

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Larissa Pires do Espírito Santo

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA UFMG-VAC-V4N2 NA PROTEÇÃO  
MATERNO-FETAL À EXPOSIÇÃO À COCAÍNA NO PERÍODO GESTACIONAL E  
PERINATAL**

Belo Horizonte

2023

Larissa Pires do Espírito Santo

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA UFMG-VAC4N2 NA PROTEÇÃO  
MATERNO-FETAL À EXPOSIÇÃO À COCAÍNA NO PERÍODO GESTACIONAL E  
PERINATAL**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia

Co-orientador: Dr. Paulo Sérgio de Almeida Augusto

Belo Horizonte - MG

2023

043

Espírito Santo, Larissa Pires do.

Avaliação da eficácia da vacina UFMG-VAC-V4N2 na proteção materno-fetal à exposição à cocaína no período gestacional e perinatal [manuscrito] / Larissa Pires do Espírito Santo. – 2023.

89 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia. Co-orientador: Dr. Paulo Sérgio de Almeida Augusto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Cocaína. 3. Gravidez. 4. Vacinas. I. Garcia, Frederico Duarte. II. Augusto, Paulo Sérgio de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA**

**LARISSA PIRES DO ESPIRITO SANTO**

Realizou-se, no dia 18 de maio de 2023, às 14:00 horas, Sala 239 - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a 261ª defesa de dissertação, intitulada *AValiação da Eficácia da Vacina UFMG-VAC-V4N2 na Proteção Materno-Fetal à Exposição à Cocaína no Período Gestacional e Perinatal*, apresentada por LARISSA PIRES DO ESPIRITO SANTO, número de registro 2021661215, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Frederico Duarte Garcia - Orientador (UFMG), Prof. Fabrício de Araújo Moreira (UFMG), Profa. Gisele Assis Castro Goulart (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 18 de maio de 2023.

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof. Frederico Duarte Garcia (Doutor)

Prof. Fabrício de Araújo Moreira (Doutor)

Profa. Gisele Assis Castro Goulart (Doutora)



Documento assinado eletronicamente por Frederico Duarte Garcia, Professor do Magistério Superior, em 18/05/2023, às 20:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabricio de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior, em 18/05/2023, às 20:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior, em 19/05/2023, às 05:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2306332 e o código CRC 1ABC4CF1.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, aos Orixás e aos guias que me acompanham, por iluminarem o meu caminho;

À minha mãe e a minha irmã, que representam tudo de mais valioso na minha vida;

Às mulheres da minha família: Marise, Cristiane, Ana Clara e os nossos pequenos;

Ao meu noivo Lucas, com quem compartilho a jornada da vida;

À minha amiga Karine, que compartilhou parte dessa trajetória comigo e que seguimos caminhando juntas mesmo que por estradas diferentes;

Aos meus orientadores Frederico Garcia e Maila de Castro, por confiarem a mim um projeto tão importante e por impulsionarem o nosso sucesso;

Aos professores Ângelo de Fátima e Gisele Goulart, pela parceria científica;

À Sordaini Caligorne, a quem devo um agradecimento especial por me apresentar à ciência e sempre fortalecer o meu crescimento. Minha orientadora de pesquisa e de vida;

À Ângela, o coração do nosso laboratório, fundamental em todos os projetos executados;

À banca examinadora, por aceitar contribuir com este trabalho;

Ao meu pequeno exército de grandes pesquisadores: Paulo, Raíssa, Bruna, Brian, Juliana e Simone;

Aos meus alunos de iniciação científica, com os quais espero ter contribuído para o crescimento, assim como contribuíram com o meu;

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Neurociências;

Aos colegas do Biotério, Marcelo, Flávia e Zé Carlos, pelo apoio nos cuidados com os animais;

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

## RESUMO

A dependência química à cocaína é um problema de saúde pública mundial para o qual não há tratamento específico disponível. Novas propostas terapêuticas estão sendo desenvolvidas visando o tratamento através da estimulação do sistema imunológico, induzindo a produção de anticorpos específicos para a cocaína. Uma nova aplicação desta estratégia terapêutica, é a prevenção da exposição intrauterina à droga. Esta estratégia mostrou-se eficaz com a vacina GNE-KLH. Desta forma, este trabalho visou avaliar a eficácia da imunização ativa com UFMG-VAC-V4N2 em ratas grávidas, na proteção materno-fetal da exposição pré-natal à cocaína. O estudo comparou a vacina com seu placebo em ratas adultas em idade reprodutiva. Estas foram inoculadas com 300 µL da formulação da vacina com a UFMG-V4N2 ou seu placebo, nos dias 0, 7, 21, 28 e 42, por via intramuscular. No dia 28 as ratas foram acasaladas e o acasalamento confirmado pela formação do tampão vaginal. Desde a confirmação do acasalamento cada rata recebeu diariamente uma dose de 20 mg/kg de solução de cocaína, até o parto, por via intraperitoneal. Foram avaliados o ganho de peso, a duração da gestação, o consumo hídrico e alimentar maternos, mortalidade materna, tamanho da ninhada e peso dos filhotes após o desmame. A dosagem de anticorpos anticocaína tipo IgG, no soro das mães e filhotes e no leite materno foi feita através do método de ELISA. O teste de campo aberto avaliou o efeito agudo na hiperlocomoção induzida por cocaína em mães durante a gestação e nos filhotes após o desmame. Os resultados demonstraram que a imunização ativa com a vacina UFMG-VAC-V4N2 não induziu a produção de anticorpos IgG anticocaína em ratas antes e durante a gestação e de maneira dependente, estes anticorpos também não foram quantificados na prole de ratas vacinadas e no leite materno. Não foram observadas diferenças estatísticas para as variáveis avaliadas nos desfechos gestacionais e pós-natais entre os grupos tratado e placebo, assim como os efeitos hiperlocomotores induzidos por cocaína. Após rever todo o método empregado, a ressonância magnética nuclear da molécula utilizada na pesquisa apontou pontos de degradação do lote da molécula utilizada na formulação. Estes resultados sugerem que a molécula UFMG-V4N2 ainda necessita de estudos mais específicos a respeito da sua estabilidade, o que impacta diretamente na eficácia e segurança da formulação vacinal. Assim, estudos de degradação forçada e o desenvolvimento de um método analítico indicador de estabilidade, constituem as próximas etapas essenciais para

que a UFMG-VAC-V4N2 possa avançar na cadeia regulatória dos estudos pré-clínicos e clínicos.

