunização de mães por meio de uma vacina anti-cocaína se apresenta como uma estratégia promissora para reduzir os efeitos deletérios da exposição pré-natal à droga.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A dependência química em cocaína e crack é um problema de grande impacto social e ainda sem um tratamento efetivo e seguro. O uso de cocaína e crack durante a gestação pode ocasionar consequências negativas para as mães e para o feto a curto e longo prazo. Tais consequências estão associadas à passagem da droga pela barreira placentária e pelo leite materno.

A imunoterapia, por meio da vacinação anti-cocaína, tem sido estudada como alternativa promissora para auxiliar no tratamento da dependência química. Paralelamente, a vacinação de mulheres grávidas induz resposta imunológica específica nas mães, com a produção de anticorpos contra diversas doenças e a transferência desses anticorpos para o feto e recém-nascido, por meio da placenta e do leite materno, respectivamente, protegendo a criança durante os primeiros meses de vida. Nesse contexto, aventamos a seguinte hipótese geral:

1. A imunoterapia para dependência à cocaína e crack pode fornecer proteção materno-fetal contra desfechos negativos gestacionais e no período pós-natal imediato associados à exposição intrauterina à droga.

Para testar essa hipótese central, foram desenvolvidos experimentos pré-clínicos utilizando modelo animal e a vacinação com o imunocombinado GNE-KLH. Nesse contexto, aventamos as seguintes hipóteses secundárias:

1. A vacinação com o imunocombinado GNE-KLH é capaz de induzir a produção de anticorpos anti-cocaína dos isotipos IgG e IgM em ratas grávidas (avaliada pelo experimento 1);
2. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH são capazes de reduzir desfechos obstétricos negativos associados ao uso de cocaína, tais como: a. menor ganho de peso na gravidez, b. menor tamanho médio da ninhada, c. maior mortalidade materna, d. maior mortalidade de filhotes no

período de amamentação e, e. menor ganho de peso dos filhotes (avaliada pelo experimento 2);

3. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH no período pré-gestacional estão presentes no leite materno (avaliada pelo experimento 2);
4. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH estão presentes nos filhotes após o desmame (avaliada pelo experimento 2).
5. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH são capazes de atenuar o efeito comportamental induzido pela cocaína nos filhotes após o desmame (avaliada pelo experimento 2);
6. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH são capazes de alterar a sensibilização à cocaína na prole adulta (avaliada pelo experimento 2);
7. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH e presentes nos filhotes apresentam especificidade à droga (avaliada pelo experimento 2);
8. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas na primeira gestação permanecem após o desmame e são transferidos aos filhotes em uma segunda gestação (avaliada pelo experimento 2).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a imunoterapia com GNE-KLH produz algum grau de proteção materno-fetal contra desfechos negativos gestacionais e no período pós-natal imediato associados à exposição intrauterina à cocaína.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar se a vacinação com o imunocombinado GNE-KLH, dentro de um protocolo de vacinação, é capaz de induzir a produção de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína em ratas grávidas (Experimento 1);
2. Avaliar se os anticorpos IgG e IgM anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH são capazes de reduzir desfechos obstétricos negativos associados ao uso de cocaína na gestação, tais como: a. menor ganho de peso na gravidez, b. redução do tamanho médio da ninhada, c. maior taxa de mortalidade materna, d. maior taxa de mortalidade de filhotes no período de amamentação e, e. menor ganho de peso dos filhotes após o desmame (Experimento 2);
3. Avaliar se os anticorpos IgG e IgM anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH no período pré-gestacional e gestacional estão presentes no leite materno (Experimento 2);
4. Avaliar se os anticorpos IgG e IgM anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH estão presentes no soro dos filhotes após o desmame (Experimento 2);
5. Avaliar se os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH são capazes de atenuar o efeito comportamental induzido pela cocaína nos filhotes recém-desmamados (Experimento 2);
6. Avaliar se os anticorpos IgG e IgM anti-cocaína produzidos pelas ratas na primeira gestação permanecem após o desmame e são transferidos aos filhotes em uma segunda gestação (Experimento 2);

7. Avaliar se os anticorpos IgG anti-cocaína encontrados nas mães e filhotes apresentam afinidade pela droga por meio da medida de sua capacidade de bloqueio;
8. Avaliar se os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas imunizadas com GNE-KLH alteram a sensibilização à cocaína na prole adulta (Experimento 2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Descreveremos neste trabalho dois estudos pré-clínicos, experimentais e intervencionistas, que avaliaram a hipótese de proteção materno-fetal na gravidez e amamentação pela imunoterapia com GNE-KLH. Este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA e está registrado com o número 141/2017. Os procedimentos em animais foram realizados considerando as normas providas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA de demais padrões humanitários de experimentação animal.

Nas subseções 4.1 a 4.7 descreveremos os métodos comuns aos dois experimentos (descrição dos animais, drogas, fármacos e reagentes, doses, preparo e vias de administração dos mesmos, determinação das fases do ciclo estral e acasalamento, dosagem de anticorpos anti-cocaína e análise estatística). Na subseção 4.8 apresentaremos os métodos didaticamente divididos por experimento.

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da espécie *Sprague Dawley*, com idade de 12 semanas e massa de aproximadamente 250 g (fêmeas) e 350 g (macho), adquiridos no Biotério Central da UFMG.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram identificados na cauda e mantidos em gaiolas comuns segundo o grupo experimental. Durante a gestação, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais. Após o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de dióxido de carbono, precedida de anestesia com xilazina e cetamina.

4.2 Drogas, fármacos e reagentes

- Cloridrato de cocaína (1ª Vara de Tóxicos do Tribunal de Justiça do Estado de Minas Gerais – Ofícios 14/2019; 60/2019 e 191/2019) – Inibidor da recaptação de catecolaminas, usado para produção do hapteno GNE e para avaliação do comportamento motor nos animais;
- Solução salina estéril 0,9% p/v (Sanobiol®) – Veículo para injeção de cocaína e preparo das emulsões;
- GNE (sintetizada pelo GEQOB – UFMG) – Hapteno derivado da cocaína;
- KLH (Thermo Fisher Scientific®) – Hemocianina do molusco marinho *Megathura crenulata*, carreador de haptenos;
- GNE-KLH (sintetizado pelo NAVEs – UFMG) – Molécula indutora de produção de anticorpos anti-cocaína;
- GNE-BSA (sintetizada pelo NAVEs – UFMG) – Molécula utilizada para sensibilização das placas de ELISA para dosagem de anticorpos anti-cocaína;
- Adjuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich®, EUA) – Adjuvante imunológico composto por uma emulsão de água em óleo adicionada de *Mycobacterium sp*;
- Adjuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich®, EUA) – Adjuvante imunológico composto por uma emulsão de água em óleo sem adição de *Mycobacterium sp*;
- Albumina sérica bovina (BSA - Sigma-Aldrich®, EUA) – Proteína de soro bovino utilizada como carreador do hapteno e componente do tampão de amostras no teste de ELISA;
- Tampão de fixação – Solução utilizada para a fixação da cocaína à placa no Ensaio de Absorção Imunoenzimática (ELISA), composta por carbonato (1,5 g) e bicarbonato de sódio (3,0 g) e azida sódica (0,2 g) dissolvidos em água destilada (1,0 L) e ajustado o pH para 9,6;
- Tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*) – Solução utilizada para o preparo de outros tampões de uso no ELISA, composta por cloreto de sódio (1,37 M), cloreto de potássio (27 mM), fosfato de sódio (81 mM) e fosfato de potássio (15 mM) dissolvidos em água destilada (1,0 L) e ajustado o pH para 7,4;

- Tampão de lavagem – Solução utilizada para a lavagem das placas no ELISA, composta por Tween 20 (0,5 mL) diluído em tampão PBS (1,0 L) e ajustado o pH para 7,4;
- Tampão de amostras – Solução utilizada para diluição de amostras no ELISA, composta por azida sódica (0,2 g) dissolvida em tampão PBS (1,0 L) acrescido de 1% de BSA e ajustado o pH para 7,4;
- Anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina dirigido contra a Imunoglobulina M ou G (IgM ou IgG - Sigma-Aldrich®, EUA) – Ligante do anticorpo primário (anti-cocaína) para o ELISA;
- Substrato SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl (Sigma-Aldrich®, EUA) - Reagente de coloração para o ELISA;
- Solução de hidróxido de sódio 3 N (Sigma-Aldrich®, EUA) – Solução utilizada como reagente de parada no ELISA, composta por hidróxido de sódio (6 g) dissolvido em água destilada (50 mL);
- Ocitocina sintética (UCB/VET®, Brasil) – Estimulante de lactação;
- Cloridrato de xilazina (União Química®, Brasil) – Coadjuvante de anestesia;
- Cloridrato de cetamina (União Química®, Brasil) – Anestésico;
- Tampão de conjugação – Tampão utilizado para dissolução do hapteno (0,083 M fosfato trissódico; 0,1 M EDTA; 0,9 M cloreto de sódio; 0,1 M sorbitol e 0,02% azida sódica; pH 7,2);
- Tampão de purificação – Tampão utilizado para purificação dos imunoconjugados produzidos (0,083 M fosfato trissódico; 0,9 M cloreto de sódio; 0,1 M sorbitol; pH 7,2).

4.3 Preparo dos reagentes, soluções e suspensões, doses e vias de administração

4.3.1 Preparo do hapteno GNE

Os imunoconjugados utilizados neste estudo, GNE-KLH e GNE-BSA, foram preparados a partir da conjugação do hapteno GNE com a respectiva proteína carreadora. O GNE foi produzido e caracterizado conforme método desenvolvido pelo GEQOB e NAVeS (NETO, 2017). A conjugação dos carreadores proteicos ao hapteno

segiu o protocolo descrito no kit IMJECT® EDC Carrier Protein Spin (Thermo Fisher Scientific®, Illinois, USA) conforme descrito a seguir.

4.3.2 Conjugação GNE-KLH/GNE-BSA

Para o acoplamento do GNE às proteínas carreadoras, 2 mg do hapteno foram dissolvidos em 450 µL de tampão de conjugação (**Solução A**). Em outro frasco, dissolveram-se 2 mg da proteína (KLH ou BSA) em 200 µL de água ultrapura, produzindo uma solução de concentração de 10 mg/mL (**Solução B**). A **Solução A** foi adicionada à **Solução B** formando a **Solução C**, por meio de agitação manual. A seguir, diluíram-se 10 mg de 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDC) em 1 mL de água ultrapura e uma alíquota de 50 µL dessa solução foi adicionada na **Solução C** formando a **Solução D** para a produção de GNE-KLH. Para a síntese de GNE-BSA, a **Solução C** foi adicionada em todo o conteúdo resultante da dissolução do EDC. A solução resultante para ambos os imunocjugados permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 2 horas.

4.3.3 Purificação dos imunocjugados

A purificação dos conjugados imunogênicos preparados na subseção anterior foi feita por separação cromatográfica utilizando-se a coluna de dessalinização Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific®, Illinois, USA) de 5 mL, obtida juntamente ao kit de conjugação citado anteriormente. O conteúdo da coluna foi levemente homogeneizado por agitação manual e posteriormente removido por centrifugação a 1.000 x g por 2 min. A coluna foi, então, lavada 3 vezes com 1 mL de tampão de purificação e submetida à centrifugação em cada lavagem nos mesmos parâmetros citados anteriormente. Por fim, toda a **Solução D** foi colocada na coluna e procedeu-se novamente a centrifugação a 1.000 x g por 2 min, coletando-se o conteúdo em um tubo de polipropileno de 15 mL. Alíquotas de 175 µL do conteúdo obtido foram separadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e armazenadas a - 20°C para uso posterior.

4.3.4 Preparo da formulação do imunoc conjugado GNE-KLH

A formulação do imunoc conjugado GNE-KLH (vacina) foi preparada por meio da incorporação da molécula em adjuvante de Freund. A emulsão foi preparada pela mistura de adjuvante de Freund completo ou incompleto e solução salina estéril 0,9% p/v, na proporção de 1:1 e GNE-KLH em quantidades fixas. Dessa forma, em um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 175 μ L de GNE-KLH, foram adicionados 2.412,5 μ L de adjuvante de Freund completo ou incompleto e 2.412,5 μ L de solução salina estéril 0,9% p/v para o preparo de 5 mL de emulsão. A mistura foi homogeneizada em agitador do tipo Vórtex[®] por 30 min a 3.800 rpm. A emulsão controle (placebo) foi preparada da mesma forma, porém com adição de KLH. A integridade da emulsão foi avaliada por meio do teste de gota (MONCADA *et al.*, 1993), no qual 20 μ L da emulsão foram adicionados a 50 mL de água destilada e observados por 1 minuto. A permanência da gota íntegra por esse período indica sua estabilidade para aplicação imediata nos animais (**Figura 3**). Quando houve separação das fases, a mistura foi novamente homogeneizada por mais 10 min a 3.800 rpm em agitador do tipo Vórtex[®]. O adjuvante completo de Freund foi utilizado apenas na primeira imunização em cada protocolo. As demais imunizações utilizaram o adjuvante incompleto de Freund.



Figura 14 – Teste da gota para verificação de estabilidade da emulsão. A ausência de dispersão da gota indica a integridade da emulsão preparada, como observado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.5 Preparo da solução de cocaína

As amostras de cocaína utilizadas no **experimento 2**, originadas de apreensão policial e gentilmente cedidas pelos órgãos competentes, foram previamente purificadas utilizando-se a técnica de cromatografia em coluna de sílica gel (NETO, 2017). Para avaliar a eficácia do processo de purificação, a amostra foi submetida à análise por cromatografia de camada delgada (CCD) e ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono (^{13}C) e hidrogênio (^1H) (NETO, 2017).

A droga foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) no período a partir da constatação da gravidez até o parto, na dose de 20 mg/kg, uma vez ao dia. Tal dose foi escolhida mediante revisão de estudos prévios que demonstraram capacidade de indução de efeitos deletérios gestacionais ou neonatais dessa quantidade de droga administrada na gestação (JOHNS *et al.*, 1992; McMURRAY *et al.*, 2008). A droga também foi administrada nos filhotes após o desmame, na dose de 15 mg/kg, para avaliação da atividade locomotora dos animais. A escolha dessa dose baseou-se em estudos anteriores que demonstraram alterações comportamentais importantes no modelo de campo aberto (*open field*) utilizando dose equivalente de substâncias estimulantes (VALZACHI *et al.*, 2013; BERRO *et al.*, 2014; WILTSHIRE *et al.*, 2015).

Em ambos os protocolos, a solução foi preparada imediatamente antes da aplicação dissolvendo-se uma quantidade de amostra equivalente a 40 mg da droga em 2 mL de solução salina estéril, de modo a obter-se uma solução na concentração de 20 mg/mL. O volume administrado em cada animal foi em torno de 0,2 e 0,4 mL, variando conforme a massa corporal medida no momento da injeção.

4.4 Determinação das fases do ciclo estral e acasalamento

O ciclo estral das fêmeas foi determinado conforme o método padronizado por Vilela *et al.* (2007). O lavado vaginal foi obtido por meio da inserção de uma pipeta de Pasteur contendo cerca de 1 mL de solução salina estéril 0,9% p/v à temperatura ambiente no canal vaginal das ratas. O material colhido foi, então, observado em microscópio óptico na objetiva de 10 vezes. As fêmeas identificadas como estando na

fase proestro foram imediatamente submetidas ao acasalamento (**Figura 4 – A-D**). A fase proestro é caracterizada, microscopicamente, pelo predomínio de células epiteliais nucleadas e ausência ou quantidades mínimas de leucócitos e corresponde a fase na qual ocorre a ovulação (MARCONDES *et al.*, 2002; VILELA *et al.*, 2007).

Para o acasalamento, cada fêmea, devidamente identificada como na fase proestro, foi alocada com um macho em uma mesma caixa. Nos dias subsequentes foi observada, sempre nas primeiras horas da manhã, a presença do tampão vaginal, indicando a ocorrência de cópula ou não e, conseqüentemente, indicando o dia 0 (D0) da gestação (CHURCH *et al.*, 1990). O macho foi retirado da caixa após a constatação do início da gestação. O acasalamento foi mantido com o mesmo macho por, no máximo, 2 ciclos estrais (8 dias). Não sendo constatada a gravidez, o macho foi, então, substituído, procedendo-se conforme descrito anteriormente.

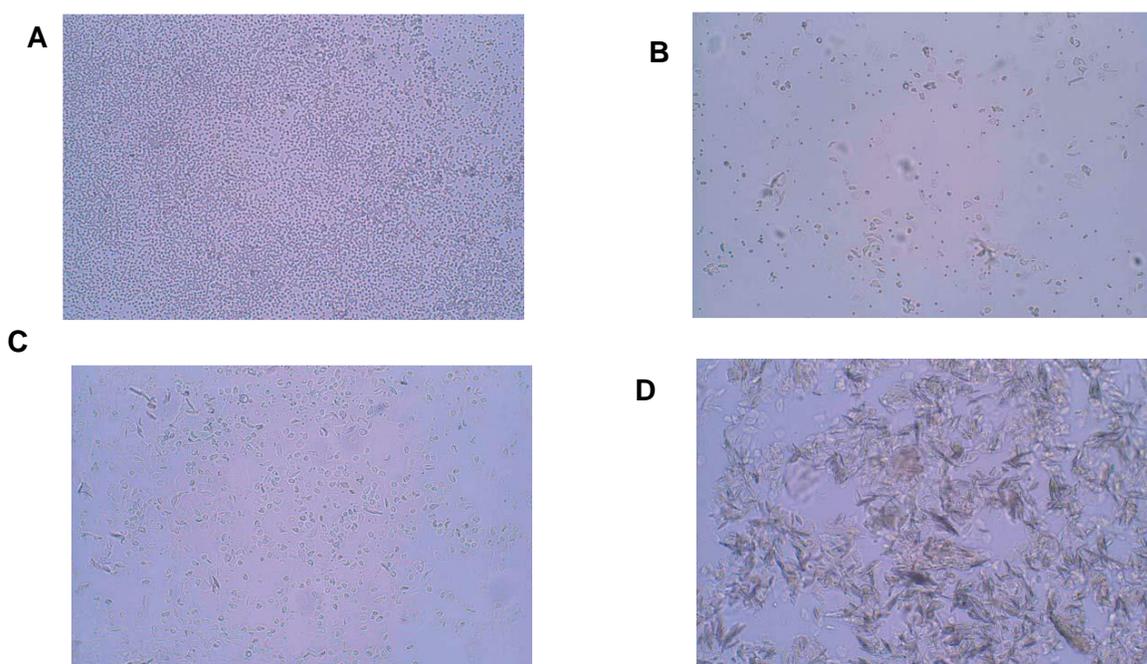


Figura 15 - Fotomicrografia ótica demonstrando as fases do ciclo estral em ratas. (A). Metaestro (B.) Diestro (C). Proestro (D). Estro.
Fonte: VILELA *et al.* (2007).

4.5 Dosagem de anticorpos anti-cocaína – ELISA Indireto

Os títulos de anticorpos anti-cocaína foram medidos no soro sanguíneo das mães e dos filhotes e no soro do leite materno utilizando-se o ensaio de absorção imunoenzimática (ELISA) previamente descrita por FETISSOV (2011) com algumas modificações propostas por PEREIRA (2019). A execução do ensaio imunoenzimático segue três etapas, descritas a seguir:

4.5.1 Etapa 1: Fixação do conjugado GNE-BSA

Uma alíquota de 7 μL do conjugado GNE-BSA foi adicionada ao tampão de fixação completando-se o volume para 10 mL em tubo de polipropileno de 15 mL. Com auxílio da pipeta multicanal, 100 μL dessa solução foram adicionados numa microplaca com 96 poços (MaxiSorb™ Thermo Fisher Scientific®, MA, USA), que foi coberta com filme plástico e papel alumínio e incubada em refrigerador a 4°C durante 24 horas.

4.5.2 Etapa 2: Diluição e incubação das amostras

Uma alíquota de 2 μL de cada amostra de soro sanguíneo foi adicionada em 1.000 μL do tampão de amostras em um tubo de polipropileno de 1,5 mL identificado de acordo com cada animal. Após esse processo de diluição, a microplaca incubada anteriormente foi lavada três vezes com 100 μL do tampão de lavagem em cada repetição. Para cada amostra, uma alíquota de 100 μL de soro previamente diluída foi adicionada em três poços consecutivos da placa (triplicata) que foi, então, coberta com filme plástico e papel alumínio e incubada em refrigerador a 4°C durante 24 horas. Nos três primeiros poços da placa, no sentido horizontal, foram adicionados 100 μL de tampão de amostra puro, correspondente ao branco da amostra.

Nas amostras de soro de leite materno foi realizada uma titulação utilizando-se diluições seriadas para determinar o melhor parâmetro para a análise. Assim, 8 μL de soro de leite materno foram adicionados a 400 μL do tampão de amostra, formando uma diluição inicial de 1:50. A partir daí, uma alíquota de 8 μL da diluição anterior foi adicionada a 400 μL de tampão de amostra para formar a diluição de 1:100 e, assim sucessivamente, para as diluições de 1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000,

1:16.000 e 1:32.000. Após essa etapa, o processo seguiu para ambas as amostras igualmente, conforme descrito a seguir.

4.5.3 Etapa 3: Revelação e leitura da placa

Uma alíquota de 5 μL do anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina (IgG ou IgM) foi adicionada à 10 mL de tampão de amostra formando o tampão de revelação. Após esse processo de diluição, a placa incubada no dia anterior foi lavada três vezes com 100 μL do tampão de lavagem em cada repetição. Uma alíquota de 100 μL do tampão de revelação foi adicionada em cada poço da placa, que, imediatamente, foi coberta com filme plástico e papel alumínio e incubada em banho termostático a 37°C durante três horas. Trinta minutos antes do fim da incubação da placa, foi preparado o substrato (01 comprimido tampão TRIS + 01 comprimido *p*-nitrofenil-fostato diluídos em 20 mL de água destilada em um tubo de polipropileno de 50 mL recoberto com papel alumínio). Após esse processo, a placa foi lavada três vezes com 100 μL tampão de lavagem em cada repetição. Uma alíquota de 100 μL do substrato foi adicionada a cada poço da placa e a mesma mantida à temperatura ambiente e protegida da luz por 40 minutos. Decorrido esse período, 50 μL da solução de parada (hidróxido de sódio 3 N) foram adicionados a cada poço para interromper a reação enzimática. A leitura da densidade óptica foi realizada no leitor de ELISA (Varioskan Lux, Thermo Fischer®) com filtro de 405 nm.

4.6 Dosagem de anticorpos anti-cocaína – Ensaio de competição

Com o objetivo de avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos IgG anti-cocaína à droga, amostras de soro sanguíneo das mães e dos filhotes e do soro do leite materno foram submetidas ao ensaio de competição. As soluções de competição foram preparadas dissolvendo-se 15 mg da droga em 1.500 μL de tampão de amostra, formando a primeira diluição (10^{-2}). As diluições subsequentes foram preparadas pela adição de 15 μL da diluição imediatamente anterior em 1485 μL de tampão de amostra, formando as diluições de 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} mg/mL de cocaína.

As amostras foram diluídas conforme descrito na subseção **4.5.2** (1:500 para o soro sanguíneo e 1:100 para o soro do leite materno). Assim, para o preparo de 3 mL de cada diluição de amostra, 5 µL de soro sanguíneo ou 20 µL de soro de leite materno foram acrescentados em 2495 µL ou 3980 µL de tampão de amostra, respectivamente.

Após esse processo, 300 µL de solução de cada amostra diluída foram acrescentados a 300 µL de solução de competição em cada concentração e a solução obtida foi incubada por duas horas a 4°C sob agitação a 2.800 rpm (FOX *et al.*, 1996; HICKS *et al.*, 2011; HICKS *et al.*, 2014). Então, 200 µL de cada uma das soluções resultantes foram transferidos, em triplicada, para cada poço da placa. A etapa de revelação segue o protocolo na subseção **4.5.3**.

4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP) e um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. O teste de Shapiro-Wilk avaliou a normalidade das amostras. O teste t não pareado com correção de Welch comparou as médias de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína no soro das mães e filhotes e no leite materno e as médias de ganho de peso corporal entre grupos vacinados e tratados com placebo e entre filhotes de mães vacinadas e mães tratadas com placebo. O log da concentração de inibição de 50% do sinal (Log IC₅₀) comparou a intensidade do antagonismo da cocaína no ELISA de competição. As análises e os gráficos foram executados no programa GraphPad Prism 8.01® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

4.8 Protocolos Experimentais

4.8.1 Experimento 1 – Avaliação da eficácia do GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas

Para avaliação da eficácia da imunização com GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas, 16 animais fêmeas foram divididos em 2 grupos experimentais, sendo 8 para o grupo vacinado e 8 para o grupo placebo. As fêmeas receberam, inicialmente, 3 doses de vacina ou placebo, correspondentes aos

dias (D) D0, D7 e D21. O acasalamento se iniciou 7 dias após a administração da última dose (D28), seguindo o protocolo descrito na seção 4.4. As fêmeas receberam nova imunização duas semanas após constatado o início da gestação, equivalente ao tempo D42. O ganho de massa corporal foi medido nas mães no período pré-gestacional a cada 7 dias e no período gestacional a cada 2 dias. No parto, foram observados o número de filhotes nascidos vivos, o tempo de gestação e se houve mortalidade materna. No momento do desmame, os filhotes foram recolhidos das mães, foi feita a separação entre machos e fêmeas e contabilizou-se, novamente, os filhotes vivos (**Figura 5**).

Amostras de sangue foram coletadas das mães nos tempos correspondentes às imunizações (D0, D7, D21 e D42) e no momento do desmame (D70). Nos filhotes a coleta foi realizada apenas no desmame (D70) (**Figura 5**). A coleta foi realizada na veia safena das mães e na veia submandibular dos filhotes (NEVES *et al.*, 2013), utilizando-se agulhas de 0,45 x 13 mm e tubos de polipropileno de 2 mL para armazenamento do material coletado, obtendo-se em torno de 300 µL de sangue por animal. As alíquotas foram centrifugadas a 4°C a 10000 rpm por 20 min. O soro obtido foi separado e armazenado a - 80°C em tubos de polipropileno de 1,5 mL previamente identificados, A dosagem dos anticorpos IgG e IgM anti-cocaína foi realizada pelo método ELISA, descrito nas seções 4.5 e 4.6.

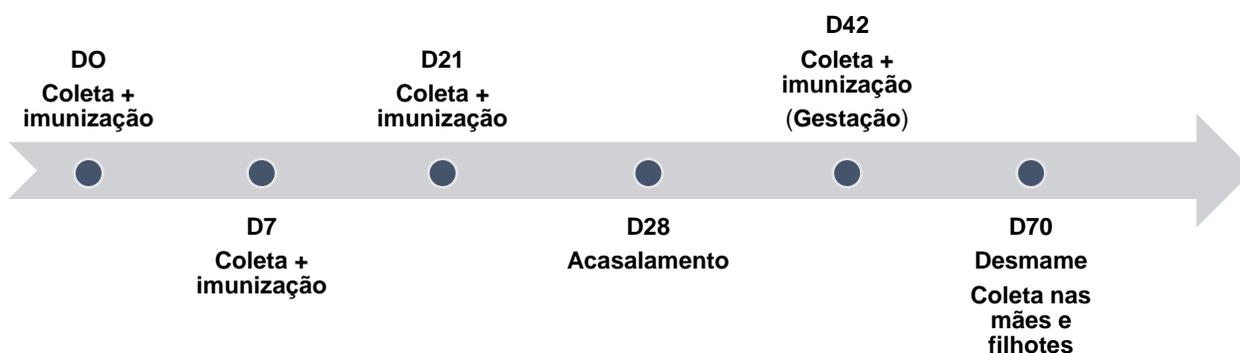


Figura 16 - Linha do tempo do protocolo de avaliação da eficácia da imunização com GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8.2 Experimento 2 – Avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína

Com o objetivo de compreender a dinâmica dos níveis de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína em ratas grávidas tratadas com cocaína e a eficácia desses anticorpos na proteção contra desfechos negativos associados à exposição à droga, 8 animais fêmeas foram divididos em 2 grupos experimentais, sendo 5 para o grupo vacinado e 3 para grupo placebo. Os protocolos de acasalamento, imunizações e coletas foram executados conforme descritos na seção 4.4 e subseção 4.8.1, respectivamente. Amostras de sangue foram coletadas das mães nos tempos D0, D7, D14, D21, D28 (pré-gestação), D35, D42, D57 (primeira gestação), D70, D80, D90, D100 e D150 (pós-gestação e desmame) para dosagem de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína (**Figura 6**).

Após a constatação da gravidez, as fêmeas receberam uma dose diária de 20 mg/kg de cocaína por via i.p. até o final da gestação. O ganho de massa corporal foi medido a partir do dia 4 de gestação até o dia 18, a cada 2 dias. No parto, foram observados o número de filhotes nascidos vivos, o tempo de gestação e se houve mortalidade materna. No momento do desmame, os filhotes foram recolhidos das mães, foi feita a separação entre machos e fêmeas e contabilizou-se, novamente, os filhotes vivos (**Figura 6**).