Palavras-chave: cocaína, exposição pré-natal, gestação, vacina anticocaína, UFMG-VAC-V4N2, estabilidade.

## **ABSTRACT**

Cocaine addiction is a worldwide public health problem for which there is no specific treatment available. New therapeutic proposals are being developed aiming at treatment through stimulation of the immune system, inducing the production of specific antibodies for cocaine. A new application of this therapeutic strategy is the prevention of intrauterine drug exposure. This strategy proved to be effective with the GNE-KLH vaccine. Thus, this work aimed to evaluate the effectiveness of active immunization with UFMG-VAC-V4N2 in pregnant rats, in maternal-fetal protection from prenatal exposure to cocaine. The study compared the vaccine with its placebo in adult rats of reproductive age. These were inoculated with 300  $\mu$ L of the vaccine formulation with UFMG-V4N2 or its placebo, on days 0, 7, 21, 28 and 42, intramuscularly. On day 28 the rats were mated and mating confirmed by vaginal plug formation. From confirmation of mating, each rat received a daily dose of 20 mg/kg of cocaine solution, until delivery, intraperitoneally. Weight gain, duration of gestation, maternal water and food intake, maternal mortality, litter size and pup weight after weaning were evaluated. The dosage of IgG anti-cocaine antibodies in the serum of mothers and puppies and in breast milk was performed using the ELISA method. The open field test evaluated the acute effect on cocaine-induced hyperlocomotion in dams during pregnancy and in pups after weaning. The results showed that active immunization with the UFMG-VAC-V4N2 vaccine did not induce the production of anti-cocaine IgG antibodies in rats before and during pregnancy and in a dependent manner, these antibodies were also not quantified in the offspring of vaccinated rats and in breast milk. No statistical differences were observed for the variables evaluated in gestational and postnatal outcomes between the treated and placebo groups, as well as cocaine-induced hyperlocomotor effects. After reviewing the entire method used, the nuclear magnetic resonance of the molecule used in the research pointed out points of degradation of the lot of the molecule used in the formulation. These results suggest that the UFMG-V4N2 molecule still requires more specific studies regarding its stability, which directly impacts the efficacy and safety of the vaccine formulation. Thus, forced degradation studies and the development of an analytical method that indicates stability are the next essential steps for UFMG-VAC-V4N2 to advance in the regulatory chain of pre-clinical and clinical studies.

Keywords: cocaine, prenatal exposure, pregnancy, anticocaine vaccine, UFMG-V4N2, stability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Mecanismo de ação dos anticorpos anticocaína.....	22
<b>Figura 2</b> - Calixarenos: estrutura geral .....	24
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da molécula UFMG-V4N2 .....	25
<b>Figura 4</b> - Cronograma experimental.....	33
<b>Figura 5</b> - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas diluídas em 1:200, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 mg/mL cocaína fixados em fase adsortiva.....	40
<b>Figura 6</b> - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína expressos em densidade óptica (D.O) em amostras de leite maternas diluídas em 1:200, dos grupos vacinado e placebo, no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva .....	42
<b>Figura 7</b> - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína expressos em densidade óptica (D.O) em amostras de filhotes diluídas em 1:200, dos grupos vacinado placebo, no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva .....	43
<b>Figura 8</b> - Ganho de massa corporal média, expressa em gramas (g), durante a gestação nos grupos vacinado e placebo .....	43
<b>Figura 9</b> - Ganho médio de peso, expresso em gramas (g), durante a gestação dos grupos vacinado e placebo .....	44
<b>Figura 10</b> - Tempo médio das gestações, expresso em dias, nos grupos vacinado e placebo.....	44
<b>Figura 11</b> - Número médio de filhotes nascidos vivos e no desmame nos grupos vacinado e placebo .....	45
<b>Figura 12</b> - Massa corporal média expressa em gramas (g), em filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo após o desmame .....	46
<b>Figura 13</b> - Média de consumo hídrico materno, expressos em mililitros (ml) nos períodos pré-gestacional e gestacional nos grupos vacinado e placebo .....	47
<b>Figura 14</b> - Média de consumo alimentar materno, expressos em gramas (g) nos períodos pré-gestacional e gestacional nos grupos vacinado e placebo .....	47
<b>Figura 15</b> - Distância total média percorrida e número médio de entradas no centro da caixa de teste em mães dos grupos vacinado e placebo .....	48
<b>Figura 16</b> - Distância total média percorrida e número médio de entradas no centro da caixa de teste em filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
*	Indica diferença estatística significativa
®	Marca registrada
TM	Marca comercial (do inglês <i>trade mark</i> )
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>Bovine serum albumin</i> )
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FcRn	Receptor neonatal Fc
GEQOB	Grupo de Pesquisas em Química Orgânica e Biológica
GNC	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anticocaína
GND	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anticocaína
GNE	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anticocaína
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kg	Quilograma
KLH	Hemocianina do molusco <i>Megathura crenulata</i>
L	Litro
m	Metros
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mM	Concentração micromolar (micromol por litro)
n	Número de animais por grupo experimental
nm	Nanômetros

NAVeS	Núcleo de Pesquisa em Vulnerabilidade à Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
UFMG-VAC- V4N2	Vacina derivada da molécula de calixareno
UI	Unidade Internacional
vs	versus
v	Volume

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Cocaína, gestação e período neonatal .....	18
1.2 Cocaína, infância, adolescência e repercussões na vida adulta .....	20
1.3 Estratégias imunológicas para tratamento da dependência química à cocaína .....	21
1.4 A vacina UFMG-VAC-V4N2 .....	23
1.5 Imunização e gestação .....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>29</b>
3.1.1 Animais experimentais .....	29
3.1.2 Drogas, fármacos e reagentes .....	29
<b>3.2 Método</b> .....	<b>30</b>
3.2.1 Etapa 1: Preparo do hapteno, molécula, formulação e reagentes.....	31
3.2.1.1 Síntese do hapteno GNE e molécula UFMG-V4N2	31
3.2.1.2 Formulação UFMG-VAC-V4N2	31
3.2.1.3 Conjugação GNE-BSA	31
3.2.1.4 Purificação do conjugado por coluna de dessalinização	32
3.2.1.5 Solução de cocaína	32
3.2.2 Etapa 2: Cronograma e protocolo experimental .....	33
3.2.2.1 Imunizações	33
3.2.2.2 Coleta de sangue	34
3.2.2.3 Ingestão hídrica e alimentar das mães	34
3.2.2.4 Acasalamento e período gestacional	34
3.2.2.5 Administração de cocaína	35

3.2.2.6 Coleta de leite materno	35
3.2.2.7 Teste comportamental	36
3.2.3 Etapa 3: Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) .....	36
3.2.3.1 Soluções	37
3.2.3.2 Etapa de fixação	38
3.2.3.3 Etapa de incubação das amostras	39
3.2.3.4 Etapa de revelação	39
3.2.4 Etapa 4: Análise da molécula UFMG-V4N2 .....	39
3.2.5 Etapa 5: Análise estatística .....	40
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Avaliação da eficácia da UFMG-VAC-V4N2 na produção de anticorpos anticocaína em ratas grávidas .....</b>	<b>40</b>
4.1.1 Títulos de anticorpos IgG anticocaína nas mães no protocolo de 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsorviva com amostras diluídas em 1:200.....	40
4.1.2 Títulos de anticorpos IgG anticocaína no leite materno .....	42
4.1.3 Títulos de anticorpos IgG anticocaína em filhotes.....	42
<b>4.2 Avaliação da eficácia da UFMG-VAC-V4N2 na atenuação dos desfechos gestacionais e neonatais induzidos por cocaína .....</b>	<b>43</b>
4.2.1 Ganho de massa corporal materno .....	43
4.2.2 Tempo de gestação, tamanho da ninhada, mortalidade materna .....	44
4.2.3 Peso médio dos filhotes após desmame .....	46
4.2.4 Ingestão hídrica e alimentar materna .....	46
4.2.5 Atividade locomotora materna em modelo de campo aberto .....	48
4.2.6 Atividade locomotora dos filhotes em modelo de campo aberto .....	48
<b>4.3 Análise da molécula UFMG-V4N2 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN).....</b>	<b>49</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>

<b>5.1 Produção de anticorpos IgG anticocaína nas mães e aquisição imunológica passiva pela prole .....</b>	<b>50</b>
<b>5.2 Desfechos gestacionais e pós-natais.....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Efeitos hiperlocomotores induzidos por cocaína .....</b>	<b>56</b>
<b>5.4 A vacina UFMG-VAC-V4N2 .....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE A – Quantificação de anticorpos IgG antiococaína pelo método de ELISA e suas variações .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO A – Certificado de análise da molécula UFMG-V4N2.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há algumas décadas o uso de drogas era um problema tipicamente masculino. No entanto, na última década, houve mundialmente um crescente consumo de drogas entre mulheres em idade fértil (PEREIRA *et al.*, 2018). O uso de cocaína é sabidamente um fator de risco para o desenvolvimento de complicações obstétricas e perinatais. Estas podem afetar a saúde materna, o desenvolvimento fetal, a saúde da criança no período neonatal, infância e adolescência e ainda repercutir em consequências na vida adulta de indivíduos expostos à esta substância durante a gestação (BADA *et al.*, 2007; ROA *et al.*, 2007), conforme mostram vários estudos descritos nos capítulos ulteriores.

A ausência de tratamentos específicos para a dependência de cocaína, contribui com as taxas de recaída nestas mulheres quando engravidam, dificultando a descontinuação do uso durante a gravidez (LATUSKIE *et al.*, 2018). Além da droga, o empobrecimento, a marginalização e o abandono familiar produzidos pela dependência química, aumentam a vulnerabilidade social destas mulheres, restringindo o acesso ao cuidado pré-natal de qualidade e assistência ao puerpério (BASTOS & BERTONI, 2014; LATUSKIE *et al.*, 2018; OEI *et al.*, 2010). Estes dois fatores alertam sobre a necessidade de novas alternativas de tratamento (LOCKNER *et al.*, 2015).

Atualmente não existe nenhum tratamento específico aprovado mundialmente pelas agências regulatórias para o transtorno por uso de cocaína (TUC cocaína) e os tratamentos farmacológicos convencionais disponíveis são empregados para controlar e minimizar os sintomas (PIANCA *et al.*, 2014) não atuando especificamente contra a cocaína. Desta forma, os estudos de novas estratégias terapêuticas que auxiliem o tratamento de TUC, são necessários.

Uma das abordagens terapêuticas mais promissoras que se encontra em estudo para o TUC é o uso de terapias imunológicas. Essas terapias utilizam plataformas para expor a cocaína ao sistema imunológico e, a partir do seu reconhecimento como antígeno, estimulam a produção de anticorpos específicos. Esses anticorpos capturam a droga na corrente sanguínea, impedindo ou reduzindo sua passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) e sua atuação em receptores no

sistema nervoso central (SNC) (FOX, 1997; KARILA *et al.*, 2011; KINSEY *et al.*, 2014; LOCKENER *et al.*, 2015).

Nos últimos dez anos, os grupos de pesquisa do professor Frederico Duarte Garcia, do Núcleo de Pesquisa de Vulnerabilidade e Saúde (NAVeS) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), do professor Ângelo de Fátima, coordenador do Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica (GEQOB) do Departamento de Química da UFMG, e a professora Gisele Assis Castro Goulart, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, têm se dedicado ao estudo e desenvolvimento de uma molécula e formulação farmacêutica anticocaína. Estudos pré-clínicos demonstraram a eficácia e segurança da molécula e da formulação em modelos animais murinos (ASSIS *et al.*, 2023; DA SILVA NETO ET AL., 2021; SOUZA, 2018) e primatas não humanos (SABATO *et al.*, 2023).