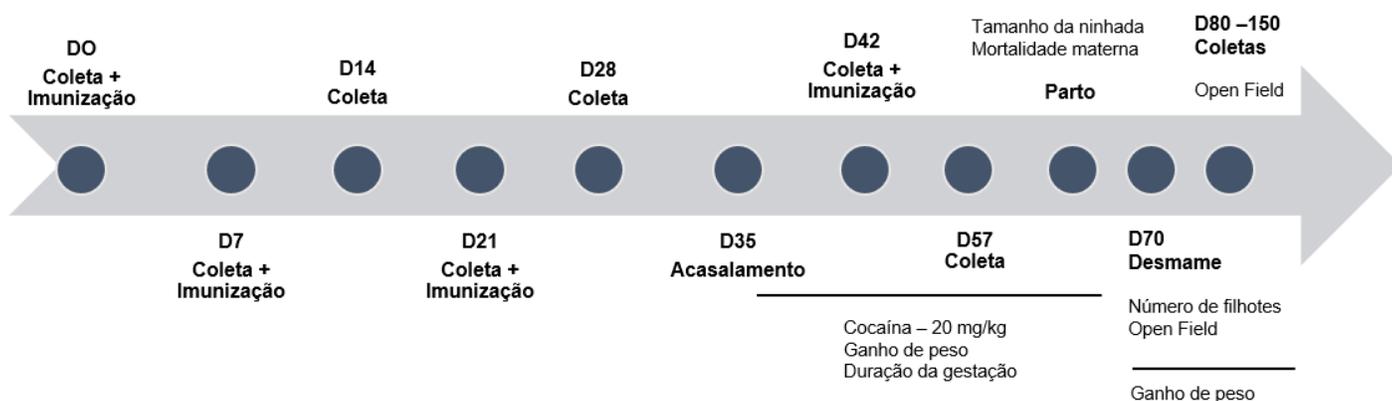


Figura 17 - Escala temporal do protocolo de avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína durante a primeira gestação e o período entre gestações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Amostras de sangue dos filhotes foram coletadas nos dias D0, D7, D14 e D21 após o desmame, também para dosagem de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína, conforme descrito na subseção 4.5 (**Figura 7**)

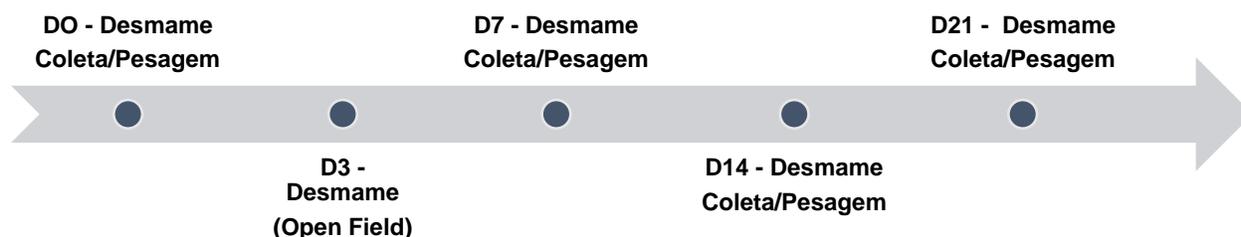


Figura 18 - Escala temporal das coletas nos filhotes na primeira gestação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar a manutenção da produção de anticorpos e a transferência destes para os filhotes em uma segunda gestação, as mesmas fêmeas foram novamente submetidas a acasalamento. Os protocolos de acompanhamento do ciclo estral, acasalamento, coleta, administração de cocaína, medida de massa corporal e dosagem dos anticorpos nas mães e filhotes foram realizados conforme protocolo descritos para a primeira gestação. Os parâmetros avaliados no parto e desmame também foram os mesmos da primeira gestação. O ganho de massa corporal foi medido a partir do dia 3 de gestação até o dia 18, a cada 5 dias. As coletas nas mães foram realizadas nos dias D0, D7 e D14 da gestação, correspondentes aos tempos D170, D177 e D188 do experimento total (**Figura 8**) e nos dias D0, D7 e D14 após o desmame, correspondentes aos dias D226, D233 e D240 do experimento total. Nos filhotes, as coletas foram realizadas nos tempos correspondentes às coletas maternas após o desmame (**Figura 9**).

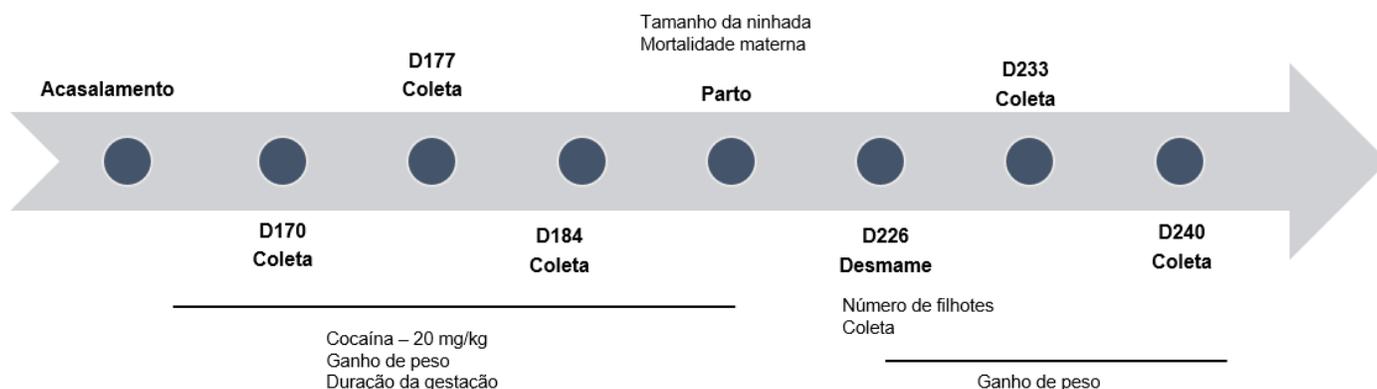


Figura 8 - Escala temporal do protocolo de avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína durante a segunda gestação.

Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 9 - Escala temporal das coletas nos filhotes na segunda gestação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8.3 Avaliação do comportamento locomotor e exploratório dos filhotes em modelo de campo aberto

Para avaliar a ação dos anticorpos IgG anti-cocaína na atenuação do comportamento hiperlocomotor e desinibitório induzido pela cocaína, a prole da primeira gestação foi submetida ao teste de campo aberto. Num primeiro momento, conforme indicado nas **figuras 6 e 7**, os filhotes recém-desmamados foram divididos em 2 grupos experimentais compostos por 12 animais cada, sendo um grupo de filhotes de mães vacinadas e um grupo de filhotes de mães placebo. Os filhotes das mães placebo foram escolhidos aleatoriamente, enquanto os filhotes das mães vacinadas foram escolhidos

conforme os maiores valores de densidade óptica para anticorpos IgG anti-cocaína obtidos no teste de ELISA feito com as amostras da primeira coleta (D0).

Os animais foram habituados na sala de experimentação por 10 minutos. Em seguida, os mesmos foram alocados em caixas cúbicas de madeira da cor branca, revestidas no fundo com plástico azul claro, nas dimensões de 30 cm (altura) x 30 cm (largura) x 30 cm (profundidade) para habituação por 10 min (**Figura 10 A-B**).

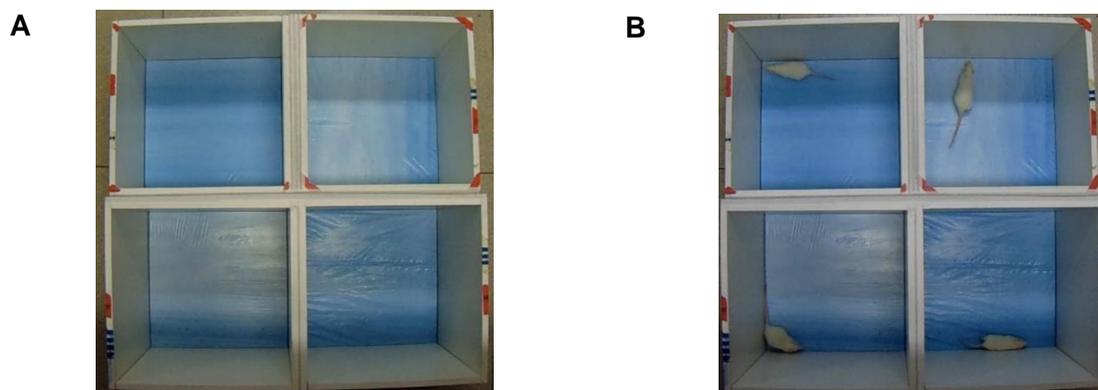


Figura 10 - (A). Aparato utilizado para avaliação da atividade locomotora e exploratória de animais em modelo de campo aberto. **(B.)** Habituação e observação do comportamento dos filhotes durante o experimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após esse período, o animal foi retirado da caixa e a cocaína foi administrada conforme descrito na subseção 4.3.5. O animal foi, então, colocado no centro da sua respectiva caixa e o comportamento do mesmo foi observado durante 30 minutos por meio de uma câmera instalada acima das caixas (DSC-H300, Sony Brasil®) (**Figuras 10 e 11**).

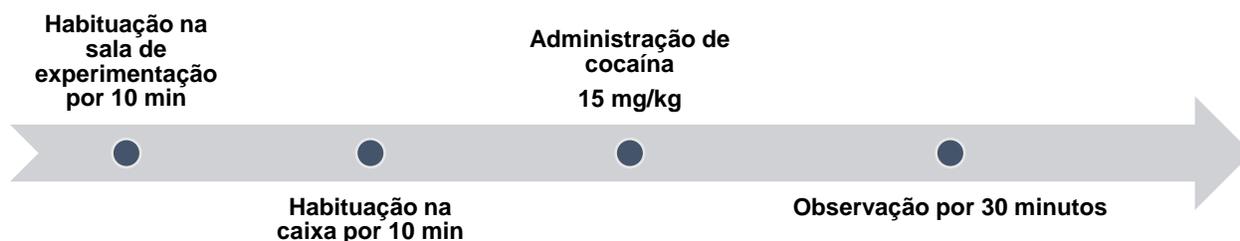


Figura 11 - Escala temporal da avaliação do comportamento locomotor e exploratório dos filhotes no modelo de campo aberto logo após o desmame.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No segundo momento, conforme indicado na **figura 6**, os filhotes da primeira gestação foram avaliados 60 dias após o desmame (81 dias de vida). O objetivo desse protocolo foi avaliar a sensibilização tardia dos animais expostos à cocaína. Para esse teste, foram selecionados 48 animais, sendo 24 filhotes de mães placebo, escolhidos aleatoriamente e 24 filhotes de mães vacinadas, escolhidos conforme os maiores valores de densidade óptica para anticorpos IgG anti-cocaína obtidos no teste de ELISA na primeira coleta após o desmame. A amostra foi dividida em 2 grupos: salina e cocaína, sendo que em cada um foram alocados 12 animais de mães vacinadas e 12 animais de mães placebo.

Os animais foram habituados na sala de experimentação por 10 minutos e no aparato de teste também durante 10 minutos nos dias D1, D2 e D3 do experimento. No quarto dia (D4), cada grupo recebeu o seu respectivo tratamento (solução salina 0,9% p/v ou cocaína 20 mg/Kg) e o comportamento foi avaliado no aparato durante 10 minutos. Após 7 dias (D11), todos os animais receberam uma dose de 20 mg/Kg de cocaína e foram novamente submetidos à avaliação comportamental. Por fim, 7 dias após essa avaliação (D18), todos os animais receberam solução salina 0,9% p/v e o comportamento foi novamente avaliado. Em cada avaliação, foram medidas as massas corporais dos animais e coletadas amostras de sangue para dosagem de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína pelo método ELISA (**Figura 12**).

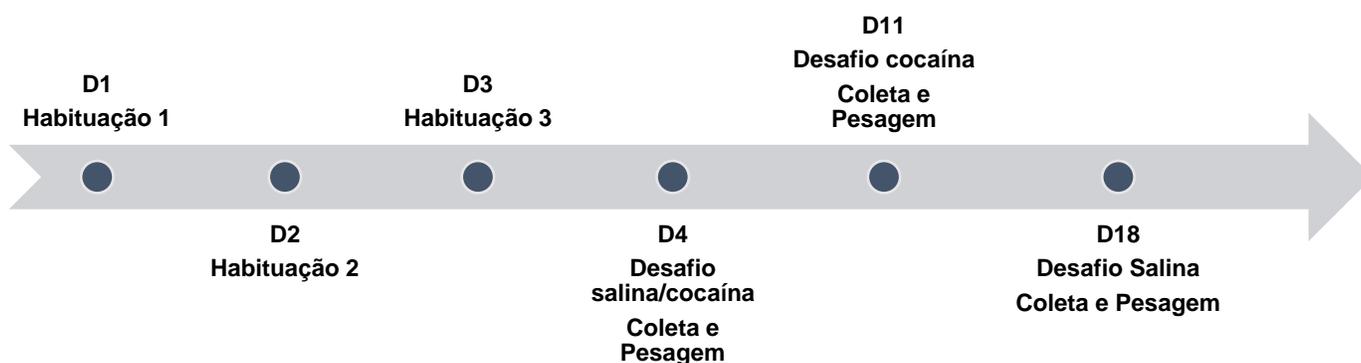


Figura 192 - Escala temporal da avaliação comportamental dos animais no modelo de campo aberto no protocolo de sensibilização tardia à cocaína.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em ambos os protocolos, os vídeos obtidos foram analisados no programa Any-Maze[®] (Stoelting Co., 2019) para obtenção dos dados comportamentais dos animais.

4.8.4 Coleta de leite materno

A coleta de leite materno foi realizada baseada no método proposto por PAUL et al. (2015) com algumas modificações. As amostras foram coletadas no momento do desmame, 21 dias após o nascimento dos filhotes na segunda gestação. Após a separação dos filhotes, as mães foram submetidas à anestesia pela injeção i.p de uma solução de xilazina e cetamina (1:1) na dose de 1 mL/kg. Após constatada a sedação dos animais, estes foram posicionados em decúbito dorsal, devidamente imobilizados, e uma dose de 4 UI de ocitocina foi administrada i.p. Procedeu-se a coleta do leite materno 20 minutos após a injeção de ocitocina, por meio de leves compressões na base da teta do animal. Foram coletados aproximadamente 500 µL de leite de cada animal em tubo de polipropileno de 2 mL. A amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 60 min a 4°C para separação do soro, o qual foi separado e armazenado sob refrigeração a -80°C em tubos de polipropileno de 1,5 mL, para posterior dosagem de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1 – Avaliação da eficácia do GNE-KLH na produção de anticorpos anti-cocaína em ratas grávidas

5.1.1 Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães

Os níveis de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães foram semelhantes antes da vacinação com GNE-KLH ou placebo (**D0**, $0,312 \pm 0,157$ vs. $0,304 \pm 0,202$, $p = 0,93$) e significativamente mais elevados no grupo vacinado em relação ao grupo placebo em todos os tempos avaliados até o final do experimento (**D7**, $2,499 \pm 1,222$ vs. $0,316 \pm 0,251$; $p = 0,0011$; **D21**, $3,413 \pm 0,073$ vs. $0,422 \pm 0,388$; $p < 0,0001$; **D42**, $3,507 \pm 0,099$ vs. $0,569 \pm 0,483$; $p < 0,0001$; **D70**, $2,882 \pm 0,910$ vs. $0,348 \pm 0,354$; $p < 0,0001$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 13**).

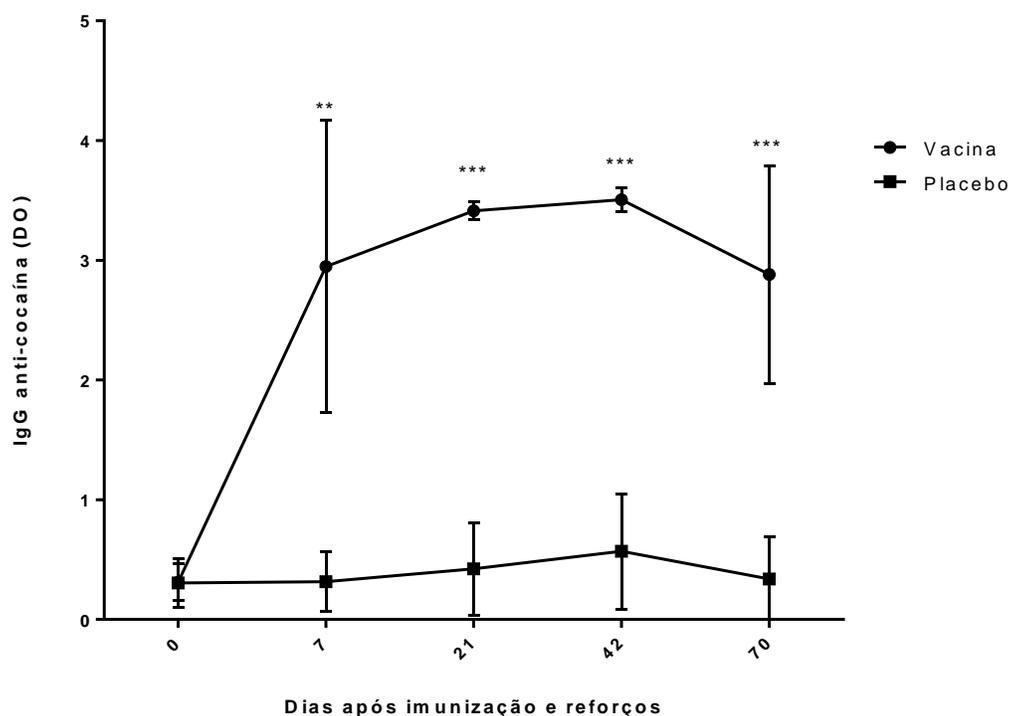


Figura 203 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do primeiro experimento. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 8$.

5.1.2 Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães

Os níveis de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães foram semelhantes antes do tratamento com GNE-KLH ou placebo (**D0**, $0,132 \pm 0,032$ vs. $0,164 \pm 0,045$, $p = 0,12$) e significativamente mais elevados no grupo vacinado em relação ao grupo placebo nos tempos 7, 21 e 42 (**D7**, $1,529 \pm 0,883$ vs. $0,238 \pm 0,042$; $p = 0,0017$; **D21**, $0,778 \pm 0,318$ vs. $0,191 \pm 0,070$; $p = 0,0003$; **D42**, $1,188 \pm 0,638$ vs. $0,259 \pm 0,146$; $p = 0,0019$, teste t de Welch). No tempo 70, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos vacina e placebo (**D70**, $0,605 \pm 0,505$ vs. $0,258 \pm 0,094$; $p = 0,0921$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 14**).

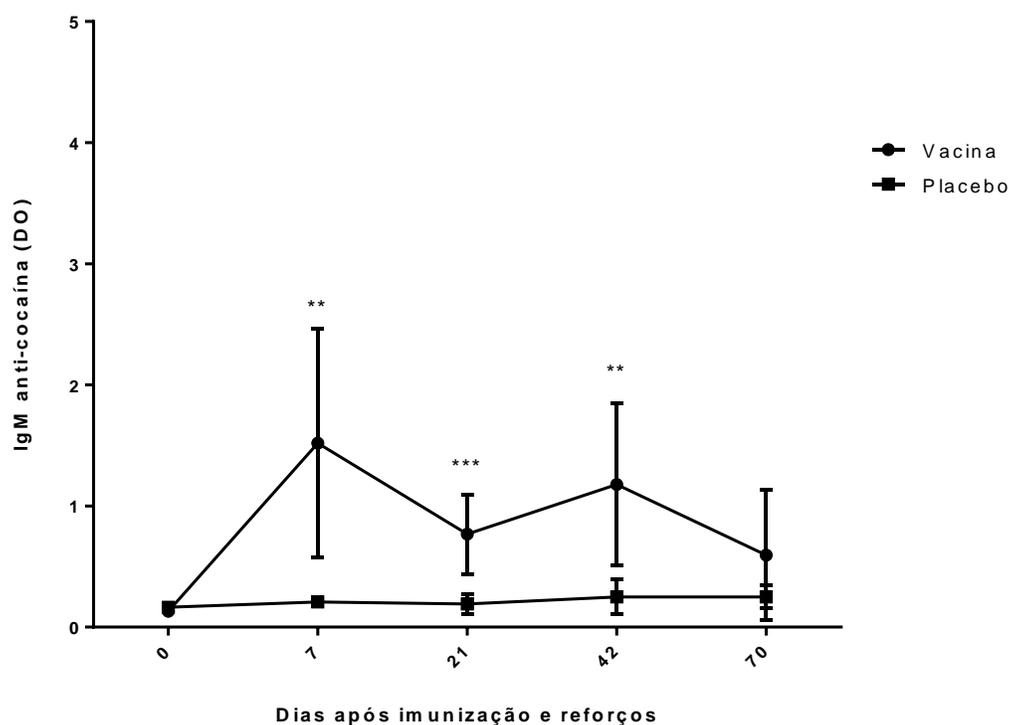


Figura 14 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do primeiro experimento. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 8$.

5.1.3 Ganho de massa corporal das mães

Não houve diferença estatisticamente significativa na evolução da massa corporal absoluta média antes e durante a gestação entre as mães vacinadas e mães não vacinadas (**D0**, 258 ± 11 vs. 253 ± 10 ; $p = 0,35$; **D7**, 270 ± 13 vs. 274 ± 15 ; $p = 0,57$; **D21**, 288 ± 17 vs. 289 ± 10 ; $p = 0,96$; **D28**, 296 ± 14 vs. 296 ± 13 ; $p = 0,94$; **D30**, 299 ± 13 vs. 299 ± 14 ; $p = 0,97$; **D32**, 303 ± 14 vs. 306 ± 15 ; $p = 0,69$; **D34**, 311 ± 11 vs. 311 ± 14 ; $p > 0,99$; **D36**, 319 ± 14 vs. 319 ± 14 ; $p > 0,99$; **D38**, 324 ± 18 vs. 324 ± 16 ; $p = 0,99$; **D40**, 337 ± 21 vs. 336 ± 11 ; $p = 0,88$; **D42**, 362 ± 43 vs. 351 ± 17 ; $p = 0,53$; **D44**, 386 ± 48 vs. 372 ± 26 ; $p = 0,46$; **D47**, 408 ± 50 vs. 403 ± 41 ; $p = 0,86$, teste t não pareado com correção de Welch) (**Figura 15**).

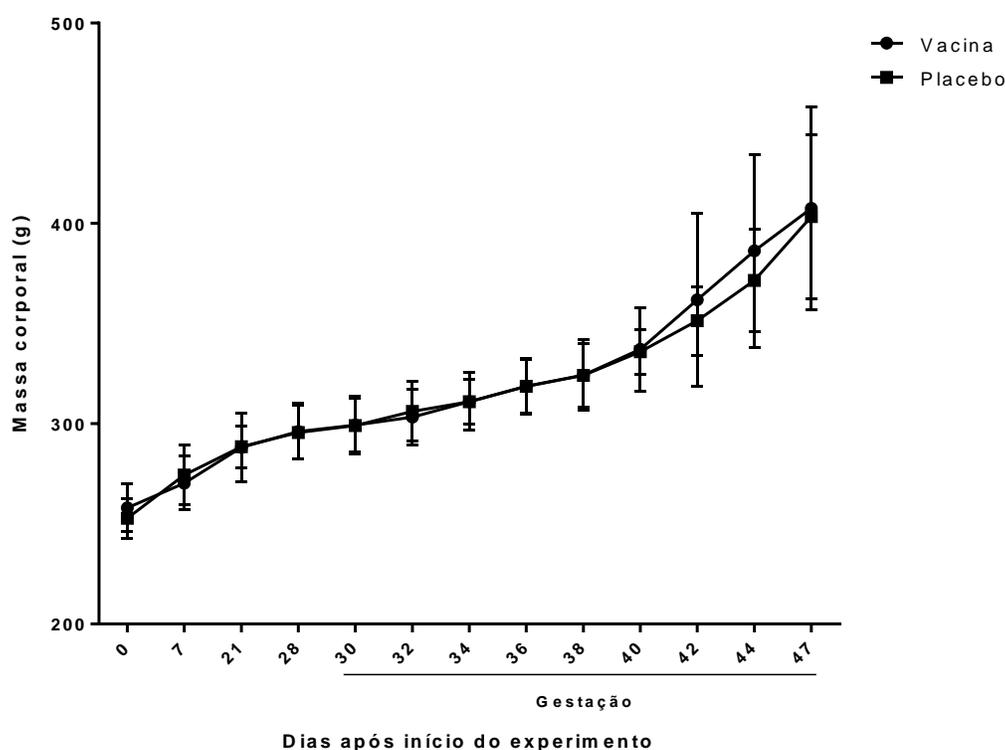


Figura 15 - Evolução da massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), durante os períodos pré-gestacional e gestacional das mães vacinadas e não vacinadas no primeiro experimento. $n = 8$.

Da mesma forma, também não houve diferenças estatisticamente significativas no ganho de massa corporal médio das mães antes e durante a gestação entre mães vacinadas e não vacinadas (**D7**, 12 ± 8 vs. 22 ± 13 ; $p = 0,09$; **D21**, 18 ± 9 vs. 14 ± 7 ; $p = 0,36$; **D28**, 8 ± 11 vs. 7 ± 9 ; $p = 0,87$; **D30**, 3 ± 2 vs. 4 ± 3 ; $p = 0,85$; **D32**, 4 ± 3 vs. 7 ± 6 ; $p = 0,23$; **D34**, 8 ± 8 vs. 5 ± 3 ; $p = 0,35$; **D36**, 8 ± 7 vs. 8 ± 6 ; $p > 0,99$; **D38**, 6 ± 7 vs. 6 ± 5 ; $p = 0,97$; **D40**, 13 ± 15 vs. 12 ± 12 ; $p = 0,87$; **D42**, 25 ± 26 vs. 16 ± 16 ; $p = 0,40$; **D44**, 24 ± 26 vs. 20 ± 21 ; $p = 0,73$; **D47**, 21 ± 18 vs. 32 ± 21 ; $p = 0,29$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 16**).

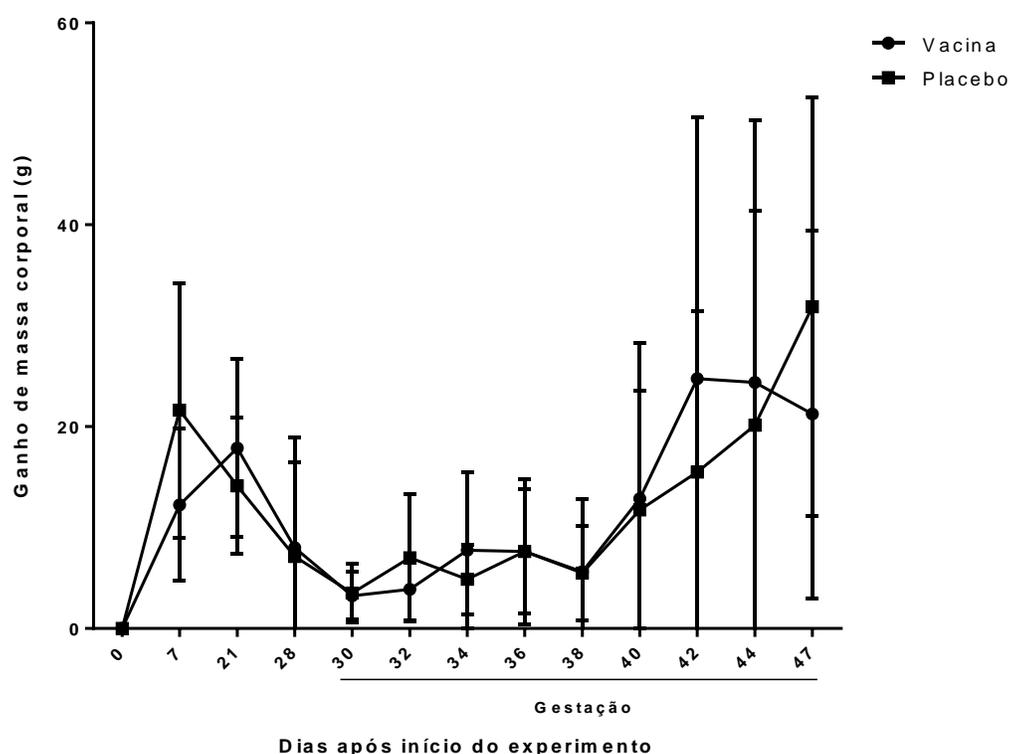


Figura 16 - Evolução do ganho de massa corporal médio, expressa em gramas (g), durante os períodos pré-gestacional e gestacional das mães vacinadas e não vacinadas no primeiro experimento. $n = 8$.

5.1.4 Tamanho da ninhada, mortalidade materna e tempo de gestação

A vacinação com GNE-KLH não interferiu no tamanho da ninhada. Não houve diferença estatística significativa no número médio de filhotes nascidos vivos entre mães vacinadas e mães tratadas com placebo ($9,43 \pm 1,15$ vs. $9,33 \pm 1,50$; $p = 0,96$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 17**). Nenhuma fêmea de qualquer um dos grupos veio a óbito no decorrer deste experimento. Não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de gestação entre os grupos vacinado e placebo ($21,50 \pm 0,56$ versus $20,90 \pm 0,61$; $p = 0,73$)

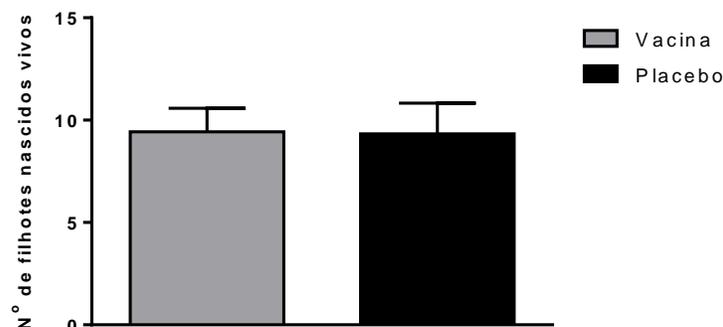


Figura 17 - Número médio de filhotes nascidos vivos em mães vacinadas e não vacinadas. $n = 8$.

5.1.5 Mortalidade de filhotes

A vacinação com GNE-KLH não interferiu na mortalidade de filhotes no período de amamentação. Não houve diferença estatística significativa no número médio de filhotes remanescentes após o desmame entre mães vacinadas e mães tratadas com placebo ($8,14 \pm 0,77$ vs. $7,67 \pm 1,88$; $p = 0,82$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 18**).