A eficácia de uma vacina anticocaína na proteção materno-fetal à exposição pré-natal à cocaína, foi demonstrada pela primeira vez pelo grupo NAVeS, com o imunoc conjugado GNE-KLH (De ALMEIDA AUGUSTO, *et al.*, 2021). Dessa forma, o presente estudo propôs avaliar essa aplicação para a vacina UFMG-VAC-V4N2.

### **1.1 Cocaína, gestação e período neonatal**

O uso de cocaína durante a gestação é um fator de risco significativo na saúde materna e fetal. Os efeitos da substância podem ser mais graves em decorrência das alterações do metabolismo materno durante a gestação, que retardam a metabolização da droga, prolongando o tempo de ação (Dos SANTOS *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018).

As consequências maternas compreendem um maior risco para o descolamento prematuro de placenta, de abortos espontâneos, de hipertensão, de isquemia miocárdica e infarto, de insuficiência renal, de ruptura hepática, de isquemia cerebral e morte (ADDIS *et al.*, 2001; CAMARGO & MARTINS, 2014; KUCZKOWSKI, 2007; SMID *et al.*, 2019). Os efeitos psicológicos agudos da cocaína incluem a ansiedade, a agressividade, a paranoia ou as alucinações, a irritabilidade, a insônia e a agitação (MINNES *et al.*, 2012). Já os sintomas do uso crônico de cocaína envolvem

queixas somáticas como os transtornos alimentares, a ansiedade, a depressão, o maior risco de problemas de saúde física e mental, incluindo a dor corporal e as percepções gerais de saúde (BECKWITH *et al.*, 1999; FALCK *et al.*, 2002), mesmo 10 anos após o parto (MINNES *et al.*, 2012).

As consequências fetais da exposição pré-natal à cocaína são diversas. Estudos farmacocinéticos mostram que, devido às suas propriedades lipofílicas, a cocaína atravessa com facilidade a barreira placentária e a barreira hematoencefálica e podendo induzir efeitos adversos no feto de maneira direta e indireta (BEHNKE & SMITH, 2013). De maneira direta, durante o período gestacional, a cocaína pode interferir no desenvolvimento fetal, incluindo crescimento e/ou maturação anormais, modificações e modulações de neurotransmissores e seus receptores e alterações da organização cerebral (BEHNKE & SMITH, 2013; HARVEY, 2004). Outros desfechos como a prematuridade, redução da idade gestacional, baixo peso e comprimento ao nascer, bem como perímetro cefálico reduzido são frequentemente associados à exposição pré-natal à cocaína (ADDIS *et al.*, 2001; Dos SANTOS *et al.*, 2018; GOUIN *et al.*, 2011; McMURRAY *et al.*, 2008;). Os efeitos indiretos estão associados a alterações na nutrição fetal, seja pelas alterações hemodinâmicas provocadas pela cocaína que podem reduzir o aporte de oxigênio e nutrientes ao feto, ou por alterações no autocuidado de saúde materna. Como alterações hemodinâmicas pode-se citar: o aumento da pressão sanguínea arterial materna, redução do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo intrauterino e placentário (GIOVANNI & MARCHETTI, 2012). Como exemplos de alterações no autocuidado de saúde materna temos a má nutrição, redução dos cuidados de saúde, aumento da exposição à violência, associação com outras drogas, risco de doença mental e infecções (BEHNKE & SMITH, 2013).

A amamentação é um relevante fator protetivo pós-natal, sendo fortemente recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Ela é fundamental para saúde materna e, principalmente, do recém-nascido, visto os inúmeros benefícios nutricionais, imunológicos e psicológicos (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005). Apesar dos benefícios, o uso de drogas durante a gestação e no período pós-natal imediato leva a questionamentos quanto à segurança da amamentação, uma vez que as drogas de abuso são transferidas para o leite materno e podem agir nos lactentes. A maioria das drogas de

abuso demonstraram ter algum efeito adverso sobre o recém-nascido durante o período de amamentação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005). A cocaína, se acumula no leite materno, devido à sua lipofilia, podendo ocasionar ao recém-nascido intoxicação, irritabilidade, vômitos, diarreia, tremores e convulsões (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001; BEHNKE & SMITH, 2013; HOWARD & LAWRENCE, 1998).

## **1.2 Cocaína, infância, adolescência e repercussões na vida adulta**

A exposição à cocaína durante o desenvolvimento do sistema nervoso pode resultar em mudanças permanentes na morfologia e fisiologia cerebrais, que podem afetar as respostas a desafios ambientais e/ou farmacológicos ao longo da vida. Isto pode tornar as crianças expostas à cocaína durante a gestação ou à amamentação mais vulneráveis no futuro (BEHNKE & SMITH, 2013; KELLER & SNYDER-KELLER, 2000). As interferências no sistema nervoso durante a neurogênese, podem afetar o desenvolvimento de estruturas envolvidas com a atenção e o funcionamento executivo, além de funções neurocomportamentais, tais como memória, regulação comportamental, processamento cognitivo e de aprendizagem. (BADA *et al.*, 2007; BADA *et al.*, 2011; BEHNKE & SMITH, 2013; CARMODY *et al.*, 2011). O desenvolvimento de fala e linguagem, durante a infância também podem ser comprometidos (BUCKINGHAM-HOWES *et al.*, 2013). No ambiente escolar, foram observados maiores índices de desatenção, hiperatividade, comportamento agressivo e impulsivo entre crianças expostas à cocaína na gravidez do que seus pares (MINNES *et al.*, 2010).

Na adolescência, o comportamento é o fator mais provável de ser afetado (RICHARDSON *et al.*, 2015). Em estudos de imagem, o aumento volumétrico da amígdala e da ínsula foi observado em adolescentes expostos à cocaína durante a gestação. Essas estruturas cerebrais são críticas para o processamento da emoção e sua associação ao comportamento (RAO *et al.*, 2007). Adolescentes expostos à cocaína na gestação frequentemente apresentam trajetórias comportamentais problemáticas (RICHARDSON *et al.*, 2015), além de piora do estado geral do humor (MINNES *et al.*, 2010). Os efeitos observados na infância podem perdurar durante a

adolescência, predizendo projeções do comportamento na vida adulta (BADA *et al.*, 2007; RICHARDSON *et al.*, 2015). A exposição pré-natal à cocaína aumenta a probabilidade do abuso de drogas no futuro e o risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas tais como depressão, transtornos de ansiedade, esquizofrenia e doenças neurodegenerativas (BADA *et al.*, 2007; KELLER & SNYDER-KELLER, 2000; RAO *et al.*, 2007).

### **1.3 Estratégias imunológicas para tratamento da dependência química à cocaína**

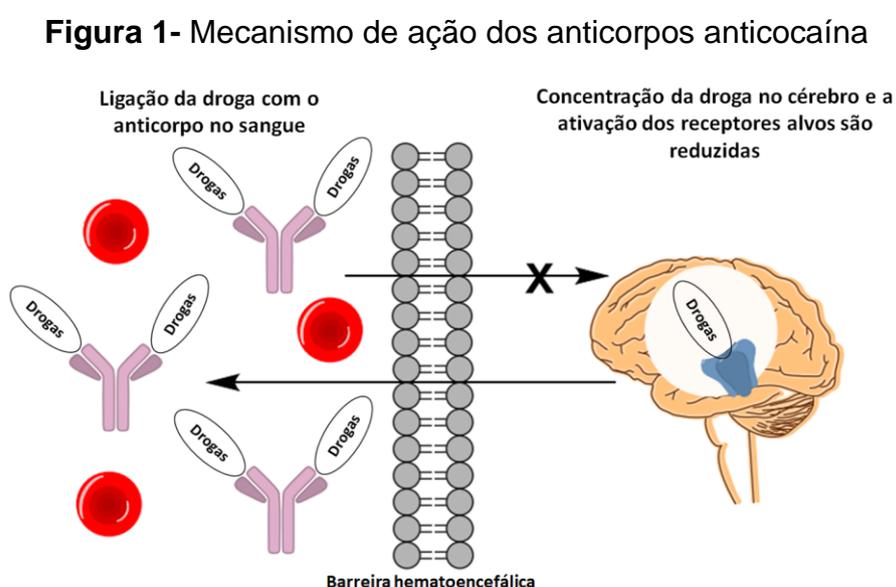
Os estudos de propostas imunológicas antidrogas iniciaram em 1970 contra nicotina, metanfetamina, oxicodona e heroína (HEEKIN *et al.*, 2017). Somente 20 anos depois os primeiros estudos de vacinas contra a cocaína foram publicados (CARRERA *et al.*, 1995; FOX *et al.*, 1996). O sucesso de uma vacina antidroga está diretamente relacionado a alguns fatores importantes tais como: o título, a afinidade, a especificidade e a avidéz dos anticorpos induzidos contra a molécula de interesse. Para alcançar esses parâmetros fundamentais, é indispensável que o processo de apresentação do antígeno seja efetivo (MORENO & JANDA, 2009).

Os desafios do desenvolvimento de uma estratégia imunológica contra a cocaína se iniciam na própria droga de abuso. Estas são, quase sempre, moléculas de baixo peso molecular, de baixa complexidade química e, portanto, de pouca imunogenicidade. Essas propriedades as classificam como um haptenos, ou seja, que por si só, não são capazes de estimular mecanismos de reconhecimento imunológico e produção de anticorpos de forma efetiva (MORENO & JANDA, 2009; KINSEY *et al.*, 2010; SOMPAYRAC, 2016). Para tornar a cocaína um potencial imunógeno, de forma a estimular o sistema imune de maneira eficaz, resultando na produção de anticorpos, faz-se necessário conjugá-la a uma substância carreadora de alto peso molecular e sabidamente imunogênica (BREMER & JANDA, 2017).

Desta forma, para se tornar imunogênica, a cocaína precisa primeiro ser ligada a uma cadeia de carbonos numa terminação que permita sua conjugação com uma molécula de grande peso molecular. Vários haptenos, foram desenvolvidos para estudos de imunogenicidade da cocaína, tais como o GNE, o GNC, o GND, o GNT e a succinil-norcocaína (CAI *et al.*, 2013; KIMISHIMA *et al.*, 2016). Essas modificações

na estrutura química da cocaína permitem que plataformas de diversas naturezas químicas sejam acopladas a ela, além de proporcionar mais estabilidade química à sua estrutura (CAI *et al.*, 2013). Nessas plataformas, o hapteno é conjugado ao carreador formando um complexo hapteno-carreador. O complexo hapteno-carreador é associado aos adjuvantes em uma formulação, de forma a potencializar a imunogenicidade da vacina, seu reconhecimento imunológico e induzir a produção de anticorpos específicos contra o carreador e o hapteno de interesse (BREMER & JANDA, 2017).

Uma vez que a imunização contra a cocaína ocorre, o sistema imune passa a produzir anticorpos anticocaína, que na corrente sanguínea, são capazes de capturar a cocaína, formando um complexo cocaína-anticorpo. Este complexo de alto peso molecular reduz a passagem da droga pela BHE, evitando a ligação aos seus receptores alvo no cérebro e consequentemente não produz seus efeitos típicos no SNC (**Figura 1**). Além do mecanismo de captura, os anticorpos anticocaína também mostraram ter uma ação catalítica para cocaína. Neste mecanismo, os anticorpos aceleram a degradação da cocaína em metabólitos inativos, aumentando a velocidade de eliminação da droga ativa (BRIMIJOIN *et al.*, 2013; CAI & JANDA, 2017; HEEKIN *et al.*, 2017; KINSEY *et al.*, 2010; WENTHUR).



Fonte: Adaptado de Bremer & Janda, (2017).

Os mecanismos de ação da vacina atuam reduzindo a disponibilidade de cocaína, o que pode resultar em uma atenuação dos seus efeitos no usuário. Isso pode ser percebido como uma redução na intensidade dos efeitos reforçadores da droga, e há evidências de que a imunização pode ajudar a prevenir a recaída após a exposição posterior à cocaína (FOX, 1997; HANEY *et al.*, 2010).