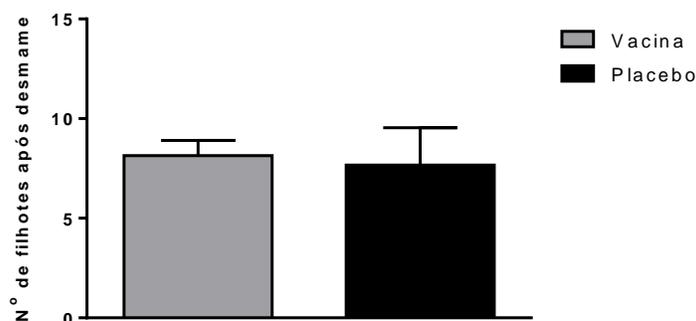


Figura 18 - Número médio de filhotes após o desmame em mães vacinadas e não vacinadas. n = 8.

5.1.6 Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes

Os títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes no desmame foram significativamente mais elevados na prole de mães vacinadas em relação à prole de mães não vacinadas ($1,503 \pm 0,437$ vs. $0,034 \pm 0,006$, $p = 0,005$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 19**).

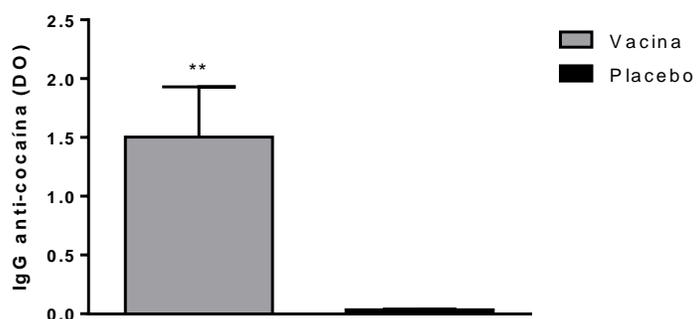


Figura 219 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína no desmame, expressos em densidade óptica (DO), em filhotes de mães vacinadas e não vacinadas. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$). n = 8.

5.1.7 Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nos filhotes

Não houve diferença estatisticamente significativa nos títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína no desmame entre os filhotes de mães vacinadas e não vacinadas ($0,160 \pm 0,057$ vs. $0,133 \pm 0,015$, $p = 0,60$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 20**).



Figura 2022 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína no desmame, expressos em densidade óptica (DO), em filhotes de mães vacinadas e não vacinadas. $n = 8$.

5.2 Experimento 2 – Avaliação da eficácia dos anticorpos IgG anti-cocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína

5.2.1 Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães

Quando as mães foram tratadas com cocaína durante os períodos gestacionais, os níveis de anticorpos IgG anti-cocaína permaneceram maiores no grupo vacinado em relação ao grupo controle em todos os tempos após o dia 0, perdurando até o dia 240, quando a mensuração foi terminada (**Figura 21**) (**D7**, $2,205 \pm 1,535$ vs. $0,112 \pm 0,032$; $p = 0,038$; **D14**, $3,199 \pm 1,590$ vs. $0,112 \pm 0,017$; $p = 0,012$; **D21**, $3,921 \pm 1,524$ vs. $0,150 \pm 0,031$; $p = 0,005$; **D28**, $4,490 \pm 0,998$ vs. $0,126 \pm 0,053$; $p = 0,0006$; **D35**, $4,477 \pm 0,829$ vs. $0,189 \pm 0,102$; $p = 0,0003$; **D42**, $3,018 \pm 0,956$ vs. $0,169 \pm 0,093$; $p = 0,0024$; **D57**, $3,538 \pm 0,854$ vs. $0,133 \pm 0,069$; $p = 0,0008$; **D70**, $4,675 \pm 2,087$ vs. $0,165 \pm 0,077$; $p = 0,00084$; **D80**, $3,496 \pm 1,598$ vs. $0,131 \pm 0,062$; $p = 0,00092$; **D90**, $3,368 \pm 1,673$ vs. $0,100$

$\pm 0,034$; $p = 0,012$; **D100**, $3,811 \pm 1,891$ vs. $0,095 \pm 0,034$; $p = 0,011$; **D150**, $3,666 \pm 0,679$ vs. $0,198 \pm 0,033$; $p = 0,0003$; **D170**, $5,500 \pm 0,318$ vs. $0,269 \pm 0,127$; $p < 0,0001$; **D177**, $2,460 \pm 0,796$ vs. $0,137 \pm 0,023$; $p = 0,01$; **D184**, $5,242 \pm 0,343$ vs. $0,219 \pm 0,057$; $p < 0,0001$; **D226**, $2,835 \pm 0,075$ vs. $0,175 \pm 0,016$; $p = 0,0001$; **D233**, $1,760 \pm 1,300$ vs. $0,183 \pm 0,040$; $p = 0,045$; **D240**, $2,399 \pm 0,369$ vs. $0,283 \pm 0,056$; $p = 0,0087$, teste t não pareado com correção de Welsh). Não foi observada diferença estatisticamente significativa no tempo 0 (**D0**, $0,280 \pm 0,253$ vs. $0,150 \pm 0,026$; $p = 0,423$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 21**).

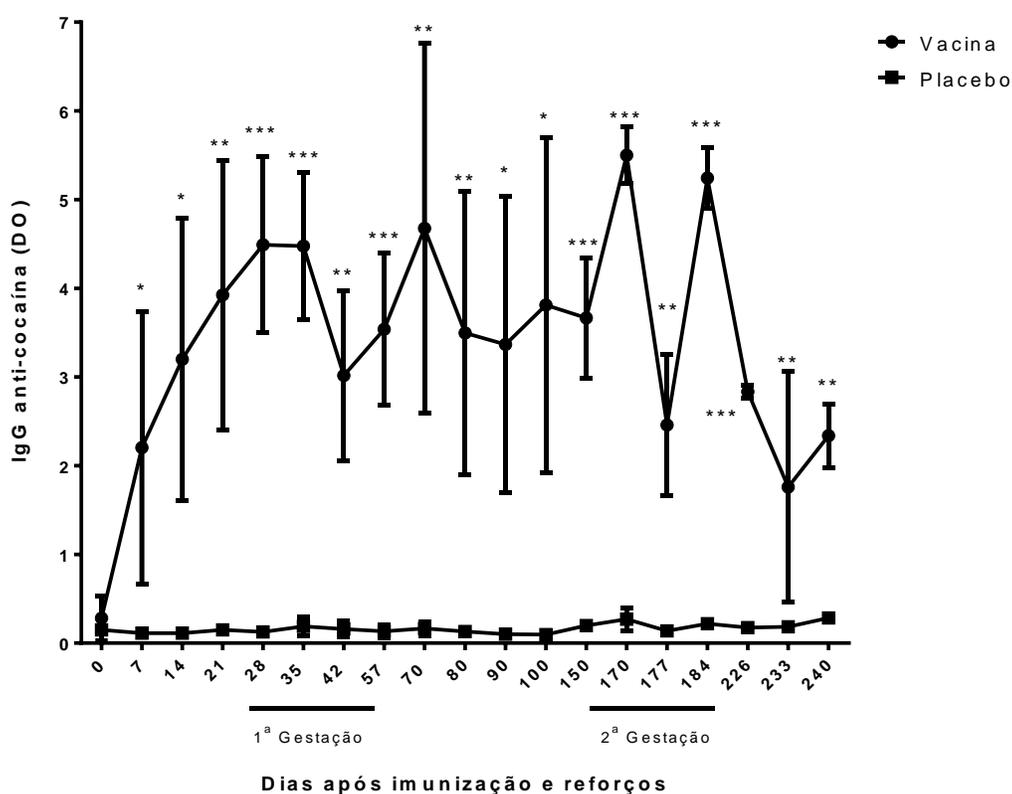


Figura 21 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do segundo experimento. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 3-5$.

5.2.2 Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães

Os títulos de anticorpos IgM anti-cocaína aumentaram rapidamente após a imunização inicial. Observou-se, então, rápida redução entre os tempos 7 e 21, quando novamente aumentam até o tempo 28. Entre os tempos 28 e 42 foi observado novo decaimento, seguido de uma pequena elevação entre os tempos 42 e 57. A partir de então, os níveis de anticorpos permanecem praticamente constantes até o final do experimento, no tempo D240, quando as medidas foram cessadas (**Figura 22**). Os níveis de anticorpos IgM anti-cocaína foram significativamente maiores no grupo vacinado em relação ao placebo em vários pontos do experimento (**D7**, $1,966 \pm 0,924$ vs. $0,273 \pm 0,051$; **D14**, $1,645 \pm 0,337$ vs. $0,228 \pm 0,054$; $p = 0,011$; **D28**, $1,092 \pm 0,276$ vs. $0,210 \pm 0,038$; $p = 0,007$; **D35**, $0,751 \pm 0,075$ vs. $0,263 \pm 0,065$; $p = 0,0003$; **D42**, $0,453 \pm 0,102$ vs. $0,278 \pm 0,053$; $p = 0,033$; **D57**, $0,741 \pm 0,176$ vs. $0,292 \pm 0,052$; $p = 0,022$; **D70**, $0,600 \pm 0,089$ vs. $0,238 \pm 0,053$; $p = 0,049$; **D80**, $0,603 \pm 0,031$ vs. $0,247 \pm 0,070$; $p = 0,021$; **D90**, $0,654 \pm 0,021$ vs. $0,249 \pm 0,046$; $p = 0,0337$; **D100**, $0,644 \pm 0,141$ vs. $0,251 \pm 0,119$; $p = 0,01$; **D150**, $0,600 \pm 0,145$ vs. $0,26 \pm 0,037$; $p = 0,015$; **D170**, $0,518 \pm 0,185$ vs. $0,178 \pm 0,092$; $p = 0,027$; **D177**, $0,377 \pm 0,040$ vs. $0,176 \pm 0,038$; $p = 0,015$; **D226**, $0,528 \pm 0,080$ vs. $0,195 \pm 0,019$; $p = 0,015$, teste t não pareado com correção de Welsh). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos tempos **D0** ($0,193 \pm 0,079$ vs. $0,147 \pm 0,024$, $p = 0,186$), **D21** ($0,417 \pm 0,202$ vs. $0,240 \pm 0,052$; $p = 0,179$), **D184** ($0,441 \pm 0,164$ vs. $0,247 \pm 0,022$; $p = 0,098$), **D233** ($0,411 \pm 0,051$ vs. $0,215 \pm 0,106$; $p = 0,067$) e **D240** ($0,233 \pm 0,105$ vs. $0,202 \pm 0,107$; $p = 0,74$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 22**).

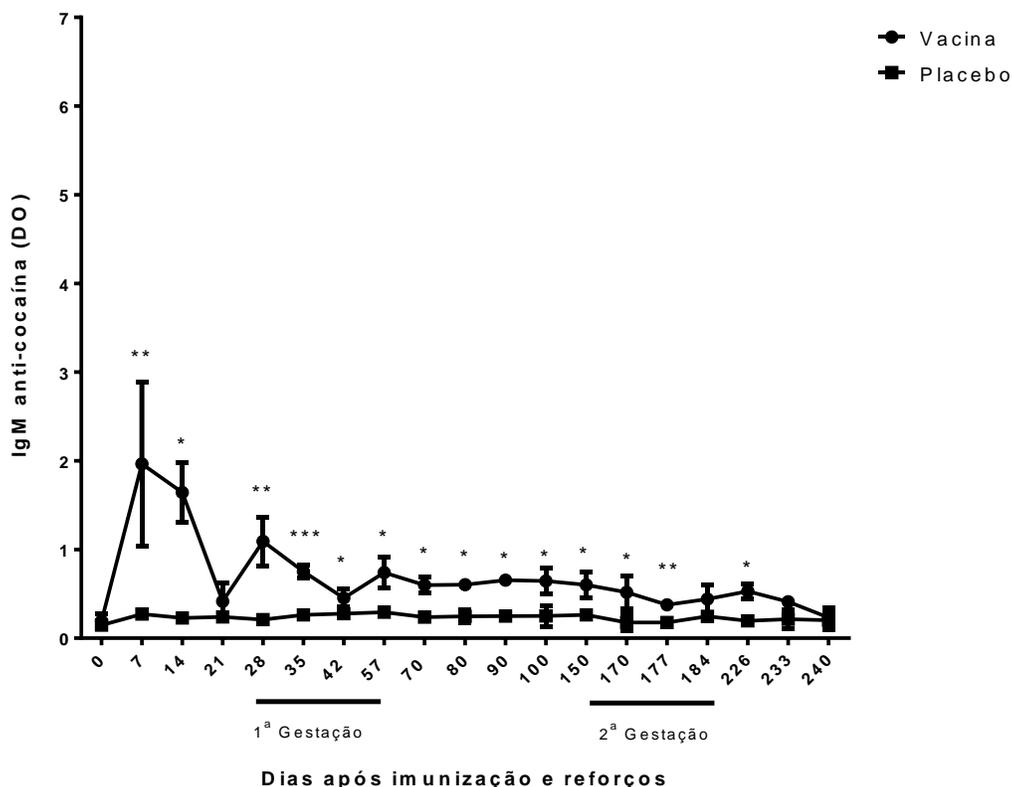


Figura 22 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína nas mães, expressos em densidade óptica (DO), no curso temporal do segundo experimento. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 3-5$.

5.2.3 Ganho de massa corporal das mães

Não houve diferenças estatisticamente significativas na evolução da massa corporal absoluta média em ambos os períodos gestacionais entre mães vacinadas e não vacinadas (**1ª gestação** - **Figura 23** - **D4**, 268 ± 17 vs. 269 ± 20 ; $p = 0,95$; **D6**, 301 ± 10 vs. 301 ± 12 ; $p = 0,93$; **D8**, 316 ± 8 vs. 316 ± 15 ; $p = 0,95$; **D10**, 328 ± 9 vs. 336 ± 13 ; $p = 0,32$; **D12**, 343 ± 13 vs. 360 ± 11 ; $p = 0,11$; **D14**, 364 ± 7 vs. 385 ± 8 ; $p = 0,87$; **D16**, 385 ± 8 vs. 404 ± 7 ; $p = 0,15$; **D18**, 417 ± 10 vs. 425 ± 6 ; $p = 0,25$; **2ª gestação** - **Figura 25** - **D3**, 303 ± 20 vs. 299 ± 16 ; $p = 0,78$; **D8**, 322 ± 16 vs. 313 ± 15 ; $p = 0,52$; **D13**, 333 ± 14 vs. 324 ± 10 ; $p = 0,40$; **D18**, 369 ± 24 vs. 349 ± 1 ; $p = 0,22$, teste t não pareado com correção de Welsh).

Da mesma forma, não houve diferenças estatisticamente significativas no ganho de massa corporal médio em ambos os períodos gestacionais entre mães vacinadas e não vacinadas (**1ª gestação - Figura 24 - D6**, 33 ± 12 vs. 33 ± 10 ; $p = 0,99$; **D8**, 16 ± 4 vs. 14 ± 3 ; $p = 0,64$; **D10**, 12 ± 8 vs. 21 ± 3 ; $p = 0,12$; **D12**, 15 ± 8 vs. 23 ± 4 ; $p = 0,13$; **D14**, 21 ± 13 vs. 25 ± 16 ; $p = 0,71$; **D16**, 21 ± 5 vs. 19 ± 12 ; $p = 0,81$; **D18**, 32 ± 17 vs. 20 ± 3 ; $p = 0,31$; **2ª gestação - Figura 26 - D8**, 18 ± 6 vs. 14 ± 5 ; $p = 0,39$; **D13**, 11 ± 4 vs. 11 ± 7 ; $p = 0,94$; **D18**, 36 ± 20 vs. 24 ± 10 ; $p = 0,41$, teste t não pareado com correção de Welch).

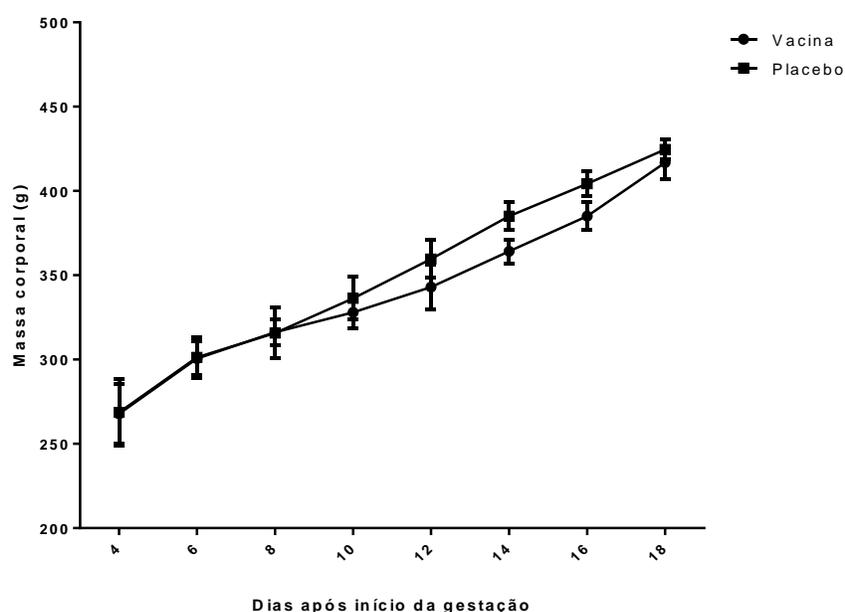


Figura 23 - Evolução da massa corporal absoluta média em mães vacinadas e não vacinadas, expresso em gramas (g), durante a primeira gestação do segundo experimento. $n = 3-5$.

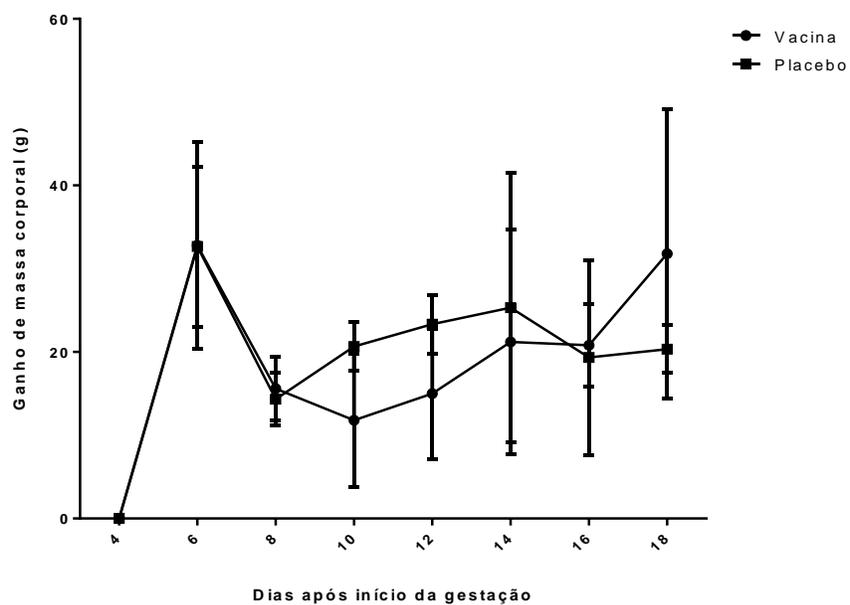


Figura 24 - Evolução do ganho de massa corporal médio em mães vacinadas e não vacinadas, expresso em gramas (g) durante a primeira gestação do segundo experimento. n = 3-5.

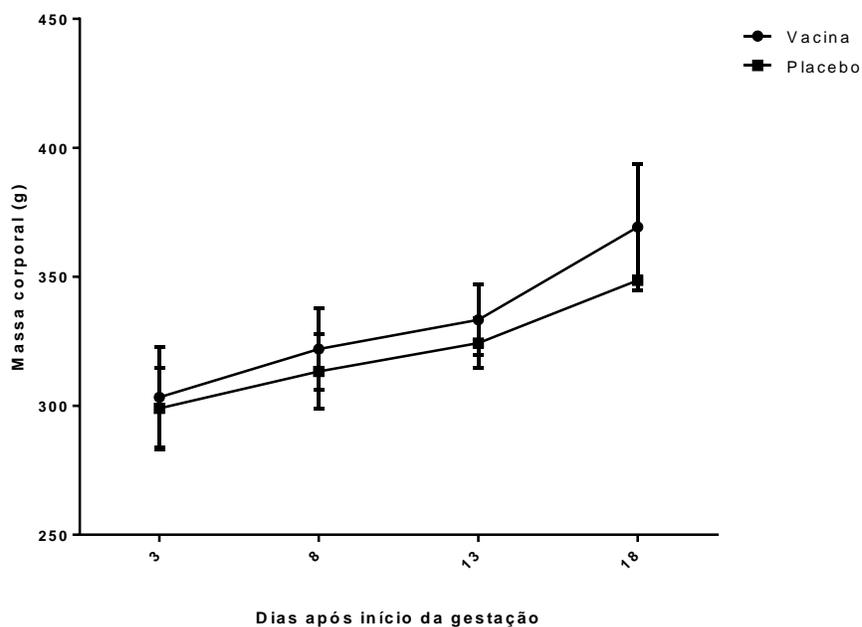


Figura 25 - Evolução da massa corporal absoluta média em mães vacinadas e não vacinadas, expressa em gramas (g) durante a segunda gestação do segundo experimento. n = 3-3.

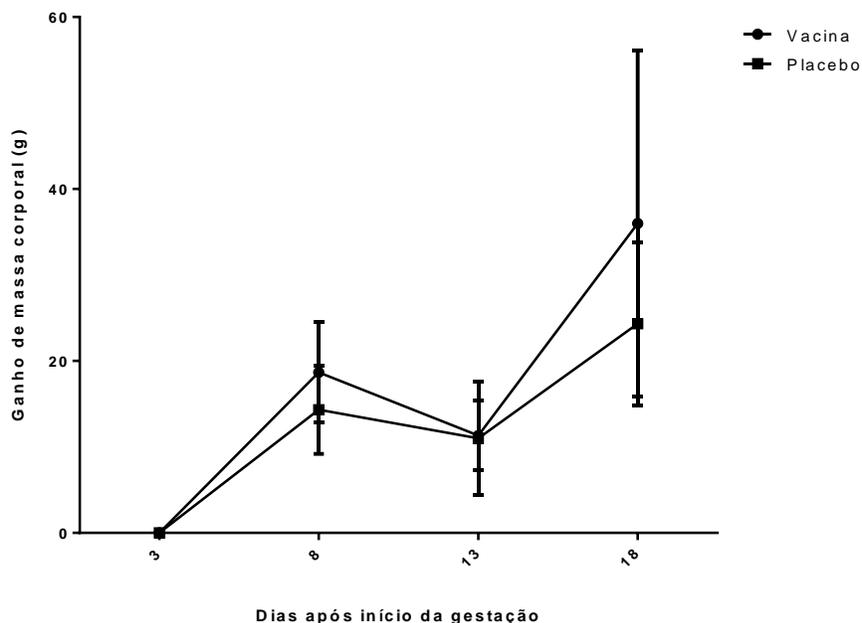


Figura 26 - Evolução do ganho de massa corporal médio em mães vacinadas e não vacinadas, expressa em gramas (g), durante a segunda gestação do segundo experimento. n = 3-3.

5.2.4 Tempo de gestação

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à duração do período gestacional em ambas as gestações entre mães vacinadas e não vacinadas (**1ª gestação**, $21,20 \pm 0,58$ vs $21,00 \pm 0,58$; $p = 0,82$; **2ª gestação**, $21,33 \pm 0,33$ vs $20,33 \pm 0,33$; $p = 0,10$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 27**).

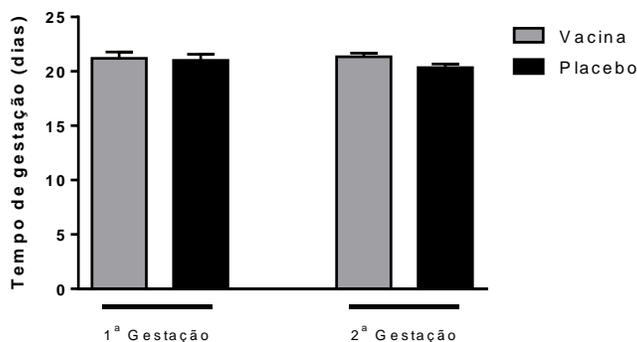


Figura 27 - Tempo médio das gestações, expresso em dias, em mães vacinadas e não vacinadas. n = 3-5.

5.2.5 Tamanho da ninhada e mortalidade materna

Na primeira gestação, o número médio de filhotes nascidos vivos foi significativamente maior nas mães vacinadas em comparação às não vacinadas ($10,20 \pm 0,66$ vs. $7,33 \pm 0,33$; $p = 0,0097$, teste t não pareado com correção de Welsh). Na segunda gestação, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tamanho da ninhada entre os grupos vacina e placebo ($9,67 \pm 1,77$ vs. $9,67 \pm 1,67$; $p > 0,99$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 28**). Nenhuma fêmea de qualquer um dos grupos veio a óbito no decorrer deste experimento.

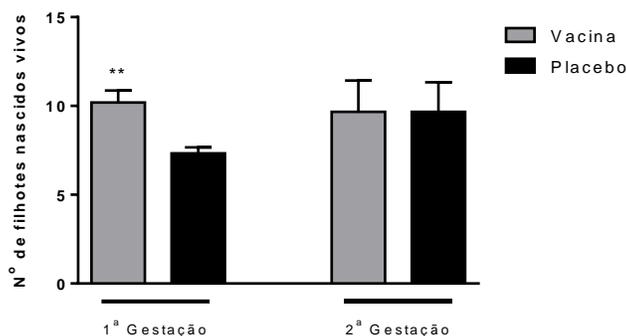


Figura 28 - Número médio de filhotes nascidos vivos em mães vacinadas e não vacinadas. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$). $n = 3-5$.

5.2.6 Mortalidade de filhotes

Em ambas as gestações, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de filhotes após o desmame entre os grupos vacina e placebo (**1ª gestação**, $8,60 \pm 2,18$ vs $6,33 \pm 1,20$; $p = 0,40$; **2ª gestação**, $9,33 \pm 1,45$ vs. $9,00 \pm 1,00$; $p = 0,86$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 29**).

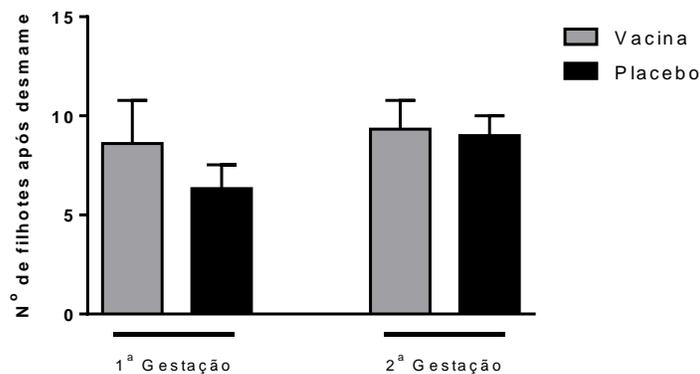


Figura 29 - Número médio de filhotes após o desmame em mães vacinadas e não vacinadas. n = 3-5.

5.2.7 Ganho de massa corporal dos filhotes

Não houve diferença estatisticamente significativa, no período avaliado, na evolução da massa corporal absoluta média entre os filhotes de mães vacinadas e não vacinadas (**D0**, 73 ± 11 vs. 94 ± 19 ; $p = 0,10$; **D7**, 107 ± 13 vs. 126 ± 26 ; $p = 0,39$; **D14**, 142 ± 20 vs. 162 ± 34 ; $p = 0,72$; **D21**, 178 ± 20 vs. 188 ± 41 ; $p = 0,98$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 30**). Da mesma forma, também não houve diferenças estatisticamente significativas, no mesmo período, no ganho de massa corporal médio entre filhotes de mães vacinadas e não vacinadas (D7, 34 ± 8 vs. 32 ± 10 ; $p = 0,44$; D14, 35 ± 14 vs. 36 ± 16 ; $p = 0,88$; D21, 36 ± 16 vs. 27 ± 11 ; $p = 0,27$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 31**).

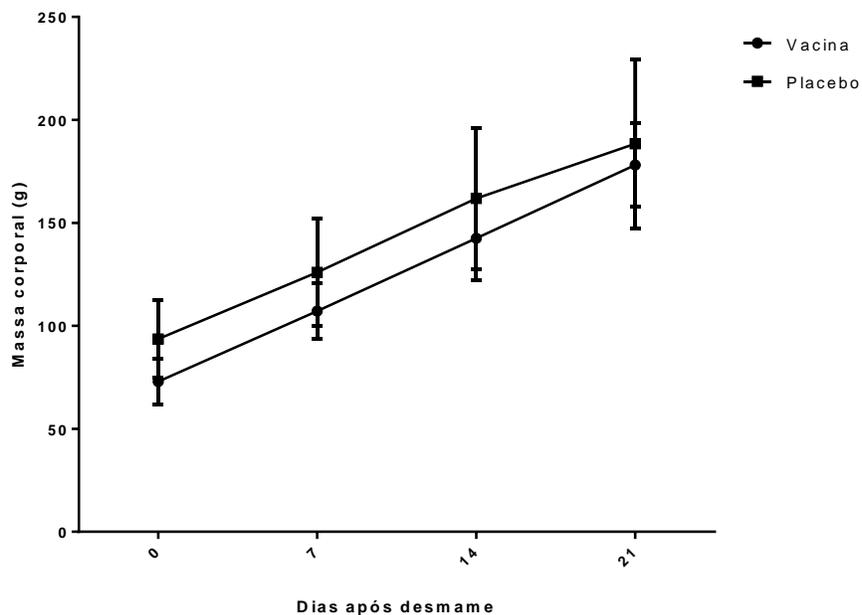


Figura 30 - Evolução da massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), após o desmame em filhotes da primeira gestação de mães vacinadas e não vacinadas. n = 19-43.