#### 1.4 A vacina UFMG-VAC-V4N2

Até o momento, as propostas de vacinas desenvolvidas e descritas para o tratamento da dependência química à cocaína utilizaram proteínas como estruturas carreadoras dos haptenos. Destas proteínas, destacam-se a albumina sérica bovina (BSA) acoplada à cocaína (FOX *et al.*, 1996), a hemocianina do molusco de *Megathura crenulata* (KLH) acoplada ao GNC (CARRERA *et al.*, 1995), proteína de adenovírus acoplada ao GNE (KOOB *et al.*, 2012) e toxina de cólera acoplada à succinil norcocaína, sendo esta última a única proposta que avançou aos ensaios clínicos I e II até o momento (KOSTEN *et al.*, 2002; KOSTEN *et al.*, 2014; MARTELL *et al.*, 2005).

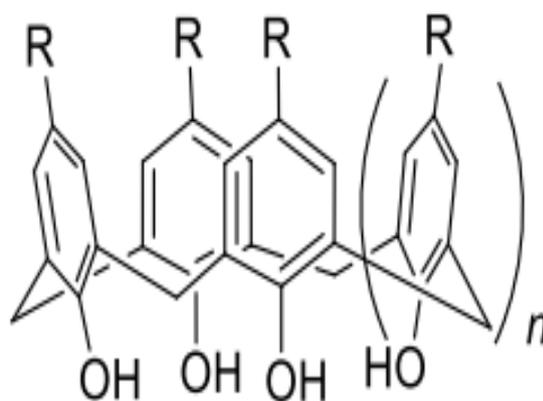
Por também serem imunogênicas, as proteínas carreadoras podem induzir a produção de anticorpos contra elas ou na exposição dos haptenos produzir anticorpos antidroga de baixa afinidade, reduzindo a eficiência da imunização (GERACI *et al.*, 2008). As moléculas sintéticas, apesar de serem menos imunogênicas quando comparadas aos carreadores biológicos, apresentam maior segurança e potencial eficácia na produção de anticorpos de alta afinidade. Isto porque o componente de interesse é ligado em posições determinadas, e sendo exposto pelas células expositoras de antígeno da melhor forma possível. Isto reduz a possibilidade de reações cruzadas e de estimulações imunes desnecessárias (ZHANG & ULERY, 2018), além de favorecer a estabilidade da formulação final (NASEER *et al.*, 2017).

No desenvolvimento de vacinas antidrogas, os estudos e a seleção das moléculas carreadoras capazes de induzir a produção de anticorpos específicos de maneira eficaz e segura, é uma etapa essencial para garantir a eficácia do tratamento na dependência química à cocaína (BREMER & JANDA, 2017; ORSON *et al.*, 2009).

Diante do sucesso limitado das vacinas em estudo (KOOB *et al.*, 2011), novas alternativas foram propostas.

Os calixarenos são macrociclos que possuem uma conformação com cavidades que permitem que íons e pequenas moléculas sejam incluídas/acopladas à plataforma, além da capacidade de formar complexos com moléculas maiores (De FÁTIMA, 2009; VAREJÃO, De FÁTIMA & FERNANDES, 2013). Conforme ilustrado na **Figura 2**, os calixarenos apresentam vantagens como: baixa toxicidade, alta estabilidade química e térmica, facilidade de síntese e funcionalização (SANSONE *et al.*, 2010; NASEER *et al.*, 2017). Seu potencial para atuar como plataforma de compostos biologicamente ativos e suas aplicações em atividades biológicas como antivirais, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas, faz com que venham sendo amplamente avaliados no desenho de novos agentes terapêuticos (De FÁTIMA, 2009; GERACI *et al.*, 2008; NASEER *et al.*, 2017).

**Figura 2** - Calixarenos: estrutura geral

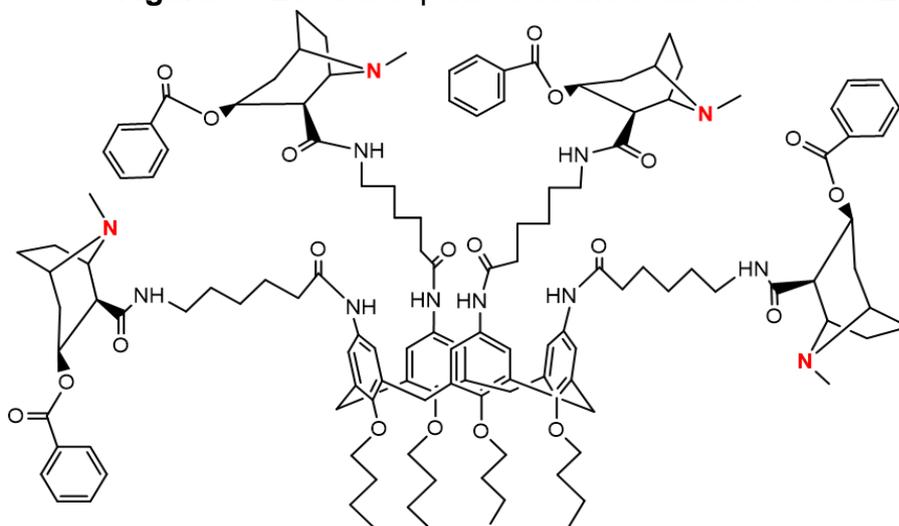


Fonte: De FÁTIMA *et al.* (2009).

A nova proposta de vacina anticocaína compreende uma molécula inédita, totalmente sintética, produzida a partir de quatro moléculas do hapteno de cocaína (GNE) acopladas à plataforma do calixareno (**Figura 3**). Dentre os haptenos disponíveis, o GNE foi eleito para compor a molécula, por apresentar maior tempo de meia-vida sérica, o que contribui para a imunogenicidade, induzindo maiores concentrações de anticorpos (LOWELL *et al.*, 2020). A partir desse acoplamento, o

grupo de pesquisa do NAVEs sintetizou e patenteou a molécula denominada UFMG-V4N2 (DA SILVA NETO ET AL., 2021; MAIA, 2018).

**Figura 3** - Estrutura química da molécula UFMG-V4N2



Fonte: Adaptado de Neto (2017).

Vacinas destinadas para uso em humanos devem atender a uma série de normas de agências regulatórias nacionais e internacionais. Dentre as exigências estão os estudos pré-clínicos de eficácia e segurança em mais de uma espécie animal (ANVISA, 2013; WHO, 2013). A UFMG-V4N2 mostrou eficácia em modelo murino, reduzindo a passagem de cocaína pela BHE em um estudo farmacocinético (DA SILVA NETO ET AL., 2021), além de apresentar segurança em ensaio de citotoxicidade e toxicidade *in vitro* e *in vivo* (SOUZA, 2018). A partir dos estudos citados, uma formulação farmacêutica foi desenvolvida utilizando excipientes regularmente aprovados para uso em humanos, que atendem às exigências das agências regulatórias. Denominada UFMG-VAC-V4N2, a formulação induziu produção de anticorpos anticocaína com potencial para reduzir a passagem da droga pela BHE em camundongos (ASSIS *et al.*, 2023). A segurança, eficácia e toxicidade da UFMG-VAC-V4N2 foi avaliada em primatas não humanos e nenhum efeito adverso ou grave local ou sistêmico foi observado (SABATO *et al.*, 2023).

## 1.5 Imunização e gestação

A imunização materna é uma estratégia eficaz de transferência de imunidade ao feto para uma variedade de doenças. Ela tem o potencial de reduzir substancialmente a morbidade e a mortalidade por doenças infecciosas após o nascimento (ABU-RAYA *et al.*, 2020). Uma vez transferidos ao feto passivamente por via placentária e amamentação, os anticorpos da mãe se ligam aos agentes patógenos e acionam o sistema imune da criança (DINIZ & FIGUEIREDO, 2014; PALMEIRA & SAMPAIO, 2016). Com base na imunidade mediada pelo sistema imune materno, as estratégias de vacinação materna durante a gravidez são frequentemente discutidas (ALBRECHT & ARCK, 2020).

O mecanismo de transferência placentária de anticorpos envolve um isotipo de imunoglobulina (Ig) dominante - a imunoglobulina G (IgG) - e suas subclasses, que representam a maior proporção das imunoglobulinas encontradas no feto. A IgG começa a ser transferida no final do primeiro trimestre, aumentando com a progressão da gravidez e atinge maior concentração no terceiro trimestre (ABU-RAYA *et al.*, 2020; SIMISTER, 2003), período em que os níveis deste anticorpo podem ultrapassar os níveis de concentração maternos (FOUDA *et al.*, 2018; LOZANO *et al.*, 2018) e confere imunidade ao recém-nascido até 6 meses após o nascimento (PALMEIRA *et al.*, 2012). Visto que a maior taxa de transferência placentária de anticorpos ocorre nas últimas semanas de gestação, a prematuridade - que representa uma das complicações adversas pela exposição pré-natal à cocaína - pode afetar a obtenção passiva de proteção imunológica. Recém-nascidos prematuros apresentam níveis de IgG significativamente mais baixos quando comparados a recém-nascidos a termo (LOZANO *et al.*, 2018; Van Den BERG *et al.*, 2010).

O mecanismo de amamentação fornece proteção eficiente logo após o nascimento e suplementa passivamente o sistema imunológico do recém-nascido. Esse mecanismo transfere todos os isotipos de imunoglobulinas, incluindo IgG e IgM e predominantemente a IgA, principal isotipo que confere imunidade às mucosas, impedindo a aderência de agentes infecciosos aos tecidos (DEMERS-MATHIEU *et al.*, 2018; PALMEIRA *et al.*, 2012). Além da proteção passiva, o leite materno tem efeito

imunomodulador ativo, promovendo a homeostase da barreira intestinal e a maturação do microbioma (SASO & KAMPMANN, 2020).

Visando antígenos específicos, a imunização materna pode aumentar as concentrações de anticorpos, potencializar a transferência e, conseqüentemente, o grau de imunidade passiva do recém-nascido (ALBRECHT & ARCK, 2020; FOU DA *et al.*, 2018; SASO & KAMPMANN, 2020). Semelhante à IgG induzida por antígenos infecciosos, os anticorpos IgG induzidos por vacina também são eficientemente transferidos através da placenta (FOUDA *et al.*, 2018). A eficácia de uma vacina anticocaína na proteção materno-fetal à exposição à cocaína foi demonstrada pela primeira vez em um estudo conduzido por De Almeida Augusto *et al.* (2021), com o hapteno de cocaína (GNE) acoplado à molécula carreadora hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) e adjuvante de Freund na formulação, evidenciando a eficácia desse conjugado (GNE-KLH), na indução de produção de anticorpos IgG e IgM anticocaína em ratas grávidas, atenuando os efeitos da exposição pré-natal e pós-natal à cocaína. Tais anticorpos foram encontrados também na prole de mães vacinadas e no leite materno.

Visando novas aplicações da vacina anticocaína e com base nos resultados obtidos com o imunoconjugado GNE-KLH em ratas grávidas, o presente estudo compreende um protocolo experimental pré-clínico com objetivo de avaliar a hipótese de que a imunização ativa com a formulação UFMG-VAC-V4N2 promove proteção materno-fetal dos efeitos da exposição pré-natal à cocaína.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a eficácia da vacina UFMG-VAC-V4N2 na proteção materno-fetal dos efeitos da exposição à cocaína no período gestacional e pós-natal imediato.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Quantificar anticorpos IgG anticocaína induzidos pela vacina UFMG-VAC4N2 em ratas grávidas;
2. Verificar a aquisição passiva de anticorpos IgG anticocaína em filhotes após o desmame;
3. Verificar a presença de anticorpos IgG anticocaína no leite materno;
4. Avaliar a eficácia dos anticorpos anticocaína na atenuação dos possíveis efeitos adversos gestacionais da exposição à cocaína, como:
  - A. Menor ganho de peso na gestação;
  - B. Menor consumo alimentar e maior consumo hídrico na gestação;
  - C. Redução do tamanho médio da ninhada;
  - D. Maior taxa de mortalidade materna;
  - E. Menor ganho de peso dos filhotes após o desmame;
5. Avaliar a eficácia dos anticorpos anticocaína na atenuação dos efeitos comportamentais da exposição à droga nas ratas durante a gestação e nos filhotes imediatamente após o desmame.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A eficácia da vacina UFMG-VAC-V4N2 foi avaliada por meio de ensaios imunológicos de quantificação de anticorpos IgG anticocaína dosados no soro do sangue de mães e filhotes e no soro do leite materno, análises comportamentais das mães e dos filhotes e avaliação de parâmetros gestacionais e neonatais. O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais - CEUA, inscrito sob protocolo CEUA 214/2021.