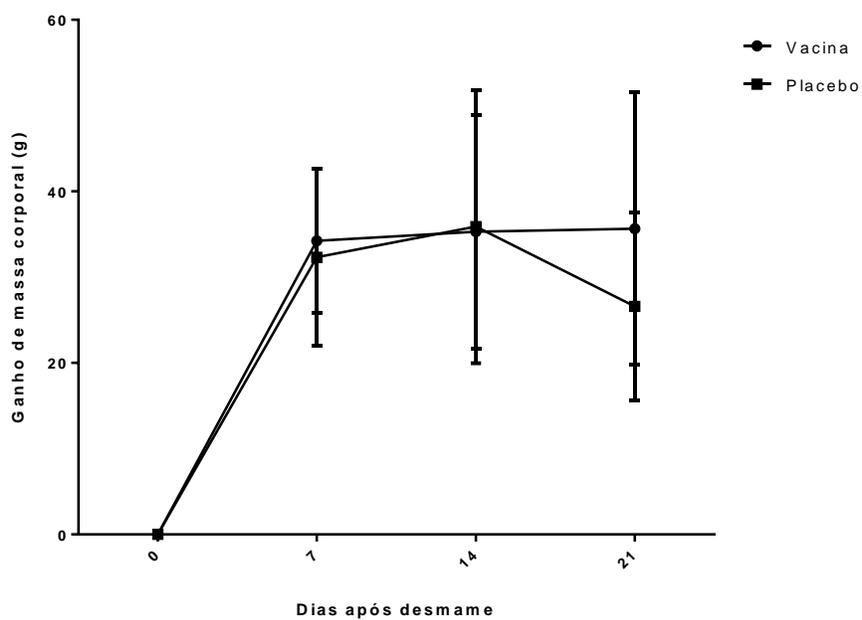


Figura 31 - Evolução do ganho de massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), após o desmame em filhotes da primeira gestação de mães vacinadas e não vacinadas. n = 19-43.

5.2.8 Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes

Filhotes de mães vacinadas com GNE-KLH e tratadas com cocaína durante a gestação apresentaram títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína mais elevados no desmame e no 7º dia após o desmame, em ambas as gestações, em comparação aos filhotes de mães tratadas com placebo e cocaína (**1ª gestação, D0**, $1,961 \pm 1,006$ vs. $0,037 \pm 0,024$; $p < 0,0001$; **D7**, $0,290 \pm 0,152$ vs. $0,145 \pm 0,134$; $p = 0,04$ - **Figura 32** - e **2ª gestação, D0**, $2,412 \pm 0,804$ vs. $0,101 \pm 0,069$; $p < 0,0001$; **D7**, $0,595 \pm 0,382$ vs. $0,103 \pm 0,090$; $p = 0,02$ - **Figura 33**, teste t não pareado com correção de Welsh).

Os níveis médios de anticorpos IgG anti-cocaína foram semelhantes na prole de ambos os grupos a partir do 14º dia após o desmame em ambas as gestações (**1ª gestação, D14**, $0,183 \pm 0,087$ vs. $0,163 \pm 0,082$; $p = 0,39$; **D21**, $0,177 \pm 0,115$ vs. $0,170 \pm 0,097$; $p = 0,80$ - **Figura 32** - e **2ª gestação, D14**, $0,195 \pm 0,064$ vs. $0,254 \pm 0,105$; $p = 0,15$ - **Figura 33**, teste t não pareado com correção de Welsh).

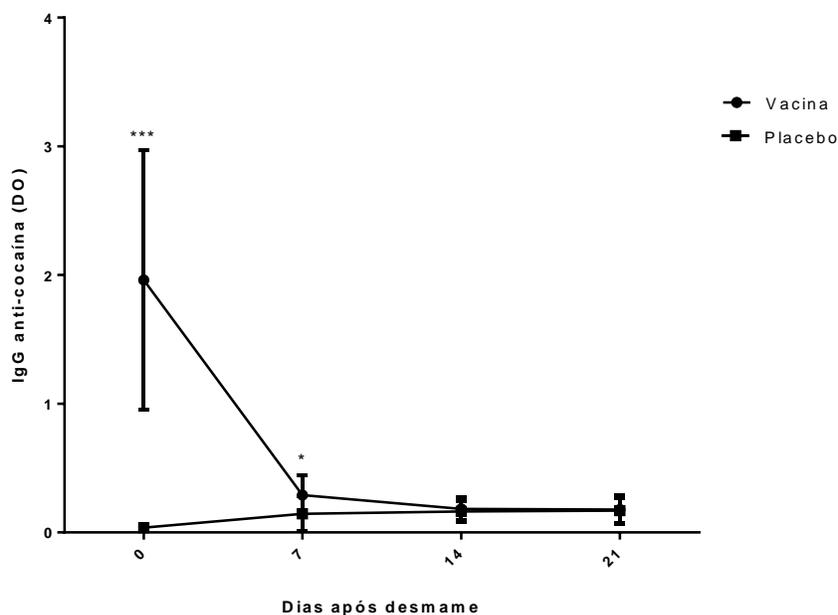


Figura 32 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 21 dias após o desmame da primeira gestação. * e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 19-43$.

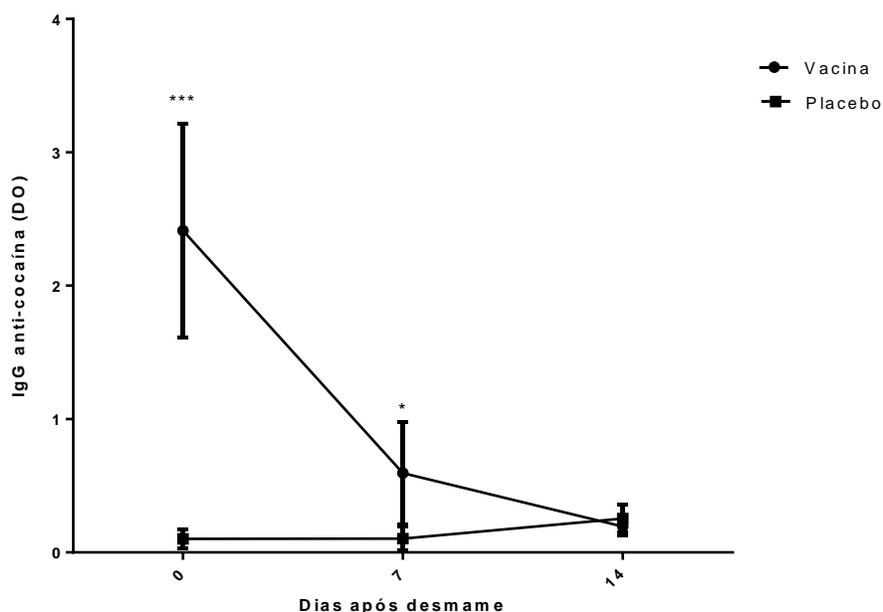


Figura 33 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 14 dias após o desmame da segunda gestação. * e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 27-28$.

5.2.9 Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nos filhotes

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos títulos de anticorpos IgM anti-cocaína entre os filhotes de mães vacinadas e mães não vacinadas até 21 dias após o desmame na 1ª gestação (**D0**, $0,185 \pm 0,072$ vs. $0,176 \pm 0,087$; $p = 0,65$; **D7**, $0,266 \pm 0,117$ vs. $0,308 \pm 0,104$; $p = 0,22$; **D14**, $0,242 \pm 0,082$ vs. $0,298 \pm 0,070$; $p = 0,26$; **D21**, $0,232 \pm 0,074$ vs. $0,301 \pm 0,098$; $p = 0,07$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 34**) e até 14 dias após o desmame na 2ª gestação (**D0**, $0,157 \pm 0,045$ vs. $0,242 \pm 0,074$; $p = 0,14$; **D7**, $0,111 \pm 0,029$ vs. $0,207 \pm 0,053$; $p = 0,11$; **D14**, $0,138 \pm 0,034$ vs. $0,237 \pm 0,056$; $p = 0,45$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 35**).

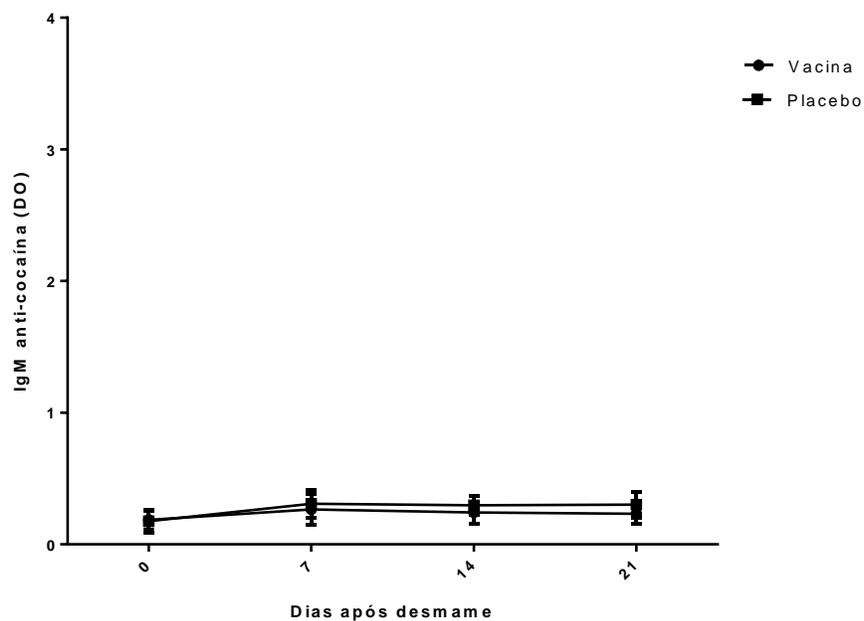


Figura 34 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 21 dias após o desmame da primeira gestação. n = 19-43.

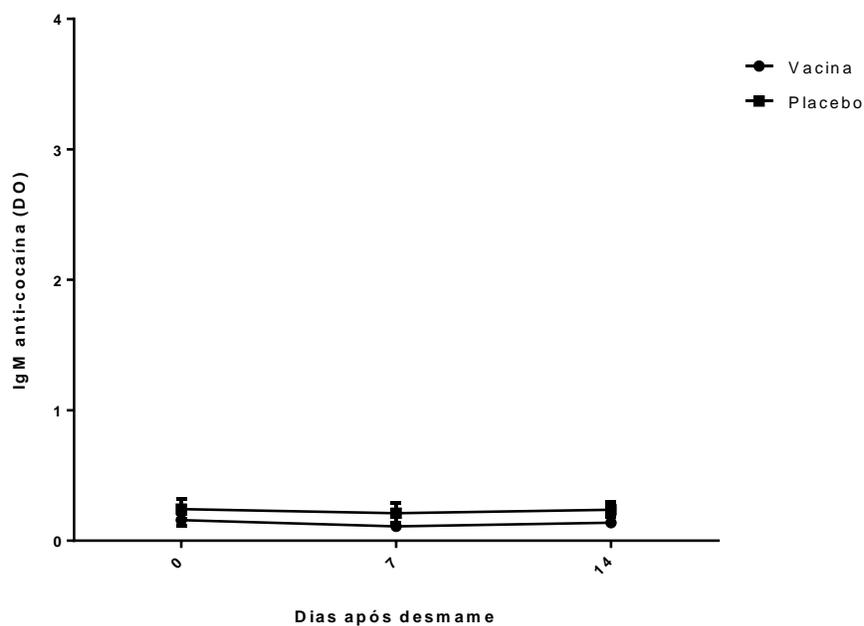


Figura 35 - Títulos médios de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal de 14 dias após o desmame da segunda gestação. n = 27-28.

5.2.10 Atividade locomotora em modelo de campo aberto – efeito agudo da administração de cocaína

Filhotes de mães vacinadas, quando tratados com dose única de cocaína e observados no modelo de campo aberto, apresentaram menor atividade locomotora induzida pela droga em relação aos filhotes de mães tratadas com placebo ($40,04 \pm 8,28$ vs. $107,03 \pm 20,62$ m; $p = 0,0053$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 36**) e menor número de entradas na área central do labirinto do campo aberto (16 ± 5 vs. 47 ± 12 ; $p = 0,0137$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 37**).

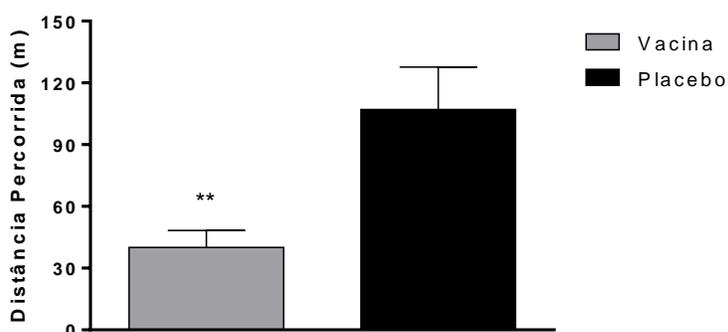


Figura 36 - Distância percorrida média, em metros (m), após tratamento com cocaína, por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$). $n = 12$.

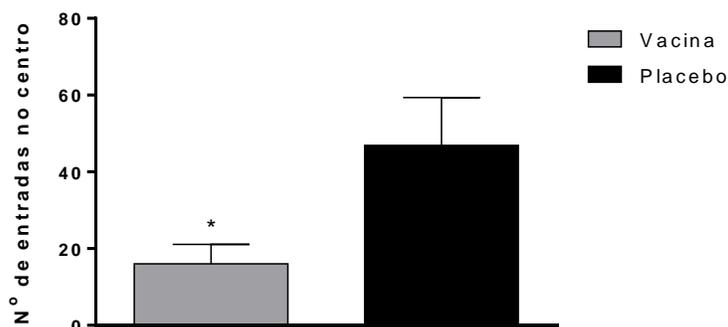


Figura 37 - Número médio de entradas no centro do aparato de observação, após tratamento com cocaína, realizadas por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$). $n = 12$.

A diferença entre os dois grupos também foi avaliada por meio dos gráficos de locomoção dos animais (**Figura 38**). A atividade basal não diferiu entre os filhotes de mães vacinadas (**Figura 38-A**) e não vacinadas (**Figura 38-C**). Após a injeção de cocaína, pode-se observar a diferença na atividade locomotora entre os dois grupos, sendo que, os filhotes de mães vacinadas (**Figura 38-B**) se locomoveram menos que os filhotes de mães não vacinadas (**Figura 38-D**).

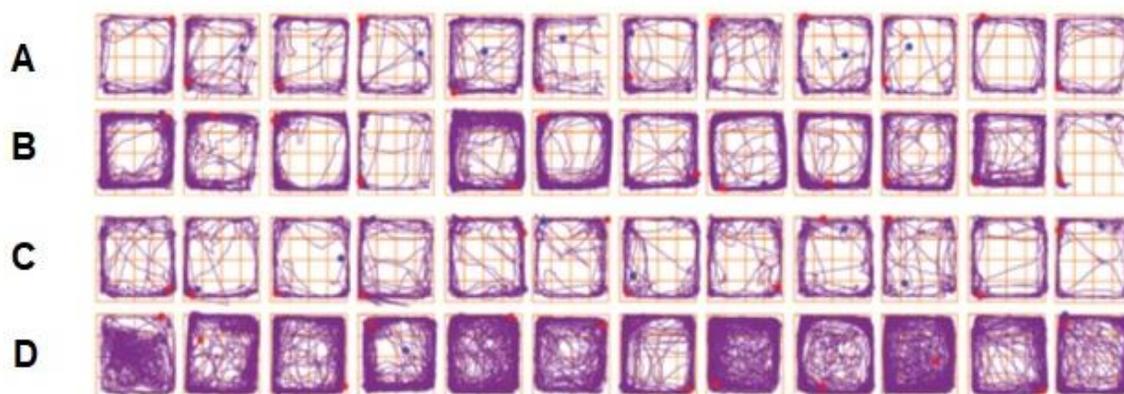


Figura 38 - Gráficos de locomoção em filhotes de mães vacinadas, na parte superior, e de mães não vacinadas, na parte inferior. (A) Basal de filhotes de mães vacinadas. (B) Pós-tratamento com cocaína de filhotes de mães vacinadas. (C) Basal de filhotes de mães não vacinadas. (D) Pós-tratamento com cocaína de filhotes de mães não vacinadas.

5.2.11 Atividade locomotora em modelo de campo aberto – efeito da sensibilização tardia à cocaína

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos títulos de anticorpos IgG (**Figura 39**) e IgM (**Figura 40**) anti-cocaína entre os grupos avaliados em nenhum dos momentos do tratamento (**IgG, D2**, $0,418 \pm 0,221$ vs. $0,321 \pm 0,174$, $p = 0,30$ e $0,326 \pm 0,182$ vs. $0,363 \pm 0,354$; $p = 0,78$; **D9**, $0,301 \pm 0,183$ vs. $0,147 \pm 0,051$, $p = 0,27$ e $0,237 \pm 0,150$ vs. $0,194 \pm 0,192$; $p = 0,60$; **D16**, $0,578 \pm 0,222$ vs. $0,395 \pm 0,372$, $p = 0,27$ e $0,393 \pm 0,114$ vs. $0,384 \pm 0,251$; $p = 0,93$; **IgM, D2**, $0,239 \pm 0,233$ vs. $0,207 \pm 0,053$, $p = 0,69$ e $0,182 \pm 0,082$ vs. $0,224 \pm 0,110$; $p = 0,36$; **D9**, $0,171 \pm 0,07$ vs. $0,176 \pm 0,050$, $p = 0,82$ e $0,172 \pm 0,053$ vs. $0,165 \pm 0,059$; $p = 0,80$; **D16**, $0,225 \pm 0,092$ vs. $0,296 \pm 0,064$, $p = 0,68$ e $0,293 \pm 0,064$ vs. $0,285 \pm 0,061$; $p = 0,83$, teste t não pareado com correção de Welsh).

Nota-se, também, que os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína são menores àqueles medidos para os mesmos filhotes no momento do desmame (**Figuras 32 e 33**).

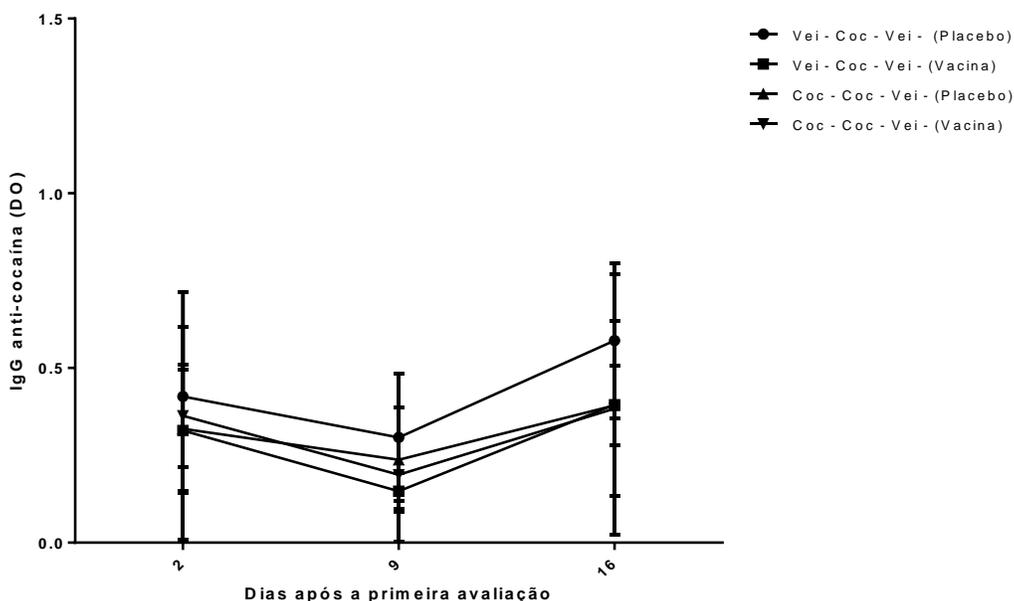


Figura 39 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. $n = 9-10$.

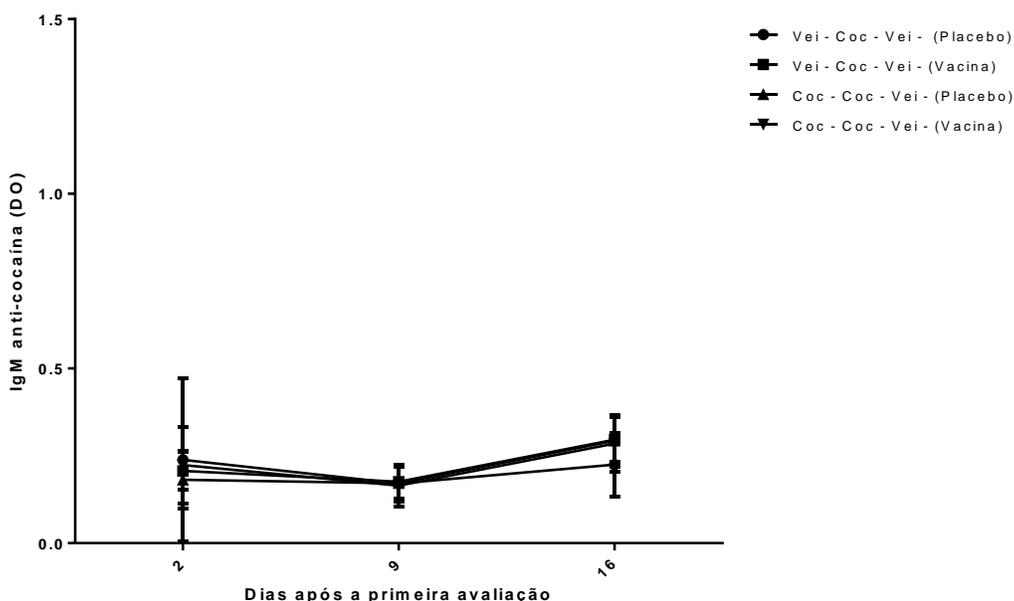


Figura 40 - Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. $n = 9-10$.

Não houve diferenças estatisticamente significativas na evolução da massa corporal absoluta média ao longo do experimento entre filhotes de mães vacinadas e não vacinadas tratados com solução salina 0,9% v/v e/ou cocaína e seus respectivos controles (*Veículo vacinados x não vacinados*: **D(-3)**, 328 ± 76 vs. 301 ± 74 ; $p = 0,44$; **D2**, 333 ± 78 vs. 307 ± 74 ; $p = 0,47$; **D9**, 354 ± 88 vs. 321 ± 77 ; $p = 0,40$; **D16**, 361 ± 89 vs. 326 ± 77 ; $p = 0,40$, e *cocaína vacinadas x não vacinadas*: **D(-3)**, 326 ± 70 vs. 314 ± 76 ; $p = 0,73$; **D2**, 333 ± 71 vs. 323 ± 79 ; $p = 0,78$; **D9**, 344 ± 76 vs. 333 ± 78 ; $p = 0,77$; **D16**, 352 ± 76 vs. 342 ± 79 ; $p = 0,80$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 41**). Tampouco houve diferenças estatisticamente significativas no ganho de massa corporal média entre os filhotes de mães vacinadas e não vacinadas tratados com solução salina 0,9% v/v e/ou cocaína e seus respectivos controles (*Veículo vacinados x não vacinados*: **D2**, 6 ± 2 vs. 6 ± 2 ; $p = 0,66$; **D9**, 20 ± 12 vs. 14 ± 7 ; $p = 0,17$; **D16**, 7 ± 3 vs. 4 ± 2 ; $p = 0,46$, e *cocaína vacinadas x não vacinadas*: **D2**, 7 ± 2 vs. 8 ± 3 ; $p = 0,38$; **D9**, 11 ± 7 vs. 10 ± 4 ; $p = 0,70$; **D16**, 8 ± 4 vs. 9 ± 3 ; $p = 0,54$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 42**).

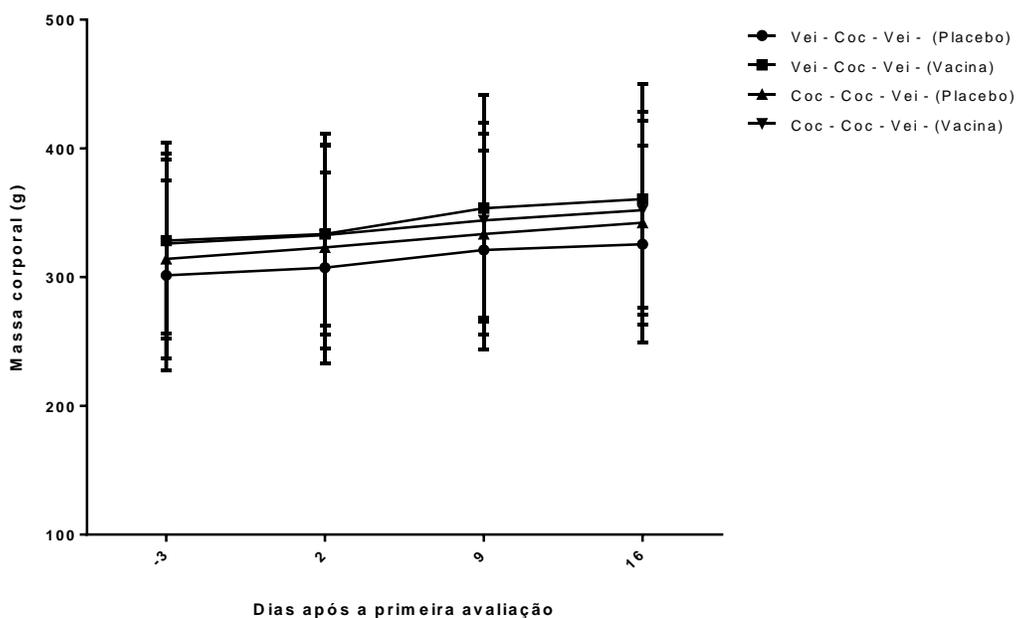


Figura 41 - Evolução da massa corporal absoluta média, expressa em gramas (g), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. n = 9-10.

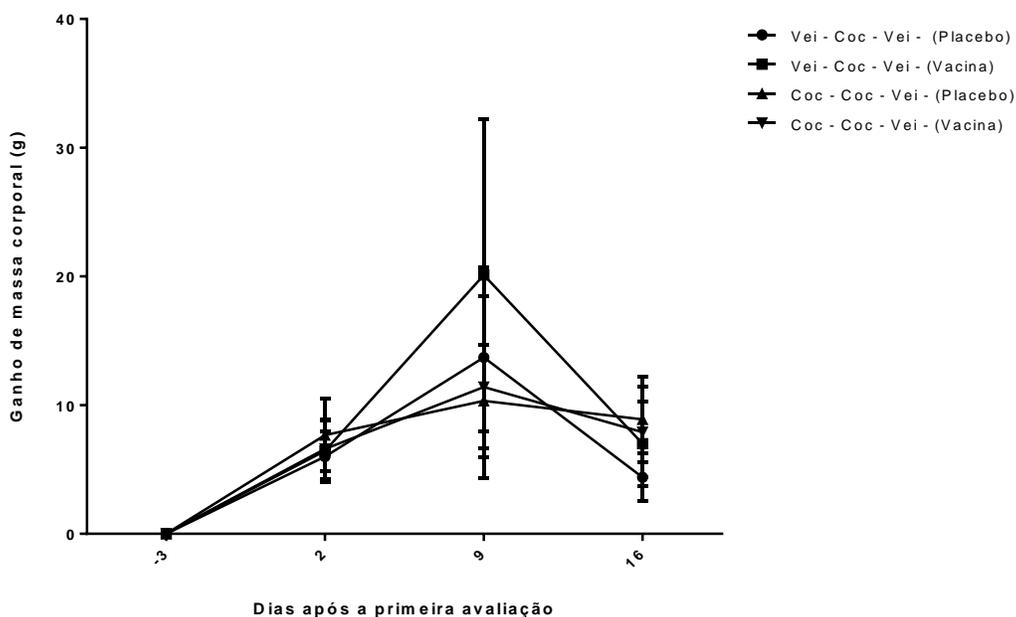


Figura 42 - Evolução do ganho de massa corporal médio, expresso em gramas (g), nos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no curso temporal do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. n = 9-10.

No desafio salina/cocaína, filhotes de mães vacinadas e não vacinadas apresentaram atividade locomotora significativamente maior que seus respectivos controles, tratados com solução salina 0,9% v/v ($52,14 \pm 9,99$ vs. $21,16 \pm 5,24$; $p = 0,02$ e $77,50 \pm 8,69$ vs. $44,66 \pm 4,35$; $p = 0,005$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 43**). No desafio cocaína, quando todos os animais foram tratados com a droga, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade locomotora dos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas em relação aos seus respectivos controles ($90,77 \pm 15,97$ vs. $61,47 \pm 12,57$; $p = 0,17$ e $51,86 \pm 8,64$ vs. $68,47 \pm 11,46$; $p = 0,26$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 44**). No entanto, os valores de distância percorrida observados para todos os grupos nesse momento foram superiores aos medidos no desafio salina/cocaína. No desafio salina, quando todos os animais receberam solução salina 0,9% v/v, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade locomotora dos filhotes de mães vacinadas e não vacinadas em relação aos seus respectivos controles ($23,40 \pm 2,68$ vs. $33,70 \pm 4,77$; $p = 0,08$ e $31,35 \pm 5,53$ vs. $48,56 \pm 7,91$; $p = 0,09$, teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 45**). Os valores de distância percorrida obtidos nesse momento foram inferiores aos medidos no desafio cocaína.

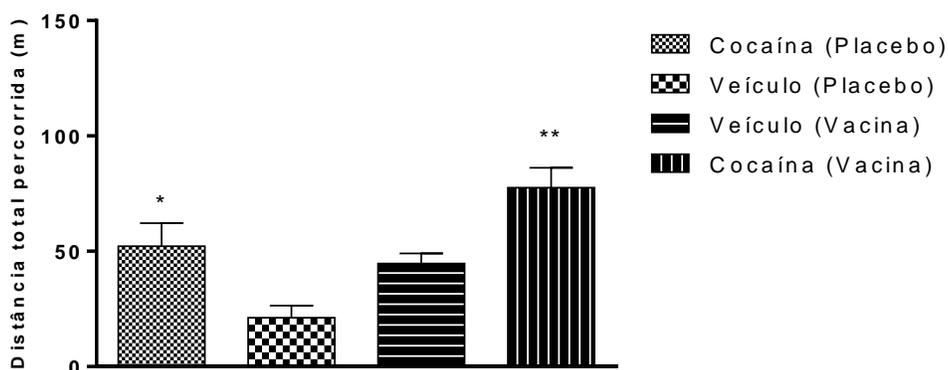


Figura 43 - Distância percorrida, em metros (m), por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no desafio salina/cocaína do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). $n = 9-10$.

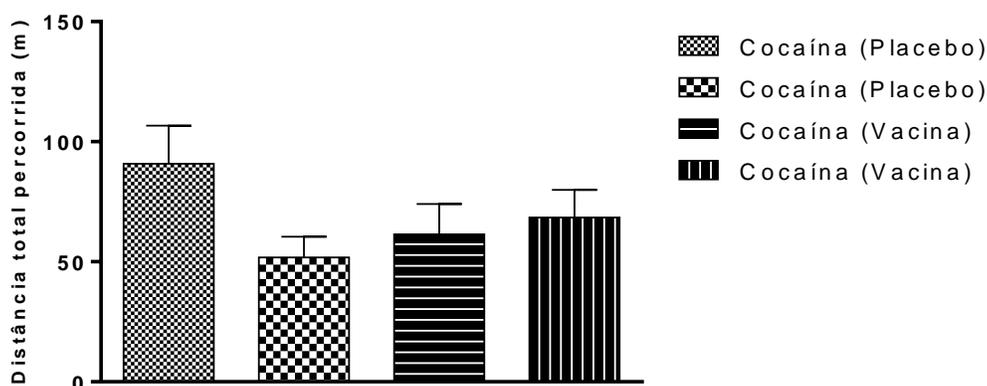


Figura 44 - Distância percorrida, em metros (m), por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no desafio cocaína do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. n = 9-10.

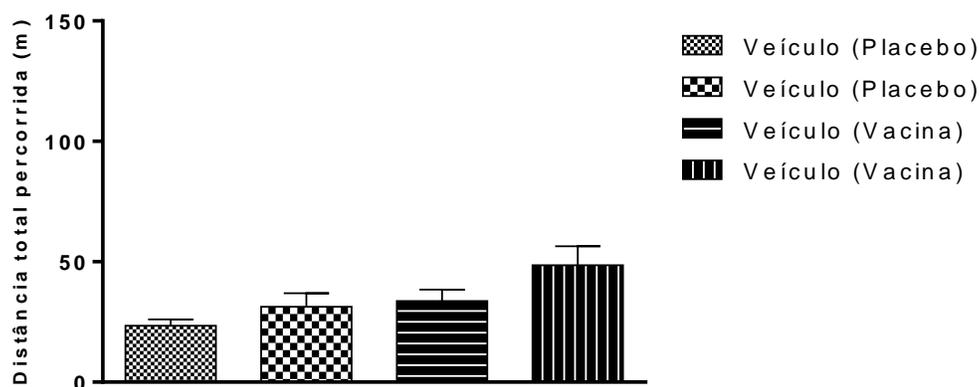


Figura 45 - Distância percorrida, em metros (m), por filhotes de mães vacinadas e não vacinadas no desafio salina do protocolo de avaliação do efeito da sensibilização tardia à cocaína. n = 9-10.

5.2.12 Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína no leite materno

Os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína no leite materno foram significativamente maiores nas mães vacinadas em relação às mães não vacinadas nas diluições 1:50 até 1:500. Os títulos decresceram progressivamente conforme aumento da diluição da amostra (**Diluição 1:50**, $1,526 \pm 0,273$ vs. $0,021 \pm 0,008$; $p < 0,001$; **Diluição 1:100**, $0,771 \pm 0,126$ vs. $0,018 \pm 0,006$; $p < 0,001$; **Diluição 1:250**, $0,327 \pm 0,038$ vs. $0,018 \pm 0,003$; $p < 0,001$; **Diluição 1:500**, $0,184 \pm 0,014$ vs. $0,011 \pm 0,002$; $p = 0,003$; **Diluição**

1:1.000, $0,101 \pm 0,002$ vs. $0,013 \pm 0,003$; $p = 0,12$, **Diluição 1:2.000**, $0,062 \pm 0,003$ vs. $0,013 \pm 0,010$; $p = 0,39$; **Diluição 1:4.000**, $0,033 \pm 0,001$ vs. $0,002 \pm 0,001$; $p = 0,57$; **Diluição 1:8.000**, $0,016 \pm 0,001$ vs. $0,003 \pm 0,003$; $p = 0,81$; **Diluição 1:16.000**, $0,008 \pm 0,001$ vs. $0,005 \pm 0,005$; $p = 0,96$; **Diluição 1:32.000**, $0,009 \pm 0,009$ vs. $0,014 \pm 0,016$; $p = 0,93$; teste t não pareado com correção de Welsh; $r^2 = 0,986$; $y = 27,115x^{-0,087}$) (**Figura 46**). A diluição escolhida para expressar o resultado final dos títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas amostras de leite de mães vacinadas e não vacinadas foi a de 1:100 (**Figura 47**).

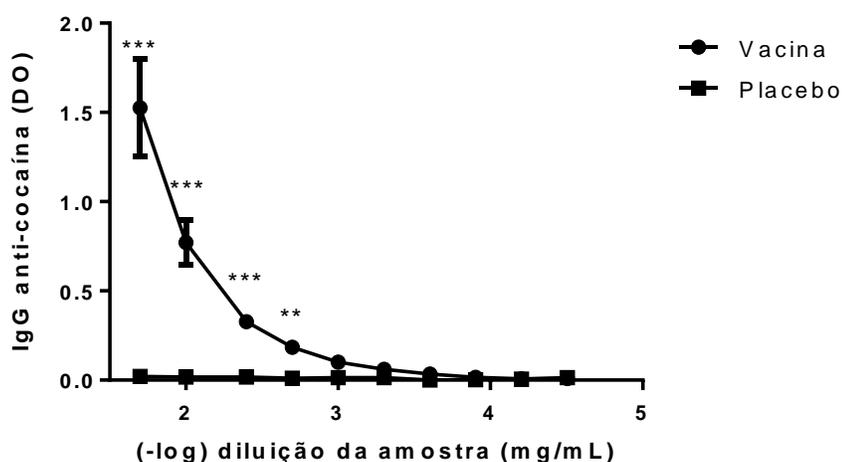


Figura 46 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas quando em diluições crescentes da amostra. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 3$.

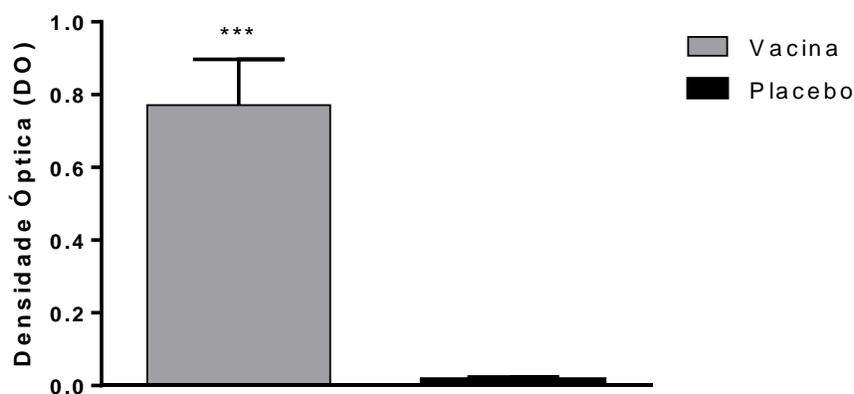


Figura 47 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas na diluição 1:100. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,001$). $n = 3$.

5.2.13 Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína no leite materno

Os títulos de anticorpos IgM anti-cocaína no leite materno foram significativamente maiores nas mães vacinadas em relação às mães não vacinadas nas diluições 1:50 e 1:100. Os níveis de anticorpos decresceram progressivamente conforme aumento da diluição da amostra (**Diluição 1:50**, $0,177 \pm 0,085$ vs. $0,047 \pm 0,025$; $p = 0,008$; **Diluição 1:100**, $0,117 \pm 0,026$ vs. $0,032 \pm 0,023$; $p = 0,006$; **Diluição 1:250**, $0,096 \pm 0,062$ vs. $0,023 \pm 0,014$; $p < 0,16$; **Diluição 1:500**, $0,054 \pm 0,034$ vs. $0,010 \pm 0,009$; $p = 0,14$; **Diluição 1:1.000**, $0,030 \pm 0,012$ vs. $0,007 \pm 0,006$; $p = 0,41$, **Diluição 1:2.000**, $0,019 \pm 0,003$ vs. $0,001 \pm 0,001$; $p = 0,52$; teste t não pareado com correção de Welch; $r^2 = 0,703$; $y = -8 \cdot 10^{-5}x + 0,1425$) (**Figura 48**). A diluição escolhida para expressar o resultado final dos títulos de anticorpos IgM anti-cocaína nas amostras de leite de mães vacinadas e não vacinadas foi a de 1:100 (**Figura 49**).

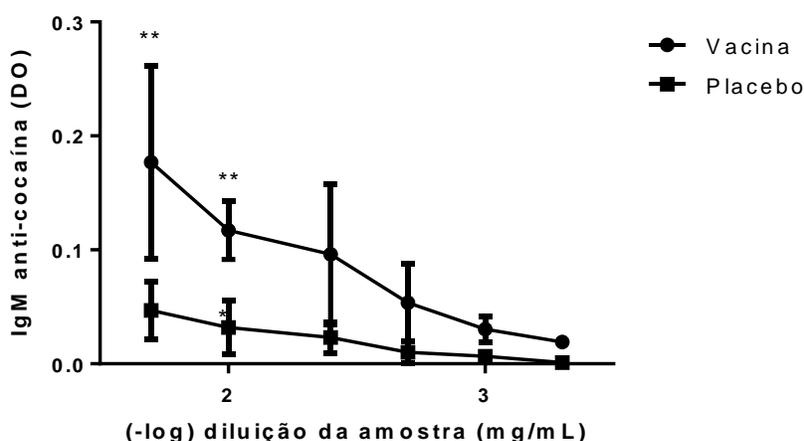


Figura 48 - Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas quando em diluições crescentes da amostra. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$). $n = 3$.



Figura 49 -Títulos de anticorpos IgM anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas na diluição 1:100. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$). $n = 3$.

5.2.14 Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína – ensaio de competição

Na primeira gestação, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães vacinadas decaíram progressivamente conforme aumento da concentração de cocaína. Nas mães vacinadas, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína foram significativamente maiores que nas mães não vacinadas em todas as diluições testadas (**Diluição 0**, $5,533 \pm 0,240$ vs. $0,266 \pm 0,140$; $p < 0,001$; **Diluição -10**, $5,676 \pm 0,216$ vs. $0,133 \pm 0,060$; $p < 0,001$; **Diluição -8**, $5,566 \pm 0,400$ vs. $0,085 \pm 0,029$; $p < 0,001$; **Diluição -6**, $5,286 \pm 0,394$ vs. $0,062 \pm 0,011$; $p < 0,001$; **Diluição -4**, $4,588 \pm 0,943$ vs. $0,033 \pm 0,007$; $p < 0,001$; **Diluição -2**, $1,081 \pm 0,365$ vs. $0,028 \pm 0,009$; $p = 0,007$; teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 50**).

Nos filhotes de mães vacinadas, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína foram significativamente maiores em relação aos filhotes de mães não vacinadas até a diluição (-6) de cocaína e progressivamente decrescentes conforme aumento da concentração da droga (**Diluição 0**, $1,822 \pm 0,486$ vs. $0,084 \pm 0,029$; $p = 0,002$; **Diluição -10**, $1,282 \pm 0,441$ vs. $0,136 \pm 0,153$; $p = 0,008$; **Diluição -8**, $1,157 \pm 0,381$ vs. $0,104 \pm 0,104$; $p = 0,006$; **Diluição -6**, $0,977 \pm 0,376$ vs. $0,077 \pm 0,068$; $p = 0,009$; **Diluição -4**, $0,276 \pm 0,125$ vs. $0,044 \pm 0,013$; $p = 0,11$; **Diluição -2**, $0,053 \pm 0,017$ vs. $0,034 \pm 0,007$; $p = 0,26$; teste t não pareado com correção de Welsh) (**Figura 50**).

Na segunda gestação, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães vacinadas também reduziram de forma progressiva conforme aumento da concentração da droga. Nas mães vacinadas, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína foram significativamente maiores que nas mães não vacinadas nas diluições de (0) até (-6) (**Diluição 0**, 4,632 vs. 0,156; **Diluição -12**, 2,872 vs. 0,054; **Diluição -10**, 2,151 vs. 0,053; **Diluição -8**, 0,950 vs. 0,049; **Diluição -6**, 0,280 vs. 0,054; **Diluição -4**, 0,033 vs. 0,053; **Diluição -2**, 0,089 vs. 0,020) (**Figura 51**).

Nos filhotes de mães vacinadas, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína foram maiores em relação aos filhotes de mães não vacinadas até a diluição (-8) de cocaína e progressivamente decrescentes conforme aumento da concentração da droga (**Diluição 0**, 2,080 vs. 0,073; **Diluição -12**, 1,036 vs. 0,029; **Diluição -10**, 0,857 vs. 0,006; **Diluição -8**, 0,350 vs. 0,018; **Diluição -6**, 0,149 vs. 0,014; **Diluição -4**, 0,110 vs. 0,013; **Diluição -2**, 0,043 vs. 0,053) (**Figura 51**).

Os valores de log IC₅₀ para os anticorpos IgG anti-cocaína no soro das mães na primeira e segunda gestação e filhotes de mães vacinadas da primeira e segunda gestação foram, respectivamente: -3,403 mg, -8,32 mg, -5,43 e -8,45 mg de cocaína.

Os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína no leite de mães vacinadas reduziram de forma progressiva conforme aumento da concentração da droga. Nas mães vacinadas, os títulos de anticorpos IgG anti-cocaína no leite foram maiores que nas mães não vacinadas nas diluições de (0) até (-8) (**Figura 52**) (**Diluição 0**, 1,086 vs. 0,000; **Diluição -12**, 0,431 vs. 0,000; **Diluição -10**, 0,270 vs. 0,000; **Diluição -8**, 0,078 vs. 0,002; **Diluição -6**, 0,000 vs. 0,001; **Diluição -4**, 0,000 vs. 0,000; **Diluição -2**, 0,000 vs. 0,000). O log IC₅₀ dos anticorpos IgG anti-cocaína no leite materno foi de -9,78 mg de cocaína.

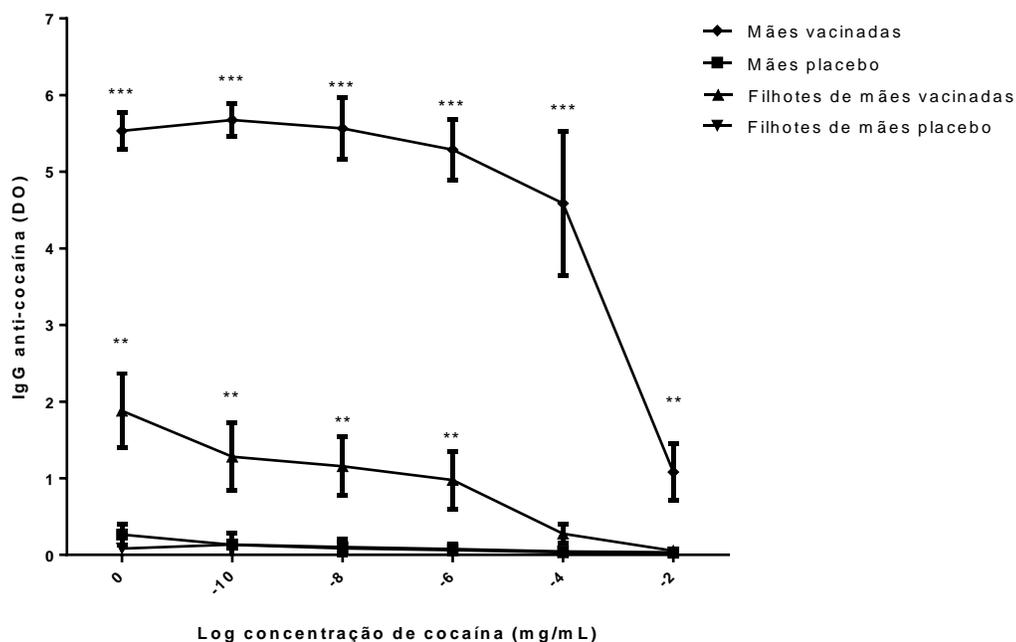


Figura 50 - Títulos médios de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), em mães vacinadas e não vacinadas e filhotes de mães vacinadas e não vacinadas, da primeira gestação, quando em adsorção com concentrações crescentes de cocaína. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo placebo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 3$.

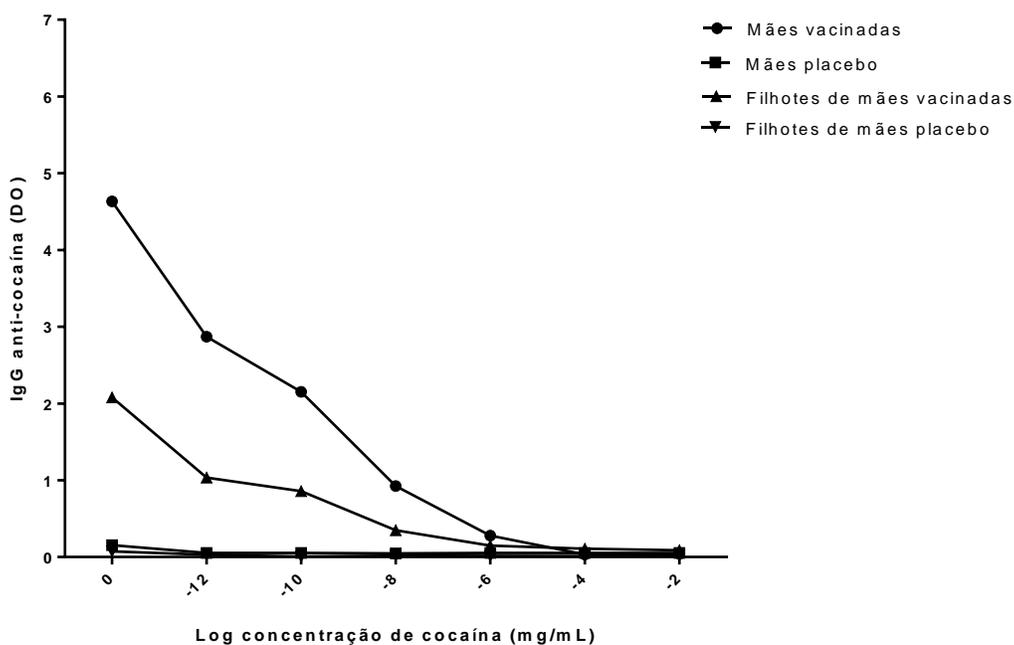


Figura 51 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), em mães vacinadas e não vacinadas e filhotes de mães vacinadas e não vacinadas, da segunda gestação, quando em adsorção com concentrações crescentes de cocaína. $n = 1$.

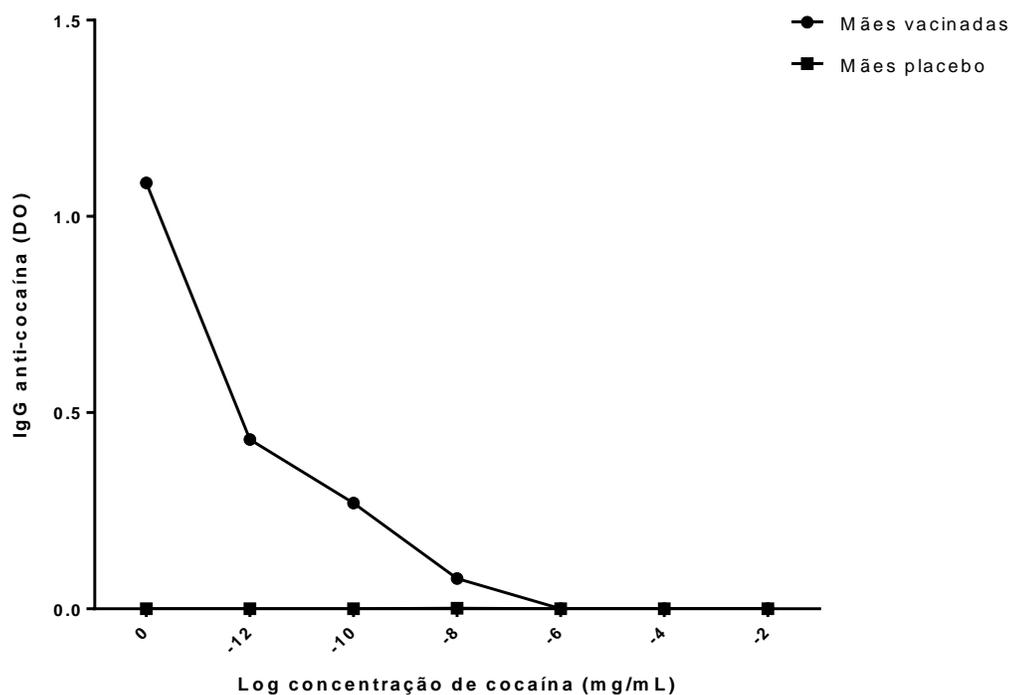


Figura 52 - Títulos de anticorpos IgG anti-cocaína, expressos em densidade óptica (DO), no leite de mães vacinadas e não vacinadas quando em adsorção com concentrações crescentes de cocaína. n = 1.

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação dos resultados experimentais

Os resultados encontrados em nosso estudo sugerem que a imunoterapia para dependência à cocaína e crack pode fornecer proteção materno-fetal contra desfechos negativos associados à exposição intrauterina à droga e no período pós-natal imediato. As hipóteses aventadas no estudo foram confirmadas. Dessa forma, demonstramos que:

1. ratas vacinadas com GNE-KLH produzem e mantem títulos de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína durante a gravidez mesmo quando tratadas com cocaína durante a gestação;

2. na presença da exposição gestacional à cocaína, houve uma redução dos desfechos obstétricos negativos nas ratas vacinadas com GNE-KLH, quando comparadas às ratas não vacinadas;

3. encontramos presença de anticorpos anti-cocaína no leite materno;

4. encontramos presença de anticorpos anti-cocaína nos filhotes;

5. os anticorpos IgG anti-cocaína encontrados nos soros das mães e filhotes e no leite materno apresentam afinidade química pela droga.

6.1.2 Produção de anticorpos IgG e IgM nas mães vacinadas

A presença de anticorpos anti-cocaína durante a gravidez, principalmente os do tipo IgG, serve de embasamento para todos os demais resultados encontrados. De fato, a vacinação durante a gravidez é um método para melhorar a saúde das mulheres grávidas e de seus filhos (KELLER-STANISLAWSKI *et al.*, 2014). Vacinas seguras e eficazes já foram desenvolvidas contra algumas doenças para uso durante a gravidez, tais como: tétano, coqueluche e influenza (ABU-RAYA *et al.*, 2020). A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a vacinação no período gestacional como estratégia eficaz e segura para reduzir a morbidade e mortalidade materna, neonatal e da primeira infância (OMS, 2014).

Os níveis de IgG apresentam redução nas mães no início do período gestacional, provavelmente devido à hemodiluição natural que ocorre nesse período (PACHECO *et al.*, 2013). A hemodiluição é uma alteração fisiológica na qual ocorre aumento do volume sanguíneo, podendo alterar dosagens bioquímicas realizadas nesse período (FAUPEL-BADGER *et al.*, 2007, TEASDALE & MORTON, 2018). Assim, é provável que nesse tempo o nível real de anticorpos IgG anti-cocaína seja semelhante aos tempos imediatamente anterior e posterior (FAUPEL-BADGER *et al.*, 2007).

A cinética de produção das Ig segue os padrões descritos na literatura. As três imunizações no período pré-gestacional e a imunização na gestação induziram produção crescente de anticorpos IgG anti-cocaína nas mães até o final da gestação, quando começam a decair, possivelmente devido ao retorno do sistema imunológico à homeostase (SOMPAYRAC, 2016). A produção de IgM decaiu no tempo 21, quando ocorre, de fato, a soroconversão do isotipo IgM em IgG, e aumenta novamente no início da gestação, quando ocorre a imunorregulação natural do período, decorrente da ativação de linfócitos T regulatórios e ação de fatores como a IL-10 e o TGF- β (ALUVIHARE *et al.*, 2004; RACITOT *et al.*, 2014; SOMPAYRAC, 2016; JØRGENSEN *et al.*, 2019). Essa regulação imunológica reduz, por consequência, a atividade de linfócitos B para a produção de anticorpos mais específicos (SOMPAYRAC, 2016). Além disso, a produção de IgG foi de, em média, o dobro de IgM, em todos os experimentos, demonstrando a eficácia da formulação utilizada no estudo na produção de anticorpos anti-cocaína mais específicos.

Na segunda parte do experimento, as fêmeas da primeira gestação foram mantidas sob observação comportamental e monitoramento dos níveis de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína por 12 semanas após o desmame da primeira ninhada. A dosagem de anticorpos por ELISA demonstrou que os títulos de IgG e IgM anti-cocaína se mantiveram constantes no período intergestacional, justificando, assim, o estudo do comportamento imunológico em uma gestação seguinte, uma vez que não foram feitas novas imunizações.

Na segunda gestação, os níveis de anticorpos se mantiveram altos, exceto no início do período gestacional, no qual, semelhante ao que ocorreu na primeira gestação, sofreram uma queda em razão da hemodiluição característica do período (FAUPEL-

BADGER *et al.*, 2007). Esse resultado demonstra, mais uma vez, que a administração de cocaína e a imunorregulação do período gestacional não interferem significativamente na produção desses anticorpos e corrobora a hipótese de que os anticorpos são mantidos por mais de uma gestação.

A manutenção dos níveis de IgM e IgG nas mães durante todo o período experimental avaliado (250 dias), ocorrendo apenas pequenas variações fisiológicas previamente explicadas, sugere mecanismos interessantes para a resposta imunológica induzida pela vacinação com GNE-KLH. O bom êxito para o desenvolvimento de uma vacina para antígenos proteicos e não proteicos é a estimulação de plasmócitos de vida longa, que produzem anticorpos de alta afinidade, e linfócitos B de memória. Para isso, é necessário ocorrer um processo de ativações imunológicas primárias e secundárias, especialmente a ativação da resposta celular T-dependente (PULENDRAN & AHMED, 2011).

O primeiro contato das células do sistema imunológico a um antígeno ativa linfócitos B 'naive' que secretam, em sua maioria, anticorpos IgM, constituindo a fase primária. Diante disso, torna-se relevante a análise dessa classe de imunoglobulina nos testes de eficácia de um composto imunogênico, uma vez que a produção de IgM é parte do processo da cascata de ativação da resposta imunológica humoral T-dependente (PULENDRAN & AHMED, 2006; SOMPAYRAC, 2016).

A resposta secundária ocorre na segunda exposição ao antígeno, na qual ocorre a mudança de classe da cadeia pesada para IgG, IgA ou IgE, anticorpos com maior especificidade para o antígeno (SOMPAYRAC, 2016). Nesse experimento, as respostas secundárias ocorreram a partir da segunda imunização. Importantes mudanças qualitativas acontecem nos anticorpos, como o aumento progressivo da afinidade, mesmo após pequenas doses do mesmo antígeno (PULENDRAN & AHMED, 2011). Isso pode explicar, em partes, a maior especificidade do anticorpo encontrada na segunda gestação. Outro evento significativo nessa fase é maturação dos linfócitos por afinidade, que é marcada pela seleção clonal e mutações somáticas, que aprimoram os anticorpos, tornando a afinidade pelo antígeno mais elevada. A maturação se relaciona diretamente com a formação de linfócitos B de memória, que podem persistir durante meses ou até

anos secretando anticorpos específicos para os antígenos (PULENDRAN & AHMED, 2006; SALLUSTO *et al.*, 2010; PULENDRAN & AHMED, 2011; ZEPP, 2016).

A análise simultânea das imunoglobulinas, especialmente IgM e IgG complementam o entendimento da resposta humoral vacinal. O objetivo da imunização é produzir as duas respostas em momentos distintos (PULENDRAN & AHMED, 2006). Avaliar o declínio do IgM é necessário, pois, se este persistir, pode sugerir que uma resposta celular T-independente foi estimulada, que é caracterizada pela produção quase exclusiva de imunoglobulinas M e ausência da resposta secundária. Nesse caso, a resposta torna-se inespecífica e de baixa memória celular, o que não é interessante para uma vacina (DUMONT *et al.*, 2004; PULENDRAN & AHMED, 2006).

Em relação aos desfechos negativos obstétricos associados ao uso de cocaína na gestação, embora tenha sido observado diferença estatisticamente significativa apenas no número de filhotes nascidos vivos, as ratas vacinadas apresentaram tendência a maior ganho de massa corporal durante as gestações. Também foi observada uma tendência para menor mortalidade dos filhotes de mães vacinadas no período do desmame. Tais achados sugerem que os anticorpos anti-cocaína podem exercer um antagonismo farmacocinético com repercussões clínicas na gravidez. Os anticorpos anti-cocaína encontrados podem se ligar à cocaína livre e reduzir os efeitos sistêmicos da droga nas mães, podendo, assim, prevenir efeitos cardiovasculares nas grávidas, uma importante causa de mortalidade em tais pacientes (KUCZKOWSKI, 2007; CHASIN *et al.*, 2014). Além disso, a redução da cocaína livre pode, sistemicamente, evitar os efeitos vasoconstritores da droga, melhorando a viabilidade da placenta e a nutrição da prole (KUCZKOWSKI, 2007).

Aditivamente, a proteção fetal da exposição à cocaína durante a gravidez pode ter importância clínica também na prevenção primária em psiquiatria, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças psicossomáticas na vida adulta, tais como: esquizofrenia, depressão e transtornos de ansiedade, doenças associadas à exposição pré-natal à droga (KELLER & SNYDER-KELLER, 2000; LAMY *et al.*, 2015), além de reduzir alterações comportamentais na criança (RODNING *et al.*, 1989; GITTLER & McPHERSON, 1990; BADA *et al.*, 2007).

6.1.2 Presença de anticorpos IgG anti-cocaína nos filhotes

Encontramos a presença de anticorpos IgG anti-cocaína também nos filhotes, indicando que os anticorpos produzidos pelas mães, por meio de imunização ativa, são transferidos ao feto. A ausência de anticorpos IgM anti-cocaína detectáveis nos filhotes após o desmame é compatível com os títulos baixos dessa Ig encontrados nas mães no mesmo período, uma vez que, no geral, a transferência materno-fetal de anticorpos ocorre de maneira proporcional (NIEWIESK, 2014). Observa-se que a densidade óptica de anticorpos IgG anti-cocaína decai significativamente 7 dias após o desmame, não sendo mais detectável nos dias 14 e 21 nos filhotes. Esse resultado corrobora a hipótese de que os anticorpos presentes nos filhotes são originados das mães e não de produção ativa dos mesmos. De fato, os anticorpos transferidos à prole conferem proteção em um período de 6 a 12 meses após o desmame em humanos (WATANAVEERADEJ *et al.*, 2003; LEURIDAN *et al.*, 2011), o que seria o tempo equivalente em ratos encontrados em nossos experimentos (ANDREOLLO *et al.*, 2012; DUTTA & SENGUPTA, 2016). A cinética de decaimento dos níveis de anticorpos em neonatos está relacionada aos níveis de anticorpos encontrados na prole, ou seja, quanto maior forem os títulos de anticorpos, por mais tempo eles protegerão os filhotes (NIEWIESK, 2014).

Sabe-se que a maior parte dos anticorpos IgG encontrados no feto e recém-nascidos são transferidos via placenta (KISKOVA *et al.*, 2019; ABU-RAYA *et al.*, 2020). Embora aspectos relacionados ao envolvimento da placenta e seus componentes na resposta imunológica ao GNE-KLH não tenham sido investigados nesse estudo, é provável que haja transferência materno-fetal de anticorpos IgG antes do nascimento, principalmente devido aos altos níveis de anticorpos encontrados nos filhotes (NIEWIESK, 2014). Contudo, mais pesquisas são necessárias para avaliar se, de fato, os anticorpos IgG anti-cocaína encontrados na prole são oriundos também de transferência placentária.

6.1.3 Presença de anticorpos anti-cocaína no leite materno

Encontramos presença de anticorpos anti-cocaína no leite materno, um dado de grande relevância nesse estudo. Tal resultado torna a projeção de aplicação clínica bastante consistente, uma vez que evidencia um dos mecanismos para a transferência desses anticorpos para os filhotes. O resultado demonstra que a imunização com GNE-KLH confere proteção ao feto à exposição à droga ainda no período de amamentação, uma vez que a cocaína pode chegar ao recém-nascido também por meio do leite materno (DICKSON *et al.*, 1994; BAILEY, 1998). Embora a quantidade de droga transferida ao recém-nascido via leite materno possa ser significativamente menor que aquela transferida via placenta, a capacidade ainda reduzida do recém-nascido de metabolizar a droga faz com que pequenas doses de cocaína possam ter efeitos consideráveis (CRESSMAN *et al.*, 2012). Além disso, a quantidade de cocaína que é transferida via leite materno depende de algumas variáveis de consumo da mãe, tais como: dose, frequência, formas de uso, contaminantes da droga e tempo de abstinência antes da amamentação (SARKAR *et al.*, 2005; CRESSMAN *et al.*, 2012).

O resultado obtido nesse ensaio corrobora os achados positivos obtidos no modelo comportamental, discutidos posteriormente, e explica o rápido decaimento dos níveis de IgG anti-cocaína após o término da amamentação em ambas as gestações. Em diversas espécies de mamíferos, incluindo os roedores, os anticorpos IgG são absorvidos do leite no intestino da prole pelo receptor FcRn presente nos enterócitos (Van de PERRE, 2003). Nesses animais, os anticorpos IgG são a classe mais abundante no leite materno (IJAZ *et al.*, 1987) e seus níveis decaem rapidamente quando a amamentação cessa (Van de PERRE, 2003).

Anticorpos dos isotipos IgG, IgM e IgA, obtidos através de vacinação das mães, são secretados no colostro e leite materno (SASO & KAMPMANN, 2020). Em humanos, IgA é a subclasse predominante no colostro e leite maduro, seguido pelo IgG (TELEMO & HANSON, 1996). Após a ingestão, esses anticorpos promovem proteção à mucosa inibindo a adesão de micro-organismos patogênicos ao epitélio e, conseqüentemente, a invasão e instalação dos mesmos nos tecidos (FAUCETTE *et al.*, 2014). Os mecanismos

pelos quais esses anticorpos promovem imunidade incluem a exclusão e a neutralização (SASO & KAMPMANN, 2020).

Apesar de estarem presentes em pequenas quantidades no leite materno em humanos, em relação ao IgA, e de serem absorvidos em pouca proporção na mucosa intestinal (BLUM *et al.*, 1981; EIBL *et al.*, 1988), os anticorpos IgG exercem funções importantes na imunidade do recém-nascido. De fato, anticorpos IgG e IgM também são secretados por plasmócitos no lúmen intestinal dos recém nascidos (YOSHIDA *et al.*, 2004), sugerindo a importância de tais anticorpos na imunidade de mucosas.

Os anticorpos IgG provenientes do leite materno podem ter maior atividade que o IgA em diversas funções importantes da resposta do sistema imunológico de mucosas, tais como: ativação do complemento, citotoxicidade dependente de anticorpo e opsonização (EDDIE *et al.*, 1971). Além disso, os anticorpos IgG podem apresentar importante função antiviral (MEHTA *et al.*, 1989). Estudo realizado por ROBERT-GUROFF (2000), demonstrou que a transferência passiva de anticorpos IgG promoveu proteção mucosa à infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV, na sigla em inglês) em macacos *Rhesus* neonatos. Polissacarídeos ligados à estrutura dos anticorpos IgG reconhecem e se ligam a receptores de lectina em bactérias nas células epiteliais do esôfago e do intestino do recém-nascido, promovendo resposta imunológica eficiente contra esses patógenos (SEDYKH *et al.*, 2012; LIS-KUBERKA *et al.*, 2019).

Assim como ocorre na placenta, o FcRn pode se ligar ao IgG oriundo do leite materno, tendo também um papel importante na imunidade mediada por essa Ig. O FcRn pode transportar anticorpos IgG, isolado ou ligado a um antígeno, através da barreira epitelial intestinal para a lâmina própria ou do soro sanguíneo para o lúmen intestinal dos neonatos (YOSHIDA *et al.*, 2004). Em ambos os mecanismos, os anticorpos IgG podem impedir a instalação de micro-organismos patogênicos. O FcRn intestinal pode mediar também a ressecção de IgG materna previamente adquirida na vida intrauterina para combater patógenos (HARRIS *et al.*, 2006).

No colostro e leite maduro humanos também são encontradas subclasses diferentes de IgG. A subclasse encontrada em maior proporção é a IgG1, seguida pela IgG2 e, em proporções bem menores, IgG4 e IgG3 (MEHTA *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 1992). Essa diferença proporcional sugere transporte diferencial dos subtipos de IgG do

soro para as células epiteliais da mama, semelhante ao que ocorre na transferência placentária (MEHTA *et al.*, 1989). Em geral, os níveis gerais de IgG reduzem significativamente após uma semana de amamentação, permanecendo então constantes até o fim desse período (MEHTA *et al.*, 1989).

O processo de amamentação por si só confere ao recém-nascido a regulação necessária do sistema imunológico, ainda pouco desenvolvido. São transferidos ao filhote nesse processo uma série de substâncias bioativas além dos anticorpos, tais como: enzimas, hormônios, citocinas, células, proteínas, compostos proteicos e microRNA's, que modulam o sistema imunológico e o funcionamento intestinal (IZUMI *et al.*, 2014; ROGIER *et al.*, 2014; HSIEH *et al.*, 2015).

Embora anticorpos IgM não sejam transferidos ao feto via placenta, como os anticorpos IgG, eles podem fazê-lo via leite materno (DEMERS-MATHIEU *et al.*, 2018). Contudo, a baixa concentração relativa de anticorpos IgM anti-cocaína encontrada no soro do leite materno era esperada, uma vez que esses anticorpos não foram encontrados em quantidades suficientes para serem detectadas pelo método ELISA nos filhotes de mães vacinadas em nenhuma das gestações.

No entanto, embora seja eficiente em modelos animais, a medida dos níveis sorológicos de Ig's em recém-nascidos humanos não é um parâmetro bioquímico de alta acurácia, uma vez que parte delas são degradadas por proteases do trato gastrointestinal da criança e de bactérias simbiotes do intestino (DEMERS-MATHIEU *et al.*, 2018), além de serem pouco absorvidas (Van de PERRE, 2003). Para o estudo em questão, a medida dos níveis de IgG no leite materno e da concentração de droga livre no recém-nascido seriam análises mais adequadas para avaliar a eficiência da vacinação na gestação.

6.1.4 Atenuação do efeito agudo da cocaína nos filhotes

Encontramos redução do efeito comportamental induzido pela cocaína nos filhotes, sugerindo proteção do SNC dos mesmos durante a amamentação. Os resultados encontrados no modelo comportamental confirmam a hipótese que os anticorpos IgG anti-cocaína transferidos aos filhotes protegem o feto dos efeitos da droga. O modelo de campo aberto (*open field*) é um teste padronizado e extensamente empregado para avaliação de efeitos de drogas e fármacos com atividades

psicoestimulantes (SEIBENHENER & WOOTER, 2015). Nesse modelo, os ratos ou camundongos são observados durante um período definido de acordo com a farmacocinética e dose da droga e o desenho do estudo. Sabe-se que tais drogas, como a cocaína e metanfetamina, aumentam a atividade locomotora dos animais e a desinibição, representados, respectivamente, pela distância total percorrida no aparato e o número de entradas do animal na região central previamente delimitada (ERHARDT *et al.*, 2006; VALJENT *et al.*, 2010; ARACIL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; POGORELOV *et al.*, 2019).

No presente estudo foi demonstrado que os filhotes de mães vacinadas tiveram atenuação do comportamento hiperlocomotor e desinibitório após exposição à dose única de cocaína, corroborando a eficácia da vacinação. A atenuação do comportamento característico da administração da droga tem correlação com os níveis de anticorpos IgG anti-cocaína encontrados nos filhotes, ou seja, tais anticorpos neutralizam a droga quando esta entra na corrente sanguínea e reduzem sua passagem pela BHE, reduzindo, conseqüentemente, seus efeitos característicos. Além disso, o resultado do modelo comportamental sinaliza para uma especificidade desses anticorpos, discutida posteriormente.

O modelo de campo aberto também foi utilizado para avaliar a sensibilização tardia à cocaína nos filhotes. O objetivo desse teste foi avaliar se os anticorpos transferidos aos filhotes alteram a sensibilização à droga na idade adulta. A sensibilização comportamental, também denominada tolerância inversa, resulta de adaptações neuroquímicas na via mesocorticolímbica que levam ao aumento do efeito da droga quando administrado em doses repetidas e é relatada em animais expostos à cocaína durante a gestação (CROZATIER *et al.*, 2003; WIMMER *et al.*, 2019). Os mecanismos que induzem tais alterações ainda são incertos, mas estudos sugerem que fatores como ativação de receptores dopaminérgicos, alterações dos receptores de glutamato e mudanças intracelulares, tais como: alterações enzimáticas, fatores de transcrição e outras proteínas (PIERCE *et al.*, 1996; NESTLER, 2004) podem estar envolvidos nesse processo. Esse efeito também pode ser observado quando se administra placebo após repetidas aplicações da droga (De JONG *et al.*, 2009; ROWSON *et al.*, 2018).

Dessa forma, animais tratados com placebo após receberem injeções da droga podem apresentar seus efeitos característicos. Nesse caso, esperava-se que os filhotes adultos de mãe não vacinadas apresentassem a hiperlocomoção e desinibição característicos da exposição à cocaína, sendo os filhotes de mães vacinadas o grupo teste.

Os resultados obtidos nesse protocolo não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos avaliados. Isso sugere que a prole que recebeu anticorpos IgG anti-cocaína das mães se comporta, quando expostos à cocaína nesse modelo comportamental na fase adulta, de forma semelhante aos filhotes que não receberam anticorpos, ou seja, os anticorpos não alteram significativamente a sensibilização à droga.

Esse resultado pode estar associado a ausência de níveis de anticorpos IgG anti-cocaína detectáveis nessa fase. Também se observa que a administração da droga não induziu a produção significativa de anticorpos IgG ou IgM anti-cocaína nos filhotes de mães vacinadas, sugerindo baixa memória imunológica. De fato, a imunização passiva não é capaz de induzir a diferenciação e proliferação de linfócitos T e B de memória (SLIFKA & AMANNA, 2018). Tais resultados auxiliam na confirmação das hipóteses de que os anticorpos são originados das mães e não há produção ativa nos filhotes. As implicações da imunização pré-natal na prevenção de alterações neuroanatômicas e fisiológicas induzida pela cocaína nos fetos, bem como aspectos da imunidade adaptativa, tais como: memória e mecanismos efetores induzidos, devem ser investigados em protocolos mais específicos de neuroimagem, dosagens de neurotransmissores e seus metabólitos e imunofenotipagem.

Embora o comportamento materno não tenha sido avaliado, é provável que os anticorpos IgG produzidos pelas mães também atenuem o comportamento característico da exposição à cocaína no modelo experimental utilizado. Sabe-se também que o uso de cocaína durante a gestação está associado a alterações comportamentais no cuidado materno com a prole tanto em modelos murinos (McMURRAY *et al.*, 2008) quanto em estudos observacionais em humanos (NEPHEW & PHEBO, 2012; TOMLINSON *et al.*, 2016). Um possível efeito protetor da imunização quanto a essas alterações poderia ser avaliado em ratas através da observação da

interação materno-fetal, tais como: frequência de amamentação, lambidas nos filhotes e proximidade da mãe aos filhotes (NELSON *et al.*, 1998; LUBIN *et al.*, 2003).

6.1.5 Especificidade dos anticorpos IgG à cocaína

O ELISA de competição é um método quantitativo que avalia a inibição competitiva da ligação entre anticorpos e antígenos ou haptenos (YORDE *et al.*, 1976). Trata-se, portanto, de um ensaio para avaliar a especificidade do anticorpo produzido pelo antígeno. A amostra contendo o anticorpo (IgG anti-cocaína) é incubada com concentrações conhecidas do antígeno (cocaína). Quanto maior a ligação antígeno-anticorpo, menor será a ligação do anticorpo com o antígeno fixado na placa, resultado numa proporção inversa entre densidade óptica e especificidade na revelação (AYDIN, 2015).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que, tanto os anticorpos produzidos pelas mães e encontrados no soro e leite materno, quanto aqueles encontrados nos filhotes se ligam à cocaína, apresentando considerável capacidade de bloqueio da droga, podendo ser considerados específicos. Esse resultado auxilia a compreensão dos dados positivos obtidos no modelo comportamental e nos desfechos obstétricos negativos associados ao uso da droga no período gestacional. A ligação do anticorpo à droga impede ou reduz a chegada desta do SNC, reduzindo os efeitos característicos observados para o grupo de filhotes não vacinados no teste comportamental, além de reduzir os efeitos sistêmicos da droga nas mães.

Para uma avaliação mais precisa da capacidade de bloqueio do anticorpo, utilizamos o valor de logaritmo da concentração inibitória média ($\log IC_{50}$), que corresponde à metade da concentração máxima de cocaína que o anticorpo é capaz de bloquear (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2014). Os resultados demonstraram que os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas mães, em ambas as gestações, são capazes de bloquear uma concentração maior de droga que aqueles encontrados nos filhotes. Na segunda gestação, a capacidade de bloqueio dos anticorpos IgG anti-cocaína foi menor tanto nas mães quanto nos filhotes, em relação à primeira gestação. Os anticorpos IgG anti-cocaína encontrados no leite materno possuem capacidade de

bloqueio menor que aqueles encontrados no soro das mães e dos filhotes em ambas as gestações. De fato, os anticorpos produzidos na vacinação são do tipo policlonais, ou seja, produzidos por diferentes linfócitos. Dessa forma, pode haver variações em parâmetros como especificidade, avidéz e afinidade dos anticorpos (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2012). No entanto, tais variações não devem, em uma vacina ideal, alterar a eficácia da imunização (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2012). Esse problema a princípio poderia ser contornado com a administração de anticorpos monoclonais, numa estratégia de imunização passiva (NORMAN *et al.*, 2009).

Esses dados são promissores no que tange à segurança da imunização, indicando que o GNE-KLH é capaz de induzir a produção de anticorpos específicos para cocaína, uma das limitações encontradas no desenvolvimento de vacinas antidrogas (KINSEY *et al.*, 2014). Anticorpos inespecíficos poderiam induzir o surgimento de efeitos adversos relacionados à ativação de outros mecanismos imunológicos, além de, obviamente, reduzir a eficácia da vacinação.

A especificidade dos anticorpos IgG produzidos em relação aos metabólitos ativos da cocaína, norcocaína e cocaetileno, também deve ser avaliada através do estudo de competição, semelhante ao que fora executado para a cocaína. A norcocaína (**FIGURA 53-A**) é o metabólito formado através da desmetilação do átomo de nitrogênio da cocaína nos hepatócitos. Sendo uma molécula mais hidrofílica que a cocaína, esse metabólito atravessa menos extensamente a BHE e placenta, apresentando, portanto, menor atividade que a droga (WANG *et al.*, 2001; GOLDSTEIN *et al.*, 2009). O cocaetileno (**FIGURA 53-B**) é o metabólito formado quando a droga é consumida concomitantemente ao etanol, através do processo de transesterificação (MAURER *et al.*, 2006; SCHNEIDER & DeCAPRIO, 2013). Trata-se de uma molécula muito mais lipofílica que a cocaína, atravessando mais facilmente a BHE e placenta e, portanto, conferindo efeitos farmacodinâmicos e deletérios mais acentuados que a cocaína tanto nas mães quanto no feto e recém-nascido (GOLDSTEIN *et al.*, 2009).

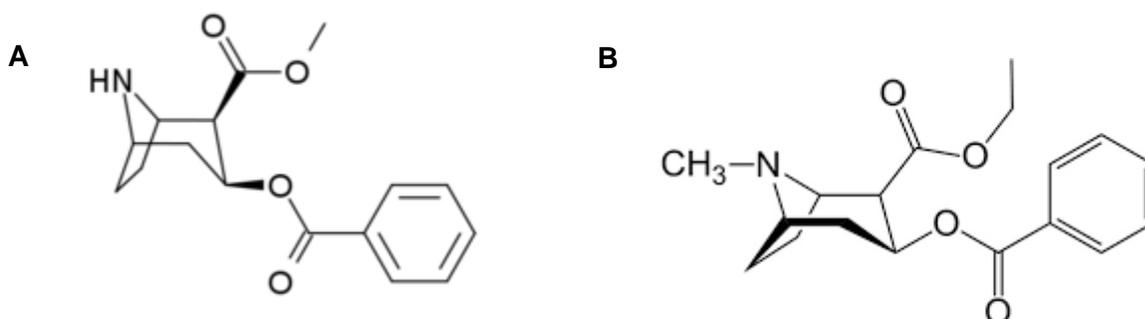


Figura 53 - Metabólitos ativos da cocaína. (A). Norcocaína e (B). Cocaetilenó.

Fonte: KOLBRICH et al. (2006) Modificado; MAURER et al. (2006) Modificado.

A associação entre uso de cocaína e etanol não é incomum nos usuários (BASTOS & BERTONI, 2013; BASTOS *et al.*, 2017), o que torna o contexto ainda mais agravante e expõe a necessidade da investigação pré-clínica da especificidade do anticorpo produzido. Dessa forma, a capacidade de ligação dos anticorpos IgG também a esses metabólitos, principalmente ao cocaetilenó, poderia aumentar a eficácia da vacinação na proteção dos efeitos da exposição fetal à droga. Em contrapartida, uma ligação extensa aos metabólitos inativos da droga (i.e., ecgonina, benzoilecgonina) poderia reduzir a eficácia da vacinação, partindo-se das premissas anteriores.

A investigação de subtipos de anticorpos de IgG anti-cocaína produzidos também é necessária para a compreensão dos mecanismos imunológicos nos quais o GNE-KLH estimula o sistema imunológico. O método ELISA utilizado neste estudo quantifica a densidade óptica dos anticorpos IgG anti-cocaína totais presentes na amostra e, sabe-se que, todos os subtipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) são transferidos ao feto em proporções distintas tanto por via placentária quanto pelo leite materno (MEHTA *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 1992; COSTA-CARVALHO *et al.*, 1996). Esses subtipos podem ter afinidades distintas pela droga e permanecerem por tempos maiores ou menores no recém-nascido, alterando a eficácia da vacinação, uma vez que possuem afinidades diferentes para cada tipo de antígenos e induzem mecanismos efetores diferentes da imunidade adaptativa (SCHROEDER & CAVACINI, 2010; VIDARSSON *et al.*, 2014).

6.2 Limitações do Estudo

Os resultados do presente estudo são promissores, porém devem ser avaliados sob a luz de algumas limitações.

O cálculo da amostra do segundo experimento foi feito para ter poder suficiente para avaliar as diferenças dos títulos de IgG. Isso pode ter prejudicado a observação da diferença de ganho de peso entre as mães tratadas com vacina e placebo, uma vez que o ganho de peso é altamente variável durante a gravidez, tanto em modelos animais quanto em estudos observacionais em mulheres. Usamos a densidade óptica para avaliar os títulos de IgG e IgM anti-cocaína, em vez de outras estratégias usadas para determinar os títulos de anticorpos. Embora isso possa impedir a comparabilidade dos títulos de anticorpos anti-cocaína de outros estudos, as correlações entre os títulos de anticorpos e os resultados da gravidez e as medidas comportamentais confirmaram as diferenças encontradas na densidade óptica. Este estudo não avaliou a influência da avididade do anticorpo anti-cocaína, que também pode influenciar nos efeitos protetores dos anticorpos.

O presente estudo utilizou uma vacina com base no carreador de hapteno KLH. O KLH é útil como um transportador em modelos animais, mas menos útil para vacinas humanas. Essa proteína possui vários domínios semelhantes aos encontrados em proteínas de parasitas humanos prevalentes, como o *Schistosoma mansoni* (Van de VIJVER *et al.*, 2004) e a infecção prévia com esse parasita parece induzir a produção de anticorpos anti-esquistossomos (DISSOUS *et al.*, 1986; GRZYCH *et al.*, 1987), podendo se ligar ao KLH na vacinação, diminuindo seu efeito imunogênico (Van de VIJVER *et al.*, 2004).

Assim, estudos futuros devem testar diferentes carreadores de hapteno de cocaína ou diferentes estratégias vacinais para fornecer uma abordagem para uso humano. O presente modelo de proteção gestacional também deve ser testado em outros mamíferos para certificar sua reprodutibilidade e segurança para mães e filhotes até um possível um estudo clínico.

6.3 Perspectivas

6.3.1 Desenvolvimento de novas moléculas imunogênicas

Diante da necessidade do estudo de moléculas mais efetivas e seguras como agentes imunogênicos na produção de anticorpos anti-cocaína, os calixarenos foram escolhidos pelo nosso grupo de pesquisa como possível molécula carreadora para a síntese de uma nova vacina anti-cocaína.

Calixarenos (**Figura 54**) são macrociclos formados por unidades fenólicas conectadas entre si por meio de pontes metilênicas nas posições *orto* às hidroxilas. Os calixarenos tem a capacidade de formação de complexos de inclusão, com moléculas neutras e/ou ionizadas. Além disso, os calixarenos são facilmente funcionalizáveis, o que os torna versáteis plataformas para o desenvolvimento e síntese de receptores moleculares e ligantes multivalentes capazes de mimetizar e/ou afetar funções biológicas específicas (GUTSCHE, 2008; De FÁTIMA *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram que calixarenos funcionalizados são capazes de potencializar a resposta imunológica (GERACI *et al.*, 2008). Quando comparados a outros carreadores, os calixarenos apresentam uma série de vantagens, tais como: estrutura bem definida, fácil obtenção, purificação e caracterização, fácil escalonamento para reações em grande escala, considerável estabilidade a altas temperaturas e luz e peso molecular acima de $1.000 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$, característica necessária para a indução de resposta imunológica (GERACI *et al.*, 2008; SANSONE *et al.*, 2010).

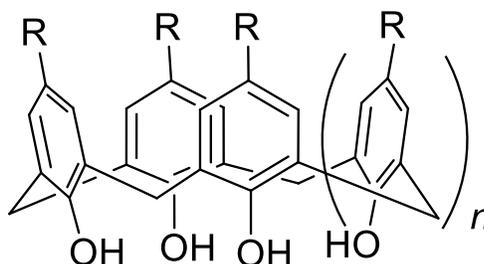


Figura 54 - Calixarenos: estrutura geral.

Fonte: De FÁTIMA *et al.* (2009).

6.3.2 As vacinas UFMG-VAC4N2 e UFMG-VAC8N2

Resultados obtidos no Núcleo de Pesquisa em Vulnerabilidade à Saúde – NAVeS, a partir de duas moléculas imunogênicas derivadas dos calixarenos, denominadas UFMG-VAC4N2 e UFMG-VAC8N2, sintetizadas no Grupo de Pesquisas em Química Orgânica e Biológica do Departamento de Química da UFMG (GEQOB), evidenciaram uma produção satisfatória de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína em um modelo de vacinação em camundongos. Estudos toxicológicos, desenvolvidos no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, na Faculdade de Medicina e na Escola de Medicina Veterinária da UFMG, demonstraram que essas moléculas não induzem efeitos adversos significativos em camundongos, ratos e primatas, respectivamente. Além disso, um estudo farmacocinético com um análogo da cocaína marcado com tecnécio metaestável (Tc^{99m}), desenvolvido no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG, demonstrou a capacidade dessas moléculas em reduzir a passagem da droga pela BHE, sendo, assim, substâncias promissoras para o tratamento da dependência química à cocaína e crack (NETO, 2017; MAIA, 2018).

Com o objetivo de caracterizar aspectos fenotípicos e funcionais da resposta imunológica *in vitro* às vacinas anti-cocaína sintetizadas pelo nosso grupo, está sendo desenvolvido, em parceria com o Instituto René Rachou (Fiocruz-Minas), um estudo no qual serão caracterizadas as principais células-alvo na interação *in vitro* das vacinas UFMG-VAC4N2 e UFMG-VAC8N2 com sangue periférico de indivíduos saudáveis e usuários e o perfil de produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios nesses indivíduos. Esse estudo é importante para determinar o perfil imunológico pré e pós-vacinal, que está diretamente relacionado à eficácia da vacina na produção de anticorpos anti-cocaína (KOSTEN *et al.*, 2014).

Estão sendo desenvolvidos, em parceria com a Faculdade de Farmácia e do Departamento de Química da UFMG, uma série de estudos visando obter uma formulação efetiva e segura para administração dessas vacinas em humanos. Esses estudos incluem: padronização de um método analítico para dosagem dos compostos na formulação, estudos de estabilidade e desenvolvimento da formulação propriamente dita e estudos de toxicidade da formulação em murinos e primatas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o imunoconjugado GNE-KLH é capaz de induzir a produção de anticorpos IgG e IgM anti-cocaína em ratas antes, durante e após a gestação na presença ou ausência de cocaína administrada no período gestacional. Os anticorpos IgG são transferidos aos filhotes por meio do leite materno, reduzindo a chegada da droga à prole no período de amamentação. Tais anticorpos são capazes de atenuar o efeito hiperlocomotor e exploratório induzido pela cocaína nos filhotes recém-desmamados, mas não na idade adulta. Os anticorpos IgG anti-cocaína das mães e filhotes de fato se ligam à droga, apresentando especificidade e, conseqüentemente, sendo capazes de bloquear sua ação. Os anticorpos IgG anti-cocaína produzidos pelas ratas na primeira gestação permanecem após o desmame da prole e são transferidos aos filhotes em uma segunda gestação. Esses resultados indicam que o GNE-KLH possui potencial para ser reposicionado como uma estratégia imunológica para proteção intrauterina à exposição à cocaína e ao crack.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABU-RAYA, B.; MAERTENS, K.; EDWARDS, K.M.; OMER, S.B.; ENGLUND, J.A.; FLANAGAN, K.L.; SNAPE, M.D.; AMIRTHALINGAM, G.; LEURIDAN, E.; DAMME, P.V.; PAPADEVANGÉLOU, V.; LAUNAY, O.; DAGAN, R.; CAMPINS, M.; CAVALIERE, A.F.; FRUSCA, T.; GUIDI, S.; O'RYAN, M.; HEININGER, U.; TAN, T.; ALSUWAIDI, A.R.; SAFADI, M.A.; VILCA, L.M.; WANLAPAKORN, N.; MADHI, S.A.; GILES, M.L.; PRYMULA, R.; LADHANI, S.; MARTINÓN-TORRES, F.; TAN, L.; MICHELIN, L.; SCAMBIA, G.; PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Global perspectives on immunization during pregnancy and priorities for future research and development: an international consensus statement. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n.1282, p. 1-24, 2020.

ACCORNERO, V.H.; ANTHONY, J.C.; MORROW, C.E.; XUE, L.; MANSOOR, E.; JOHNSON, A.L.; MCCOY, C.B.; BANDSTRA, E.S. Estimated effect of prenatal cocaine exposure on examiner-rated behavior at age 7 years. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 3, p. 370-378, 2011.

AKYUZ, N.; KEKATPURE, M.V.; LIU, J.; SHEINKOPF, S.J.; QUINN, B.T.; LALA, M.D.; KENNEDY, D.; MAKRIS, N.; LESTER, B.M.; KOSOFISKY, B.E. Structural brain imaging in children and adolescents following prenatal cocaine exposure: preliminary longitudinal findings. *Developmental Neuroscience*, v. 36, n. 3-4, p. 316-328, 2014.

ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*, v. 5, n. 3, p. 266-271, 2004.

ANDREOLLO, N.A.; SANTOS, E. F. dos; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L.R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012.

ARACIL-FERNÁNDEZ, A.; TRIGO, J.M.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M.S.; ORTEGA-ÁLVARO, A.; TERNIANOV, A.; NAVARRO, D.; ROBLEDO, P.; BERBEL, P.; MALDONADO, R.; MANZANARES, J. Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB₂ receptors. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 7, p. 1749-1763, 2012.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, v. 72, p. 4-15, 2015.

BADA, H.S.; DAS, A.; BAUER, C.R.; SHANKARAN, S.; LESTER, B.; LAGASSE, L.; HAMMOND, J.; WRIGHT, L.L.; HIGGINS, R. Impact of prenatal cocaine exposure on child behavior problems through school age. *Pediatrics*, v. 119, n. 2, p. 348-359, 2007.

BADA, H.S.; DAS, A.; BAUER; C.R.; SHANKARAN, S.; LESTER, B.; WRIGHT, L.L.; VERTER, J.; SMERIGLIO, V.L.; FINNEGAN, L.P.; MAZA, P.L. Gestational cocaine exposure and intrauterine growth: maternal lifestyle study. *Obstetrics & Gynecology*, v. 100, n. 5, p. 916-924, 2002.

BAGASRA, O.; FORMAN, L.J.; HOWEEDY, A.; WHITTLE, P. A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis. *Immunopharmacology*, v. 23, n. 3, p. 173-179, 1992.

BAILEY, D.N. Cocaine and Cocaethylene Binding to Human Milk. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 110, n. 4, p. 491-494, 1998.

BANDSTRA, E.S.; VOGEL, A.L.; MORROW, C.E.; XUE, L.; ANTHONY, J.C. Severity of Prenatal Cocaine Exposure and Child Language Functioning Through Age Seven Years: a longitudinal latent growth curve analysis. *Substance Use & Misuse*, v. 39, n. 1, p. 25-59, 2004.

BASTOS, F.I.; BERTONI, N. Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras? Rio de Janeiro: ICICT/FIOCRUZ, 2014. 224p.

BASTOS, F.I.P.M.; VASCONCELOS, M.T.L. de; REIS, N.B. dos; BONI, R.N. de; COUTINHO, C.F.S. III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2017. 528 p.

BAUER, C.R.; LANGER, J.C.; SHANKARAN, S.; BADA, H.S.; LESTER, B.; WRIGHT, L.L.; KRAUSE-STEINRAUF, H.; SMERIGLIO, V.L.; FINNEGAN, L.P.; MAZA, P.L.; VERTER, J. Acute neonatal effects of cocaine exposure during pregnancy. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, v. 159, n. 9, p. 824-34, 2005.

BAUER, C.R.; SHANKARAN, S.; BADA, H.S.; LESTER, B.; WRIGHT, L.L.; KRAUSE-STEINRAUF, H.; SMERIGLIO, V.L.; FINNEGAN, L.P.; MAZA, P.L.; VERTER, J. The Maternal Lifestyle Study: drug exposure during pregnancy and short-term maternal outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 186, n. 3, p. 487-95, 2002.

BEAULIEU, S.; SAURY, S.; SAREEN, J.; TREMBLAY, J.; SCHÜTZ, C.G.; MCINTYRE, R.S., SCHAFFER, A. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) Task Force. The Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) task force recommendations for the management of patients with mood disorders and comorbid substance use disorders. *Annals of Clinical Psychiatry*, v. 24, n. 1, 2012.

BECKER, J.B. Sex differences in addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 18, n. 4, p. 395-402, 2016.

BERRO, L.F.; SANTOS, R.; HOLLAIS, A.W.; WUO-SILVA, R.; FUKUSHIRO, D.F.; MÁRI-KAWAMOTO, E.; COSTA, J.M.; TROMBIN, T.F.; PATTI, C.L.; GRAPIGLIA, S.B. Acute total sleep deprivation potentiates cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Neuroscience Letters*, v. 579, p. 130-133, 2014.

BLUM, P.M.; PHELPS, D.L.; ANK, B.J.; KRANTMAN, H.J.; STIEHM, E.R. Survival of oral human immune serum globulin in the gastrointestinal tract of low birth weight infants. *Pediatric Research*, v. 15, n. 9, p. 1256-1260, 1981.

BOLANOS, C.A.; NESTLER, E.J. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Medicine*, v. 5, n. 1, p. 69-83, 2004.

BONAM, S.R.; PARTIDOS, C.D.; HALMUTHUR, S.K.M.; MULLER, S. An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy. *Trends in Pharmacological Science*, v. 38, n. 9, p. 771-793, 2017.

BØNNELYKKE, K.; PIPPER, C.B.; BISGAARD, H. Sensitization does not develop in utero. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 121, n. 3, p. 646-651, 2008.

BØNNELYKKE, K.; PIPPER, C.B.; BISGAARD, H. Transfer of maternal IgE can be a common cause of increased IgE levels in cord blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 126, n. 3, p. 657-663, 2010.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*, v. 21, n. 24, p. 3382-3388, 2003.

BREMER, P.T.; JANDA, K.D. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder. *Pharmacological Reviews*, v. 69, n. 3, p. 298-315, 2017.

BRIDGETT, D.J.; MAYES, L.C. Development of inhibitory control among prenatally cocaine exposed and non-cocaine exposed youths from late childhood to early adolescence: the effects of gender and risk and subsequent aggressive behavior. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 1, p. 47-60, 2011.

BUCKINGHAM-HOWES, S.; BERGER, S.S.; SCALETTI, L.A.; BLACK, M.M. Systematic review of prenatal cocaine exposure and adolescent development. *Pediatrics*, v. 131, n. 6, p.1917-1936, 2013.

BUTLER, A.J.; REHM, J.; FISCHER, B. Health outcomes associated with crack-cocaine use: systematic review and meta-analyses. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 180, p. 401-416, 2017.

CAI, X.; WHITFIELD, T.; HIXON, M.S.; GRANT, Y.; KOOB, G.; JANDA, K.D. Probing active cocaine vaccination performance through catalytic and noncatalytic hapten design. *Journal of Medical Chemistry*, v. 56, n. 9, p. 3701-3709, 2013.

CAIN, M.A.; BORNICK, P.; WHITEMAN, V. The maternal, fetal, and neonatal effects of cocaine exposure in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 56, n. 1, p.124-132, 2013.

CALATAYUD J.; GONZÁLEZ A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. *Anesthesiology*, v. 98, n. 6, p. 1503-1508, 2003.

CALPE-LÓPEZ, C.; GARCÍA-PARDO, M.P.; AGUILAR, M.A. Cannabidiol Treatment Might Promote Resilience to Cocaine and Methamphetamine Use Disorders: a review of possible mechanisms. *Molecules*, v. 24, n. 14, p. 2583-2604, 2019.

CAMARGO, P.O.; MARTIN, M.F.D. Os efeitos do crack na gestação e nos bebês nascidos de mães usuárias: uma revisão bibliográfica. *Cadernos de Terapia Ocupacional da UFSCar*, v. 22, p. 161-169, 2014.

CARMODY, D.P.; BENNETT, D.S.; LEWIS, M. The effects of prenatal cocaine exposure and gender on inhibitory control and attention. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 1, p. 61-68, 2011.

CARRERA, M.R.A.; ASHLEY, J.A.; PARSONS, L.H.; WIRSCHING, P.; KOOB, G.F.; JANDA, K.D. Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature*, v. 378, n. 6558, p. 727-730, 1995.

CARRERA, M.R.A.; ASHLEY, J.A.; WIRSCHING, P.; KOOB, G.F.; JANDA, K.D. A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, p. 1988-1992, 2001.

CARRERA, M.R.A.; MEIJLER, M.M.; JANDA, K.D. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 5019-5030, 2004.

CASTELLS, X.; CASAS, M.; PÉREZ-MAÑÁ, C.; RONCERO, C.; VIDAL, X.; CAPELLÀ, D. Efficacy of psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Review*, n. 2, art. n.: CD007380, 2010.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S.; CARVALHO, V.M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2014. Cap. 4.3, p. 353-375.

CHOI, S.J.; MAZZIO, E.; KOLTA, M.G.; SOLIMAN, K.F.A. Prenatal cocaine exposure affects postnatal dopaminergic systems in various regions of the rat brain. *Annals of The New York Academy of Sciences*, v. 844, n. 1, p. 293-302, 1998.

CHOI, S.J.; MAZZIO, E.; SOLIMAN, K.F.A. The effects of gestational cocaine exposure on pregnancy outcome, postnatal development, cognition and locomotion in rats. *Annals of The New York Academy of Sciences*, v. 844, n. 1, p. 324-335, 1998.

CHURCH, M.W.; OVERBECK, G.W.; ANDRZEJCZAK, A.L. Prenatal cocaine exposure in the Long-Evans rat: I. dose-dependent effects on gestation, mortality, and postnatal maturation. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 12, n. 4, p. 327-334, 1990.

CORNISH, J.W.; O'BRIEN, C.P. Crack cocaine abuse: an epidemic with many public health consequences. *Annual Review of Public Health*, v. 17, p. 259-73, 1996.

COSTA-CARVALHO, B.T.; VIERIA, H.M.; DIMANTAS, R.B.; ARSLANIAN, C.; NASPITZ, C.K.; SOLÉ, D.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Transfer of IgG subclasses across placenta in term and preterm newborns. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, n. 2, p. 201-4, 1996.

CRESSMAN, A.M.; KOREN, G.; PUPCO, A.; KIM, E.; ITO, S.; BOZZO, P. Maternal cocaine use during breastfeeding. *Canadian family physician*, v. 58, n. 11, p. 1218-1219, 2012.

CROZATIER, C.; GUERRIERO, R.M.; MATHIEU, F.; GIROS, B.; NOSTEN-BERTRAND, M.; KOSOFSKY, B.E. Altered cocaine-induced behavioral sensitization in adult mice exposed to cocaine in utero. *Developmental Brain Research*, v. 147, n. 1-2, p. 97-105, 2003.

CUNHA, G.B.; ROTTA, N.T.; SILVA, A.R.; DIEDER, A.L.; WOLF, A.L.; MOSER, C.; SILVA, F.F.; SOCAL, M.P.; SILVA, P.F.; MARGIS, R. Prevalência da exposição pré-natal à cocaína em uma amostra de recém-nascidos de um hospital geral universitário. *Jornal de Pediatria*, v. 77, n. 5, p. 369-373, 2001.

De FÁTIMA, A.; FERNANDES, S.A.; SABINO, A.A. Calixarenes as new platforms for drug design. *Current drug discovery technologies*, v. 6, n. 2, p. 151-170, 2009.

De GIOVANNI, N.; MARCHETTI, D. Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. *Reproductive toxicology*, v. 33, n. 1, p. 1-14, 2012.

De JONG, I.E.M.; STEENBERGEN, P.J.; De KLOET, E.R. Behavioral sensitization to cocaine: cooperation between glucocorticoids and epinephrine. *Psychopharmacology*, v. 204, n. 4, p. 693-703, 2009.

DEMERS-MATHIEU, V.; UNDERWOOD, M.; BEVERLY, R.; NIELSEN, S.; DALLAS, D. Comparison of human milk immunoglobulin survival during gastric digestion between preterm and term infants. *Nutrients*, v. 10, n. 5, p. 631-644, 2018.

DICKSON, P.H.; LIND, A.; STUDTS, P.; NIPPER, H.C.; MAKOID, M.; THERKILDSEN, D. The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory. *Journal of Forensic Sciences*, v. 39, n. 1, p. 207-214, 1994.

DISSOUS, C.; GRZYCH, J.M.; CAPRON, A. Schistosoma mansoni shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, v. 323, n. 6087, p. 443-445, 1986.

Dos SANTOS, J.F.; CAVALCANTE, C.M.B.; BARBOSA, F.T.; GITAÍ, D.L.G.; DUZZIONI, M.; TILELLI, C.Q.; SHETTY, A.K.; CASTRO, O.W. Maternal, fetal and neonatal consequences associated with the use of crack cocaine during the gestational period: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 298, n. 3, p. 487-503, 2018.

DOW-EDWARDS, D.; IJIMA, M.; STEPHENSON, S.; JACKSON, A.; WEEDON, J. The effects of prenatal cocaine, post-weaning housing and sex on conditioned place preference in adolescent rats. *Psychopharmacology*, v. 231, n. 8, p. 1543-1555, 2014.

DOW-EDWARDS, D.L.; BENVENISTE, H.; BEHNKE, M.; BANDSTRA, E.S.; SINGER, L.T.; HURD Y.L.; STANFORD, L.R. Neuroimaging of prenatal drug exposure. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 28, n. 3, p. 386-402, 2006.

DU, C.; YU, M.; VOLKOW, N.D.; KORETSKY, A.P.; FOWLER, J.S.; BENVENISTE, H. Cocaine increases the intracellular calcium concentration in brain independently of its cerebrovascular effects. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 45, p.11522-11531, 2006.

DUMONT, A.R.; KALFAYAN, L.H.; SÉKALY, R.P. Modulation of immune responses – strategies for optimising vaccines. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 4, n. 5, p. 627-630, 2004.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: relating their ages. *Life Sciences*, v. 1, n.152, p. 244-248, 2016.

EDDIE, D.S.; SCHULKIND, M.L.; ROBBINS, J.B. The isolation and biologic activities of purified secretory IgA and IgG anti-Salmonella typhimurium "O" antibodies from rabbit intestinal fluid and colostrum. *Journal of Immunology*, v. 106, n. 1, p. 181-190, 1971.

EIBL, M.M.; WOLF, H.M.; FÜRNKRANZ, H.; ROSENKRANZ, A. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. *New England Journal of Medicine*, v. 319, n. 1, p. 1-7, 1988.

ENGLAND, L.; BRENNER, R.; BHASKAR, B.; SIMONS-MORTON, B.; DAS, A.; REVENIS, M.; MEHTA, N.; CLEMENS, J. Breastfeeding practices in a cohort of inner-city women: the role of contraindications. *BMC Public Health*, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2003.

ERHARDT, E.; ZIBETTI, L.C.; GODINHO, J.M.; BACCHIERI, B.; BARROS, H.M. Behavioral changes induced by cocaine in mice are modified by a hyperlipidic diet or recombinant leptin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, n. 12, p. 1625-1635, 2006.

EVANS, S.M.; FOLTIN, R.W. Exogenous progesterone attenuates the subjective effects of smoked cocaine in women, but not in men. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 3, p. 659-674, 2005.

FAUCETTE, A.N.; UNGER, B.L.; GONIK, B.; CHEN, K. Maternal vaccination: moving the science forward. *Human Reproduction Update*, v. 21, n. 1, p. 119-135, 2014.

FAUPEL-BADGER, J. M.; HSIEH, C.C.; TROISI, R.; LAGIOU, P.; POTISCHMAN, N. Plasma Volume Expansion in Pregnancy: implications for biomarkers in population studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 16, n. 9, p. 1720-1723, 2007.

FETISSOV, S.O. Neuropeptide autoantibodies assay. *Methods in Molecular Biology*, v. 789, p.295-302, 2011.

FINNIGAN, L. Substance abuse in Canada: licit and illicit drug use during pregnancy: Maternal, neonatal and early childhood consequences. Ottawa, ON: Canadian Centre on Substance Abuse, 2013.

FIRAN, M.; BAWDON, R.; RADU, C.; OBER, R.J.; EAKEN, D.; ANTOHE, F.; GHETIE, V.; WARD, E.S. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *International Immunology*, v. 13, n. 8, p. 993-1002, 2001.

FOX, B.S.; KANTAK, K.M.; EDWARDS, M.A.; BLACK, K.M.; BOLLINGER, B.K.; BOTKA, A.J.; FRENCH, T.L.; THOMPSON, T.L.; SCHAD, V.C.; GREENSTEIN, J... Efficacy of a therapeutic cocaine vaccine in rodent models. *Nature Medicine*, v. 2, n. 10, p. 1129-1132, 1996.

GADJOU, C.; DANGER, Y.; SANDOUK, P.; SCHERRMANN, J.M.; BLANCHARD, D.; FOLLÉA, G.; GALONS, H. Design of cocaethylene and cocaine conjugates to produce highly selective polyclonal antibodies. *International Journal of Biomedical Science*, v. 2, n. 1, p. 53-58, 2006.

GENDLE, M.H.; STRAWDERMAN, M.S.; MACTUTUS, C.F.; BOOZE, R.M.; LEVITSKY, D.A.; STRUPP, B.J. Impaired sustained attention and altered reactivity to errors in an animal model of prenatal cocaine exposure. *Developmental Brain Research*, v. 147, n. 1-2, p. 85-96, 2003.

GERACI, C.; CONSOLI, G.M.; GALANTE, E.; BOUSQUET, E.; PAPPALARDO, M.; SPADARO, A. Calix[4]arene decorated with four Tn antigen glycomimetic units and P3CS immunoadjuvant: synthesis, characterization, and anticancer immunological evaluation. *Bioconjugate chemistry*, v. 19, n. 3, p. 751-758, 2008.

GITTLER, J.; McPHERSON, M. Prenatal substance abuse. *Child Today*, v. 19, n. 4, p. 3-7, 1990.

GOLDSTEIN, R.A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A.; JOHNSON-ARBOR, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. *Seminars in Diagnostic Pathology*, v. 26, n. 1, p. 10-17, 2009.

GRAZIANI, M.; ANTONILLI, L.; TOGNA, A.R.; GRASSI, M.C.; BADIANI, A.; SASO, L. Cardiovascular and hepatic toxicity of cocaine: potential beneficial effects of modulators of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, ID. 8408479, 2016.

GRZYCH, J.M.; DISSOUS, C.; CAPRON, M.; TORRES, S.; LAMBERT, P.H.; CAPRON, A. Schistosoma mansoni shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *Journal of Experimental Medicine*, v. 165, n. 3, p. 865-878, 1987.

GUTSCHE, C.D. *Calixarenes: An Introduction, 2nd Edition*. The Royal Society of Chemistry, 2008.

HANSON, L.A.; KOROTKOVA, M.; HAVERSEN, L.; MATTSBY-BALTZER, I.; HAHN-ZORIC, M.; SILFVERDAL, S.A.; STRANDVIK, B.; TELEMO, E. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatrics International*, v. 44, n. 4, p. 347-352, 2002.

HARRIS, N.L.; SPOERRI, I.; SCHOPFER, J.F.; NEMBRINI, C.; MERKY, P.; MASSACAND, J.; URBAN, J.F.Jr.; LAMARRE, A.; BURKI, K.; ODERMATT, B.; ZINKERNAGEL, R.M.; MACPHERSON, A.J. Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *Journal of Immunology*, v. 177, n. 9, p. 6256-6262, 2006.

HEEKIN, R. D.; SHORTER, D.; KOSTEN, T.R. Current status and future prospects for the development of substance abuse vaccines. *Expert Review of Vaccines*, v. 16, n. 11, p. 1067-1077, 2017.

HEFFELFINGER, A.K.; CRAFT, S.; WHITE, D.A.; SHYKEN, J. Visual attention in preschool children prenatally exposed to cocaine: implications for behavioral regulation. *Journal of The International Neuropsychological Society*, v. 8, n. 1, p. 12-21, 2002.

HICKS, M.J.; DE, B.P.; ROSENBERG, J.B.; DAVIDSON, J.T.; MORENO, A.Y.; JANDA, K.D.; WEE, S.; KOOB, G.F.; HACKETT, N.R.; KAMINSKY, S.M. Cocaine analog coupled to disrupted adenovirus: a vaccine strategy to evoke high-titer immunity against addictive drugs. *Molecular Therapy*, v. 19, n. 3, p. 612-619, 2011.

HICKS, M.J.; KAMINSKY, S.M.; DE, B.P.; ROSENBERG, J.B.; EVANS, S.M.; FOLTIN, R.W.; ANDRENYAK, D.M.; MOODY, D.E.; KOOB, G.F.; JANDA, K.D. Fate of systemically administered cocaine in nonhuman primates treated with the dAd5GNE anticocaine vaccine. *Human Gene Therapy Clinical Development*, v. 25, n. 1, p. 40-49, 2014.

HOFFMAN, B.L.; SCHORGE, J.O.; BRADSHAW, K.D.; HALVORSON, L.M.; SHAFFER, J.I.; CORTON, M.M. *Williams Gynecology*. 3^a ed. New York: McGraw Hill, 2016.

HSIEH, C.C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; WEINBORN, V.; BARILE, D.; BELL, J.M.L.N.M. Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: effects against the 21st century disorders. *Biomed Research International*, v. 2015, p. 1-16, 2015.

IJAZ, M.K.; SABARA, M.I.; FRENCHICK, P.J.; BABIUK, L.A. Effect of different routes of immunization with bovine rotavirus on lactogenic antibody response in mice. *Antiviral Research*, v. 8, n. 5-6, p. 283-297, 1987.

IMJECT[®] EDC Carrier Protein Spin Kits, Thermo Scientific, Waltham, MA. User Guide.

ISO, A.; NAKAHARA, K.; A BARR, G.; COOPER, T.B.; MORISHIMA, H.O. Long-term intravenous perinatal cocaine exposure on the mortality of rat offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 22, n. 2, p. 165-173, 2000.

IZUMI, H.; KOSAKA, N.; SHIMIZU, T.; SEKINE, K.; OCHIYA, T.; TAKASE, M. Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *Plos One*, v. 9, n. 2, e88843, 2014.

JENKINS, A.J.; LLOSA, T.; MONTOYA, I.; CONE, E.J. Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. *Forensic Science International*, v. 77, n. 3, p. 177-189, 1996.

JOHNS, J.M.; MEANS, L.W.; MEANS, M.J.; MCMILLEN, B.A. Prenatal exposure to cocaine I: effects on gestation, development, and activity in Sprague Dawley rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 14, n. 5, p. 337-342, 1992.

JØRGENSEN, N.; PERSSON, G.; HVIID, T.V.F. The tolerogenic function of regulatory T cells in pregnancy and cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1-21, 2019.

KASSADA, D.S.; MARCON, S.S.; PAGLIARINI, M.A.; ROSSI, R.M. Prevalência do uso de drogas de abuso por gestantes. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 26, n. 5, p. 467-471, 2013.

KELLER, R.W. Jr.; SNYDER-KELLER, A. Prenatal cocaine exposure. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 909, p. 217-232, 2000.

KELLER-STANISLAWSKI, B.; ENGLUND, J.A.; KANG, G.; MANGTANI, P.; NEUZIL, K.; NOHYNEK, H.; PLESS, R.; LAMBACH, P.; ZUBER, P. Safety of immunization during pregnancy: a review of the evidence of selected inactivated and live attenuated vaccines. *Vaccine*, v. 32, n. 52, p. 7057-7064, 2014.

KIDIMA, W.B. Syncytiotrophoblast functions and fetal growth restriction during placental malaria: updates and implication for future interventions. *Biomed Research International*, v. 2015, ID. 451735, p. 1-9, 2015.

KIM, K.; KELLER, M.A.; HEINER, D.C. Immunoglobulin G subclasses in human colostrum, milk and saliva. *Acta Paediatrica*, v. 81, n. 2, p. 113-118, 1992.

KIM, S.; PARK, T. Acute and chronic effects of cocaine on cardiovascular health. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 3, p. 584-606, 2019.

KIMISHIMA, A.; WENTHUR, C.J.; EUBANKS, L.M.; SATO, S.; JANDA, K.D. Cocaine Vaccine Development: evaluation of carrier and adjuvant combinations that activate multiple toll-like receptors. *Molecular Pharmaceutics*, v. 13, n. 11, p. 3884-3890, 2016.

KINSEY, B. Vaccines against drugs of abuse: where are we now? *Therapeutic Advances in Vaccines*, v. 2, n. 4, p. 106-117, 2014.

KINSEY, B.M.; JACKSON, D.C.; ORSON, F.M. Anti-drug vaccines to treat substance abuse. *Immunology and Cell Biology*, v. 87, p. 309-314, 2009.

KINSEY, B.M.; KOSTEN, T.R.; ORSON, F.M. Active immunotherapy for the treatment of cocaine dependence. *Drugs Future*, v. 35, n. 4, p. 301-306, 2010.

KISKOVA, T.; MYTSKO, Y.; SCHEPELMANN, M.; HELMER, H.; FUCHS, R.; MIEDL, H.; WADSACK, C.; ELLINGER, I. Expression of the neonatal Fc-receptor in placental-fetal endothelium and in cells of the placental immune system. *Placenta*, v. 78, p. 36-43, 2019.

KISSIN, W.B.; SVIKIS, D.S.; MORGAN, G.D.; HAUG, N.A. Characterizing pregnant drug-dependent women in treatment and their children. *Journal of Substance Abuse Treatment*, v. 21, n. 1, p. 27-34, 2001.

KOLBRICH, E.A.; BARNES, A.J.; GORELICK, D. A.; BOYD, S.J.; CONE, E.J.; HUESTIS, M. A. Major and Minor Metabolites of Cocaine in Human Plasma following Controlled Subcutaneous Cocaine Administration. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 30, n. 8, p. 501-510, 2006.

KOSTEN, T.R.; DOMINGO, C.B.; SHORTER, D.; ORSON, F.; GREEN, C.; SOMOZA, E.; SEKERKA, R.; LEVIN, F.R.; MARIANI, J.J.; STITZER, M.; TOMPKINS, D.A.; ROTROSEN, J.; THAKKAR, V.; SMOAK, B.; KAMPMAN, K. Vaccine for cocaine dependence: a randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial. *Drug and alcohol dependence*, v. 140, p. 42-47, 2014.

KOSTEN, T.A.; SHEN, X.Y.; KINSEY, B.M.; KOSTEN, T.R.; ORSON, F.M. Attenuation of cocaine-induced locomotor activity in male and female mice by active immunization. *The American Journal on Addictions*, v. 23, n. 6, p. 604-607, 2014.

KRISTOFFERSEN, E.K. Human placental Fcγ-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG. *Apmis*, v. 104, n. 64, p. 5-36, 1996.

KUBRUSLY, R.C.C.; BHIDE, P.G. Cocaine exposure modulates dopamine and adenosine signaling in the fetal brain. *Neuropharmacology*, v. 58, n. 2, p. 436-443, 2010.

KUCZKOWSKI, K.M. The effects of drug abuse on pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 19, n. 6, p. 578-585, 2007.

KUHAR, M.J.; PILOTTE, N.S. Neurochemical changes in cocaine withdrawal. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 17, n. 7, p. 260-264, 1996.

LAMY, S.; LAQUEILLE, X.; THIBAUT, F. Conséquences potentielles de la consommation de tabac, de cannabis et de cocaïne par la femme enceinte sur la grossesse, le nouveau-né et l'enfant: revue de littérature. *L'Encéphale*, v. 41, suppl. 1, p. 13-20, 2015.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S.S.; CASTELLO, G. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD)/UNIFESP, 2014. 85 p.

LEE, C.T.; CHEN, J.; HAYASHI, T.; TSAI, S.Y.; SANCHEZ, J.F.; ERRICO, S.L.; AMABLE, R.; SU, T.P.; LOWE, R.H.; HUESTIS, M.A. A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine. *Plos Medicine*, v. 5, n. 6, e117, 2008.

LEE, C.T.; CHEN, J.; WORDEN, L.T.; FREED, W.J. Cocaine causes deficits in radial migration and alters the distribution of glutamate and GABA neurons in the developing rat cerebral cortex. *Synapse*, v. 65, n. 1, p. 21-34, 2010.

LESTER, B.M.; TRONICK, E.Z.; LAGASSE, L.; SEIFER, R.; BAUER, C.R.; SHANKARAN, S.; BADA, H.S.; WRIGHT, L.L.; SMERIGLIO, V.L.; LU, J. The maternal lifestyle study: effects of substance exposure during pregnancy on neurodevelopmental outcome in 1-month-old infants. *Pediatrics*, v. 110, n. 6, p. 1182-1192, 2002.

LEURIDAN, E.; HENS, N.; HUTSE, V.; AERTS, M.; VAN DAMME, P. Kinetics of maternal antibodies against rubella and varicella in infants. *Vaccine*, v. 29, n. 11, p. 2222-2226, 2011.

LEVIN, F.R.; BISAGA, A.; RABY, W.; AHARONOVICH, E.; RUBIN, E.; MARIANI, J.; BROOKS, D.J.; GARAWI, F.; NUNES, E.V. Effects of major depressive disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder on the outcome of treatment for cocaine dependence. *Journal of Substance Abuse Treatment*, v. 34, n. 1, p. 80-89, 2008.

LEWIS, B.A.; SINGER, L.T.; SHORT, E.J.; MINNES, S.; ARENDT, R.; WEISHAMPEL, P.; KLEIN, N.; MIN, M.O. Four-year language outcomes of children exposed to cocaine in utero. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, n. 5, p. 617-627, 2004.

LI, Z.; COLES, C.D.; LYNCH, M.E.; HAMANN, S.; PELTIER, S.; LACONTE, S.; HU, X. Prenatal cocaine exposure alters emotional arousal regulation and its effects on working memory. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 31, n. 6, p. 342-348, 2009.

LIDOW, M.S. Consequences of prenatal cocaine exposure in nonhuman primates. *Brain Research. Developmental Brain Research*, v. 147, n. 1-2, p. 23-36, 2003.

LIDOW, M.S. Prenatal cocaine exposure adversely affects development of the primate cerebral cortex. *Synapse*, v. 21, n. 4, p. 332-341, 1995.

LIS-KUBERKA, J.; KRÓLAK-OLEJNIK, B.; BERGHAUSEN-MAZUR, M.; ORCZYK-PAWIŁOWICZ, M. Lectin-based method for deciphering human milk IgG sialylation. *Molecules*, v. 24, n. 3797, p. 1-16, 2019.

LIU, J.; LESTER, B.M.; NEYZI, N.; SHEINKOPF, S.J.; GRACIA, L.; KEKATPURE, M.; KOSOFISKY, B.E. Regional brain morphometry and impulsivity in adolescents following prenatal exposure to cocaine and tobacco. *JAMA Pediatrics*, v. 167, n. 4, p. 348-54, 2013.

LOCKNER, J.W.; EUBANKS, L.M.; CHOI, J.L.; LIVELY, J.M.; SCHLOSBERG, J.E.; COLLINS, K.C.; GLOBISCH, D.I.; ROSENFELD-GUNN, R.J.; WILSON, I.A.; JANDA, K.D. Flagellin as carrier and adjuvant in cocaine vaccine development. *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 653-662, 2015.

LOZANO, N.A.; LOZANO, A.; MARINI, V.; SARANZ, R.J.; BLUMBERG, R.S.; BAKER, K.; AGRESTA, M.F.; PONZIO, M.F. Expression of FcRn receptor in placental tissue and its relationship with IgG levels in term and preterm newborns. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 80, n. 3, p. 12972-12997, 2018.

LUBIN, D.A.; ELLIOT, J.C.; BLACK, M.C.; JOHNS, J. An oxytocin antagonist infused into the central nucleus of the amygdala increases maternal aggressive behavior. *Behavioral Neuroscience*, v. 117, n. 2, p. 195-201, 2003.

LUFT, A.; MENDES, F.F. Anestesia no paciente usuário de cocaína. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 57, n. 3, p. 307-314, 2007.

MAIA, A.F.S. *Novas Plataformas na Síntese de Imunógenos Direcionados ao Tratamento da Dependência Química à Cocaína*. Orientador: Prof. Dr. Ângelo de Fátima. Coorientador: Prof^a. Dra. Rosemeire Brondi Alves. 2018 (210 f). Tese (Doutorado em Química – Química Orgânica) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MALANGA, C.J.; RIDAY, T.T.; CARLEZON, W.A.Jr.; KOSOFKY, B.E. Prenatal Exposure to Cocaine Increases the Rewarding Potency of Cocaine and Selective Dopaminergic Agonists in Adult Mice. *Biological Psychiatry*, v. 63, n. 2, p. 214–221, 2008.

MALANGA, C.J.; PEJCHAL, M.; KOSOFKY, B.E. Prenatal exposure to cocaine alters the development of conditioned place-preference to cocaine in adult mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 87, n. 4, p. 462-471, 2007.

MALEK, A. Effects of Prenatal Cocaine Exposure on Human Pregnancy and Postpartum. *Pharmaceutica Analytica Acta* v. 3, n. 9, e1000191, 2012.

MANZ, R.A.; HAUSER, A.E.; HIEPE, F.; RADBRUCH, A. Maintenance of serum antibody levels. *Annual Review of Immunology*, v. 23, n. 1, p. 367-386, 2005.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of. Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARTELL, B.A.; ORSON, F.M.; POLING, J.; MITCHELL, E.; ROSSEN, R.D.; GARDNER, T.; KOSTEN, T.R. Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients. *Archives of General Psychiatry*, v. 66, n. 10, p. 1116-1124, 2009.

MARTIN, M.M.; GRAHAM, D.L.; McCARTHY, D.M.; BHIDE, P.G.; STANWOOD, G.D. Cocaine-induced neurodevelopmental deficits and underlying mechanisms. *Birth Defects Research, Part C. Embryo Today: reviews*, v. 108, n. 2, p. 147-173, 2016.

MAURER, H.H.; SAUER, C.; THEOBALD, D.S. Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine and codeine. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 28, n. 3, p. 447-453, 2006.

MAYES, L.C. A behavioral teratogenic model of the impact of prenatal cocaine exposure on arousal regulatory systems. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 24, n. 3, p. 385-395, 2002.

McCARTHY, D.M.; BHIDE, P.G. Prenatal cocaine exposure decreases parvalbumin-immunoreactive neurons and GABA-to-projection neuron ratio in the medial prefrontal cortex. *Developmental Neuroscience*, v. 34, n. 2-3, p. 174-183, 2012.

McCARTHY, D.M.; ZHANG, X.; DARNELL, S.B.; SANGREY, G.R.; YANAGAWA, Y.; SADRI-VAKILI, G.; BHIDE, P. G. Cocaine Alters BDNF Expression and Neuronal Migration in the Embryonic Mouse Forebrain. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 38, p. 13400-13411, 2011.

McMURRAY, M.S.; COX, E.T.; JARRETT, T.M.; WILLIAMS, S.K.; WALKER, C.H.; JOHNS, J.M. Impact of gestational cocaine treatment or prenatal cocaine exposure on early postpartum oxytocin mRNA levels and receptor binding in the rat. *Neuropeptides*, v. 42, n. 5-6, p. 641-652, 2008.

McMURRAY, M.S.; JOYNER, P.W.; MIDDLETON, C. W.; JARRETT, T.M.; ELLIOTT, D. L.; BLACK, M.A.; HOFER, V.E.; WALKER, C.H.; JOHNS, J.M. Intergenerational effects of cocaine on maternal aggressive behavior and brain oxytocin in rat dams. *Stress*, v. 11, n. 5, p. 398-411, 2008.

McMURRAY, M.S.; OGUZ, I.; RUMPLE, A.M.; PANIAGUA, B.; STYNER, M.A.; JOHNS, J.M. Effects of prenatal cocaine exposure on early postnatal rodent brain structure and diffusion properties. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 47, p. 80-88, 2015.

McMURRAY, M.S.; ZESKIND, P.S.; MEINERS, S.M.; GARBER, K.A.; TIEN, H.; JOHNS, J.M. Effect of prenatal cocaine on early postnatal thermoregulation and ultrasonic vocalization production. *Frontiers in Psychology*, v. 4, p. 1-13, 2013.

MEHTA, P.D.; MEHTA, S.P.; ISAACS, C.E. Distribution of IgG subclasses in human colostrum and milk. *Immunology Letters*, v. 22, n. 3, p. 235-8, 1989.

MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H. Cocaine's effects on neuroendocrine systems: clinical and preclinical studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 57, n. 3, p. 571-599, 1997.

MEYER, K.D.; ZHANG, L. Short- and long-term adverse effects of cocaine abuse during pregnancy on the heart development. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, v. 3, n. 1, p. 7-16, 2009.

MINNES, S.; SINGER, L.T.; KIRCHNER, H.L.; SHORT, E.; LEWIS, B.; SATAYATHUM, S.; QUEH, D. The effects of prenatal cocaine exposure on problem behavior in children 4–10 years. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 32, n. 4, p. 443-451, 2010.

MINOZZI, S.; AMATO, L.; PANI, P.P.; SOLIMINI, R.; VECCHI, S.; ZUCCARO, P.; DAVOLI, M. Dopamine agonists for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Review*, n.12, art. n.: CD003352, 2015.

MOHAN, T.; VERMA, P.; RAO, D.N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian Journal of Medical Research*, v.138, n. 5, p. 779-795, 2013.

MONCADA, C.; TORRES, V.; ISRAEL, Y. Simple method for the preparation of antigen emulsions for immunization. *Journal of Immunological Methods*, v. 162, n. 1, p. 133-140, 1993.

MORENO, A.Y.; JANDA, K.D. Immunopharmacotherapy: vaccination strategies as a treatment for drug abuse and dependence. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 92, p.199-205, 2009.

MORROW, B.A.; ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H. Prenatal cocaine exposure disrupts non-spatial, short-term memory in adolescent and adult male rats. *Behavioural Brain Research*, v. 129, n. 1-2, p. 217-223, 2002.

MORROW, C. E.; VOGEL, A.L.; ANTHONY, J.C.; OFIR, A.Y.; DAUSA, A.T.; BANDSTRA, E.S. Expressive and receptive language functioning in preschool children with prenatal cocaine exposure. *Journal of Pediatric Psychology*, v. 29, n. 7, p. 543-554, 2004.

NAIR, P.; BLACK, M.; ACKERMAN, J.; SCHULER, M.; KEANE, V.A. Children's cognitive-behavioral functioning at age 6 and 7: prenatal drug exposure and care giving environment. *Ambulatory Pediatrics*, v. 8, n. 3, p. 154-162, 2008.

NELSON, C.J.; METER, K.E.; WALKER, C.H.; AYERS, A.A.; JOHNS, J.M. A dose-response study of chronic cocaine on maternal behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 20, n. 6, p. 657-660, 1998.

NEPHEW, B.C.; FEBO, M. Effects of cocaine on maternal behavior and neurochemistry. *Current Neuropharmacology*, v. 10, n. 1, p. 53-63, 2012.

NESTLER, E.J. Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in Pharmacological Science*, v. 25, n. 4, p. 210-218, 2004.

NESTLER, E.J. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, v. 47 suppl. 1, p. 24-32, 2004.

NETO, L.S. *Desenvolvimento de Substâncias Imunogênicas para o Tratamento de Dependentes Químicos da Cocaína*. Orientador: Prof. Dr. Ângelo de Fátima. Coorientador: Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia. 2018. Tese (Doutorado em Química – Química Orgânica) – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

NEVES, S.M.P.; ONG, F.M.P.; RODRIGUES, L.D.; SANTOS, R.A.; FONTES, R.S.; SANTANA, R.O. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p. il.

NI EWIESK, S. Maternal Antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses and possible vaccination strategies. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. 446, p. 1-15, 2014.

NORMAN, A.B.; NORMAN, M.K.; BUESING, W.R.; TABET, M.R.; TSIBULSKY, V.L.; BALL, W.J. The Effect of a Chimeric Human/Murine Anti-Cocaine Monoclonal Antibody on Cocaine Self-Administration in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 328, n. 3, p. 873-881, 2008.

OBER, R.J.; MARTINEZ, C.; LAI, X.; ZHOU, J.; WARD, E.S. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 30, p. 11076-81, 2004.

OEI, J.; ABDEL-LATIF, M.E.; CLARK, R.; CRAIG, F.; LUI, K. Short-term outcomes of mothers and infants exposed to antenatal amphetamines. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, v. 95, n. 1, p. 36-41, 2010.

OMS - Organização Mundial de Saúde (2014). Safety of immunization during pregnancy: a review of the evidence. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS)*. OMS, 2014.

ORSON, F.M.; KINSEY, B.M.; SINGH, R.A.K.; WU, Y.; KOSTEN, T.R. Vaccines for cocaine abuse. *Human vaccines*, v. 5, n. 4, p. 194-199, 2009.

PACHECO, L.D.; CONSTANTINE, M.M.; HANKINS, G.D.V. Physiological changes during pregnant. In: *Clinical Pharmacology During Pregnancy*. MATTISON, D.R. 1^a ed. Elsevier, 2013.

PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A.L.; ZAGO, C.A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, ID. 985646, p. 1-13, 2012.

PANI, P.P.; TROGU, E.; VECCHI, S.; AMATO, L. Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database of Systematic Review*. n. 12, art. n.: CD002950, 2011.

PATKAR, A.A.; HILL, K.P.; STERLING, R.C.; GOTTHEIL, E.; BERRETTINI, W.H.; WEINSTEIN, S.P. Serum prolactin and response to treatment among cocaine-dependent individuals. *Addiction Biology*, v. 7, n. 1, p. 45-53, 2002.

PAUL, H.A.; HALLAM, M.C.; REIMER, R.A. Milk collection in the rat using capillary tubes and estimation of milk fat content by creatinocrit. *Journal of Visualized Experiments*, n. 106, p. 1-6, 2015.

PEEKE, H.V.S.; DARK, K.A.; SALAMY, A.; SALFI, M.; SHAH, S.N. Cocaine exposure prebreeding to weaning: maternal and offspring effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 48, n. 2, p. 403-410, 1994.

PEREIRA, C.; PACAGNELLA, R.; PARPINELLI, M.; ANDREUCCI, C.; ZANARDI, D.; SOUZA, R.; ANGELINI, C.; SILVEIRA, C.; CECATTI, J. Drug use during pregnancy and its consequences: a nested case control study on severe maternal morbidity. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 40, n. 09, p. 518-526, 2018.

PEREIRA, R.L.G. Comparação de técnicas de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anti-cocaína tipo IgG em camundongos. 2019. Dissertação (Mestrado em Medicina Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

PIANCA, T.G.; REBOUÇAS, D.B.; MENEGON, G.L. Terapias Farmacológicas para os transtornos do uso de cocaína e crack. In: GARCIA, F.D. Manual de abordagem de dependências químicas. Centro Regional de Referência em Drogas (CRR-UFMG). Cap. 11, p. 151-170, 2014.

PIERCE, R.C.; BELL, K.; DUFFY, P.; KALIVAS, P.W. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 4, p. 1550-1560, 1996.

PLESSINGER, M.A.; WOODS, J.R.Jr. Maternal, placental, and fetal pathophysiology of cocaine exposure during pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 36, n. 2, p. 267-78, 1993.

PLESSINGER, M.A.; WOODS, J.R.Jr. Progesterone increases cardiovascular toxicity to cocaine in nonpregnant ewes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 163, n. 5, p. 1659–1664, 1990.

POGORELOV, V.M.; KAO, H.T.; AUGUSTINE, G.J.; WETSEL, W.C. Postsynaptic mechanisms render syn I/II/III mice highly responsive to psychostimulants. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 7, p. 453-465, 2019.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*, v. 12, n. 6, p. 509-517, 2011.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating Innate Immunity into Immunological Memory: implications for vaccine development. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 849-863, 2006.

RACICOT, K.; KWON, J.Y.; ALDO, P.; SILASI, M.; MOR, G. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 72, n. 2, p. 107-116, 2014.

RAMAKRISHNAN, M.; KINSEY, B.M.; SINGH, R.A.; KOSTEN, T.R.; ORSON, F.M. Hapten optimization for cocaine vaccine with improved cocaine recognition. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 84, n. 3, p. 354-363, 2014.

RAMAKRISHNAN, M.; MELO, F.A. de.; KINSEY, B.M.; LADBURY, J.E.; KOSTEN, T.R.; ORSON, F.M. Probing Cocaine-Antibody Interactions in Buffer and Human Serum. *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. 40518-40530, 2012.

RAO, H.; WANG, J.; GIANNETTA, J.; KORCZYKOWSKI, M.; SHERA, D.; AVANTS, B.B.; GEE, J.; DETRE, J.A.; HURT, H. Altered resting cerebral blood flow in adolescents with in utero cocaine exposure revealed by perfusion functional MRI. *Pediatrics*, v. 120, n. 5, e1245-1254, 2007.

REGIER, D.A.; FARMER, M.E.; RAE, D.S.; LOCKE, B.Z.; KEITH, S.J.; JUDD, L.L.; GOODWIN, F.K. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA*, v. 264, n. 19, p. 2511-2518, 1990.

REN, J.Q.; MALANGA, C.J.; TABIT, E.; KOSOFKY, B.E. Neuropathological consequences of prenatal cocaine exposure in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 22, n. 5-6, p. 309-320, 2004.

RESTREPO, C.S.; CARRILLO, J.A.; MARTÍNEZ, S.; OJEDA, P.; RIVERA, A.L.; HATTA, A. Pulmonary complications from cocaine and cocaine-based substances: imaging manifestations. *Radiographics*, v. 27, n. 4, p. 941-56, 2007.

RICHARDSON, G.A.; DAY, N.L.; McGAUHEY, P.J. The impact of prenatal marijuana and cocaine use on the infant and child. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 36, n. 2, p. 302-318, 1993.

RICHARDSON, G.A.; GOLDSCHMIDT, L.; LARKBY, C.; DAY, N.L. Effects of prenatal cocaine exposure on adolescent development. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 49, p. 41-48, 2015.

RICHARDSON, G.A.; HAMEL, S.C.; GOLDSCHMIDT, L.; DAY, N.L. The effects of prenatal cocaine use on neonatal neurobehavioral status. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 18, n. 5, p. 519-528, 1996.

RIVKIN, M.J.; DAVIS, P.E.; LEMASTER, J.L.; CABRAL, H.J.; WARFIELD, S.K.; MULKERN, R.V.; ROBSON, C.D.; ROSE-JACOBS, R.; FRANK, D.A. Volumetric MRI study of brain in children with intrauterine exposure to cocaine, alcohol, tobacco and marijuana. *Pediatrics*, v. 121, n. 4, p. 741-750, 2008.

ROBERT-GUROFF, M. IgG surfaces as an important component in mucosal protection. *Nature Medicine*, v. 6, n. 2, p. 129-130, 2000.

ROCHA, P.C.; ALVES, M.T.S.S.B e.; CHAGAS, D.C.; SILVA, A.A.M.; BATISTA, R.F.L.; SILVA, R.A. Prevalência e fatores associados ao uso de drogas ilícitas em gestantes da coorte BRISA. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 32, n. 1, e00192714, 2016.

RODNING, C.; BECKWITH, L.; HOWARD, J. Characteristics of attachment organization and play organization in prenatally drug-exposed toddlers. *Development and Psychopathology*, v. 1, n. 4, p. 277-289, 1989.

ROGIER, E.W.; FRANTZ, A.L.; BRUNO, M.E.C.; WEDLUND, L.; COHEN, D.A.; STROMBERG, A.J.; KAETZEL, C.S. Lessons from mother: long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut Microbes*, v. 5, n. 5, p. 663-668, 2014.

ROTH, M.; COSGROVE, K.; CARROLL, M. Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 6, p. 533-546, 2004.

ROWSON, S.A.; FOSTER, S.L.; WEINSHENKER, D.; NEIGH, G.N. Locomotor sensitization to cocaine in adolescent and adult female Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, v. 349, p. 158-162, 2018.

RUSH, C.R.; STOOPS, W.W. Agonist replacement therapy for cocaine dependence: a translational review. *Future Medical Chemistry*, v. 4, n. 2, p. 245-265, 2012.

SAKURAI, M.; WIRSCHING, P.; JANDA, K.D. Design and synthesis of a cocaine-diamide hapten for vaccine development. *Tetrahedron Letters*, v. 37, n. 31, p. 5479-5482, 1996.

SALAS-RAMIREZ, K.Y.; FRANKFUR, T.M.; ALEXANDER, A.; LUINE, V.N.; FRIEDMAN, E. Prenatal cocaine exposure increases anxiety, impairs cognitive function and increases dendritic spine density in adult rats: influence of sex. *Neuroscience*, v. 169, n. 3, p. 1287-1295, 2010.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; ARAKI, K.; AHMED, R. From Vaccines to Memory and Back. *Immunity*, v. 33, n. 4, p. 451-463, 2010.

SANSONE, F.; BALDINI, L.; CASNATI, A.; UNGARO, R. Calixarenes: from biomimetic receptors to multivalent ligands for biomolecular recognition. *New journal of chemistry*, v. 34, p. 2715-2728. 2010.

SARKAR, M.; DJULUS, J.; KOREN, G. When a cocaine-using mother wishes to breastfeed. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 27, n. 1, p. 1-2, 2005.

SASAKI, A.; CONSTANTINOF, A.; PAN, P.; KUPFERSCHMIDT, D.A.; MCGOWAN, P.O.; ERB, S. Cocaine exposure prior to pregnancy alters the psychomotor response to cocaine and transcriptional regulation of the dopamine D1 receptor in adult male offspring. *Behavioural Brain Research*, v. 265, p. 163-170, 2014.

SASO, A.; KAMPMANN, B. Maternal Immunization: nature meets nurture. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 1499, p. 1-21, 2020.

SAUVAIN, M.; RERAT, C.; MORETTI, C.; SARAVIA, E.; ARRAZOLA, S.; GUTIERREZ, E.; LEMA, A.M.; MUÑOZ, V. A study of the chemical composition of *Erythroxylum coca* var. *coca* leaves collected in two ecological regions of Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, n. 3, p. 179-191, 1997.

SCHEIBNER, V. Adverse effects of adjuvants in vaccines. *Nexus*, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2000.

SCHER, M.S.; RICHARDSON, G.A.; DAY, N.L. Effects of prenatal cocaine/crack and other drug exposure on electroencephalographic sleep studies at birth and one year. *Pediatrics*, v. 105, n. 1, p. 39-48, 2000.

SCHNEIDER, K.J.; DeCAPRIO, A.P. Covalent thiol adducts arising from reactive intermediates of cocaine biotransformation. *Chemical Research in Toxicology*, v. 26, n. 11, p. 1755-1764, 2013.

SCHROEDER, H.W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. 41-52, 2010.

SCHUBINER, H.; SAULES, K.K.; ARFKEN, C.L.; JOHANSON, C.E.; SCHUSTER, C.R.; LOCKHART, N.; EDWARDS A.; DONLIN, J.; PIHLGREN, E. Double-blind placebo-controlled trial of methylphenidate in the treatment of adult ADHD patients with comorbid cocaine dependence. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, v. 10, n. 3, p. 286-294, 2002.

SEDYKH, S.E.; BUNEVA, V.N.; NEVINSKY, G.A. Human milk IgGs contain various combinations of different antigen-binding sites resulting in multiple variants of their bispecificity. *PLoS One*, v. 7, n. 8, e42942, 2012.

SEIBENHENER, M.L.; WOOTEN, M.C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, n. 96, p. 1-6, 2015.

SHEN, X.; ORSON, F.M.; KOSTEN, T.R. Vaccines for drug abuse. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 91, n. 1, p. 60-70, 2012.

SHORTER, D.; KOSTEN, T.R. Novel pharmacotherapeutic treatments for cocaine addiction. *BMC Medicine*, v. 9, n. 119, p. 1-9, 2011.

SIEGRIST, C.A.; ASPINALL, R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 3, p. 185-194, 2009.

SILVA, M.C.; SILVA-ARAÚJO, A.; ABREU, S.; XAVIER, M.R.; MONTEIRO, L.S.; TAVARES, M.A. Effects of prenatal cocaine exposure on postnatal growth patterns of male Wistar rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 17, n. 4, p. 471-477, 1995.

SILVEIRA, G.O.; BELITSKY, I.T.; LODDI, S.; OLIVEIRA, C.D.R; ZUCOLOTO, A.D.; FRUCHTENGARTEN, L.V.; YONAMINE, M. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Science International*, v. 265, p. 22-28, 2016.

SIMISTER, N. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*, v. 21, n. 24, p. 3365-3369, 2003.

SINGER, L.; ARENDT, R.; FARKAS, K.; MINNES, S.; HUANG, J.; YAMASHITA, T. Relationship of prenatal cocaine exposure and maternal postpartum psychological distress to child developmental outcome. *Development and Psychopathology*, v. 9, n. 3, p. 473-489, 1997.

SINGER, L.T.; EISENGART, L.J.; MINNES, S.; NOLAND, J.; JEY, A.; LANE, C.; MIN, M.O. Prenatal cocaine exposure and infant cognition. *Infant Behavior and Development*, v. 28, n. 4, p. 431-444, 2005.

SINGER, L.T.; NELSON, S.; SHORT, E.; MIN, M.O.; LEWIS, B.; RUSS, S.; MINNES, S. Prenatal cocaine exposure: drug and environmental effects at 9 years. *The Journal of Pediatrics*, v. 153, n. 1, p. 105-111, 2008.

SITHISARN, T.; BADA, H.S.; DAI, H.; RANDALL, D.C.; LEGAN, S.J. Effects of perinatal cocaine exposure on open field behavior and the response to corticotropin releasing hormone (CRH) in rat offspring. *Brain Research*, v. 1370, p. 136-144, 2011.

SLIFKA, M.K.; AMANNA, I.J. Passive Immunization. *Plotkin'S Vaccines*, p. 84-95, 2018.

SMID, M.C.; METZ, T.D.; GORDON, A.J. Stimulant use in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 62, n. 1, p. 168-184, 2019.

SOMPAYRAC, L. How the Immune System Works. 5 ed. Wiley BLACKWELL, 2016.

STALEY, J.K. Neurochemistry of drug abuse. In: KARSH, S.B (Ed.). Drug abuse handbook. 3a ed. Nova York: CRC Press, 2006. Cap. 18, p. 429-558.

STRATHEARN, L.; MAYES, L.C. Cocaine addiction in mothers: potential effects on maternal care and infant development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1187, n.1, p. 172-183, 2010.

TEASDALE, S.; MORTON, A. Changes in biochemical tests in pregnancy and their clinical significance. *Obstetric Medicine*, v. 11, n. 4, p.160-170, 2018.

TELEMO, E.; HANSON, L.A. Antibodies in milk. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 1, n. 3, p. 243-249, 1996.

THOMPSON, B.L.; LEVITT, P.; STANWOOD, G. Prenatal cocaine exposure specifically alters spontaneous alternation behavior. *Behavioural Brain Research*, v. 164, n. 1, p. 107-116, 2005.

TOMLINSON, M.F.; BROWN, M.; HOAKEN, P.N.S. Recreational drug use and human aggressive behavior: a comprehensive review since 2003. *Aggression and Violent Behavior*, v. 27, p. 9-29, 2016.

TONKISS, J.; SHULTZ, P.L.; SHUMSKY, J.S.; BLEASE, S.J.; KEMPER, T.L.; GALLER, J.R. The effects of cocaine exposure prior to and during pregnancy in rats fed low or adequate protein diets. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 17, n. 5, p. 593-600, 1995.

TONKISS, J.; SHUMSKY, J.S.; SHULTZ, P.L.; ALMEIDA, S.S.; GALLER, J.R. Prenatal cocaine but not prenatal malnutrition affects foster mother-pup interactions in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v.17, n. 5, p. 601-608, 1995.

TOWERS, C.V.; PIRCON, R.A.; NAGEOTTE, M.P.; PORTO, M., GARITE, T.J. Cocaine intoxication presenting as preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, v. 81, n. 4, p. 545-547, 1993.

UNODC - Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime. World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8). 2019.

VALJENT, E.; BERTRAN-GONZALEZ, J.; AUBIER, B.; GREENGARD, P.; HERVÉ, D.; GIRAULT, J.A. Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 2, p. 401-415, 2010.

VALZACHI, M.C.; TEODOROV, E.; MARCOURAKIS, T.; BAILEY, A.; CAMARINI, R. Enhancement of behavioral sensitization, anxiety-Like behavior and hippocampal and frontal cortical CREB levels following cocaine abstinence in mice exposed to cocaine during adolescence. *Plos One*, v. 8, n. 10, e78317, 2013.

Van de PERRE, P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*, V. 21, N. 24, P. 3374-3376, 2003.

Van de VIJVER, K.K.; HOKKE, C.H.; Van REMOORTERE, A.; JACOBS, W.; DEELDER, A.M.; Van MARCK, E.A. Glycans of *Schistosoma mansoni* and keyhole limpet haemocyanin induce hepatic granulomas in vivo. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 8, p. 951-961, 2004.

Van den BERG, J.P.; WESTERBEEK, E.A.; BERBERS, G.A.; Van GAGELDONK, P.G.; Van der KLIS, F.R.; Van ELBURG, R.M. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, haemophilus influenzae type b, and Neisseria meningitidis serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 29, n. 9, p. 801-805, 2010.

VAUGHN, D.E.; BJORKMAN, P.J. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure*, v. 6, n. 1, p. 63-73, 1998.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG Subclasses and Allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 1-17, 2014.

VILELA, M.G.; DOS SANTOS JÚNIOR, J.L.; SILVA, J.G.C. e. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *FEMINA*, v. 35, n. 10, 2007.

WANG, Q.; SIMPAO, A.; SUN, L.; FALK, J.L.; LAU, C.E. Contribution of the active metabolite, norcocaine, to cocaine's effects after intravenous and oral administration in rats: pharmacodynamics. *Psychopharmacology*, v. 153, n. 3, p. 341-352, 2001.

WATANAVEERADEJ, V.; ENDY, T.P.; HO, C.; SIMASATHIEN, S.; VAUGHN, D.W.; KERDPANICH, A.; POLPRASERT, N.; NISALAK, A.; AREE, C.; SAMAKOSES, R. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, n. 2, p. 123-128, 2003.

WENDELL, A.D. Overview and epidemiology of substance abuse in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 56, n. 1, p.91-96, 2013.

WILTSHIRE, T.; ERVIN, R.B.; DUAN, H.; BOGUE, M.A.; ZAMBONI, W.C.; COOK, S.; CHUNG, W.; ZOU, F.; TARANTINO, L.M. Initial locomotor sensitivity to cocaine varies widely among inbred mouse strains. *Genes, Brain and Behavior*, v. 14, n. 3, p. 271-280, 2015.

WIMMER, M.E.; VASSOLER, F.M.; WHITE, S.L.; SCHMIDT, H.D.; SIDOLI, S.; HAN, Y.; GARCIA, B.A.; PIERCE, R. C. Impaired cocaine-induced behavioral plasticity in the male offspring of cocaine-experienced sires. *European Journal of Neuroscience*, v. 49, n. 9, p. 1115-1126, 2019.

YORDE, D.E.; SASSE, E.A.; WANG, T.Y.; HUSSA, R.O.; GARANCIS, J.C. Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clinical chemistry*, v. 22, n. 8, 1372-1377, 1976.

YOSHIDA, M.; CLAYPOOL, S.M.; WAGNER, J.S.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A.; ROOPENIAN, D.C.; LENCER, W.I.; BLUMBERG, R.S. Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells. *Immunity*, v. 20, n. 6, p. 769-783, 2004.

YU, Y.H.; LIN, K.I. Factors that regulate the generation of antibody-secreting plasma cells. *Advances in Immunology*, v. 131, p. 61-99, 2016.

YUMOTO, C.; JACOBSON, S.W.; JACOBSON, J.L. Fetal substance exposure and cumulative environmental risk in an African American cohort. *Child Development*, v. 79, n. 6, p. 1761-1776, 2008.

ZEPP, F. Principles of Vaccination. *Vaccine Design*, v. 1403, p. 57-84, 2016.

ZHAO, Q.; HOU, J.; CHEN, B.; SHAO, X.; ZHU, R.; BU, Q.; GU, H.; LI, Y.; ZHANG, B.; DU, C. Prenatal cocaine exposure impairs cognitive function of progeny via insulin growth factor II epigenetic regulation. *Neurobiology of Disease*, v. 82, p. 54-65, 2015.