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Animais experimentais

Foram utilizadas 8 ratas fêmeas da espécie *Sprague Dawley*, com no mínimo 8 semanas de idade, que corresponde ao início da idade reprodutiva e com massa corporal média de 230 g e 4 machos com massa média de 350 g, adquiridos da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Durante o estudo, os animais permaneceram no Centro de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UFMG, em ambiente com temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 12 horas de ciclo claro/escuro, mantidos em duplas em caixa de propileno de 60 x 50 x 22 cm forradas com maravalha, com ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em dois grupos:

1. **Grupo Vacinado:** Compreende um grupo de 4 animais administrados com a formulação contendo a molécula UFMG-V4N2;
2. **Grupo Placebo:** Compreende um grupo de 4 animais administrados com a formulação sem a molécula UFMG-V4N2;

Como um controle adicional do estudo, visando uma referência do impacto da vacinação nas ratas grávidas, foi estabelecido um grupo de amostras que compreendeu um conjunto de 4 amostras de soro de ratas imunizadas no mesmo protocolo em estudos anteriores.

O número de animais deste experimento e todo o protocolo experimental que será descrito, foi planejado para ser executado em dois blocos distintos com 8 fêmeas por bloco.

#### 3.1.2 Drogas, fármacos e reagentes

- Cloridrato de cocaína – Inibidor da recaptação de catecolaminas, usado para produção do hapteno GNE e para avaliação do comportamento motor dos animais, obtida por doação da Polícia Federal e purificada no GEQOB – UFMG;

- Solução salina estéril 0,9% p/v (Sanobiol<sup>®</sup>) – Veículo para injeção de cocaína;
- GNE (sintetizada pelo GEQOB – UFMG) – Hapteno derivado da cocaína;
- GNE-BSA (sintetizada pelo NAVeS – UFMG) – Conjugado utilizado para sensibilização das placas de ELISA para dosagem de anticorpos anticocaína;
- Albumina sérica bovina (BSA - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) – Proteína de soro bovino utilizada como carreador de hapteno e componente do tampão de amostras no teste de ELISA;
- Anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina dirigido contra a Imunoglobulina G (IgG) - (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) – Ligante do anticorpo primário para o ELISA;
- Substrato Sigmafast<sup>™</sup> p-Nitrophenyl (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) - Reagente de coloração para o ELISA;
- Ocitocina sintética (UCB/VET<sup>®</sup>, Brasil) – Estimulante de lactação;
- Cloridrato de xilazina (União Química<sup>®</sup>, Brasil) – Coadjuvante de anestesia;
- Cloridrato de cetamina (União Química<sup>®</sup>, 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) - (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>);
- 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) - (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>);

### 3.2 Método

Os métodos aplicados e desenvolvidos no presente trabalho, serão descritos nas seguintes etapas:

- **Etapa 1:** Síntese do hapteno GNE e da molécula UFMG-V4N2, preparo da formulação UFMG-VAC-V4N2 e reagentes;
- **Etapa 2:** Cronograma e protocolo de experimentação;
- **Etapa 3:** Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA);
- **Etapa 4:** Análise da molécula UFMG-V4N2;

- **Etapa 5:** Análise estatística.

### 3.2.1 Etapa 1: Preparo do hapteno, molécula, formulação e reagentes

#### 3.2.1.1 Síntese do hapteno GNE e molécula UFMG-V4N2

O hapteno GNE foi sintetizado e acoplado à plataforma do calixareno conforme protocolo desenvolvido (DA SILVA NETO ET AL., 2021), finalizando a síntese da molécula UFMG-V4N2, que posteriormente foi adicionada aos excipientes e adjuvantes que compõem a formulação UFMG-VAC-V4N2, conforme protocolo descrito por Assis *et al.* (2023) e detalhado a seguir.

#### 3.2.1.2 Formulação UFMG-VAC-V4N2

A formulação da vacina compreendeu uma suspensão de  $6,74 \times 10^{-5}$  mg/mL da molécula UFMG-V4N2, sintetizada e fornecida pelo grupo de pesquisa, 10 mg/mL de álcool etílico (Merck®, Alemanha), 120 mg/mL de propilenoglicol (Croda®, NJ, EUA), 180 mg/mL de polietilenoglicol 300 (Croda®, NJ, EUA), 0,05 mg/mL de polissorbato 80 (Croda®, NJ, EUA), 100 mg/mL de fosfato de alumínio (Croda®, Dinamarca) e água. Todos os excipientes eram de grau farmacêutico e aprovados para uso parenteral em humanos. As concentrações utilizadas também estão de acordo com os requisitos regulamentares (ASSIS *et al.*, 2023).

#### 3.2.1.3 Conjugação GNE-BSA

A conjugação do carreador proteico BSA ao hapteno GNE seguiu o protocolo descrito no kit IMJECT® EDC Carrier Protein Spin (Thermo Fisher Scientific®, Illinois, USA). Para obtenção do conjugado GNE-BSA, quatro soluções foram preparadas em frascos individuais:

- **Solução 1:** 2 mg do hapteno GNE dissolvidos em 450 µL de tampão de conjugação;

- **Solução 2:** 2 mg da proteína de conjugação (BSA) dissolvidos em 200  $\mu$ L de água ultrapura produzindo uma solução de concentração de 10 mg/ml;
- **Solução 3:** preparada a partir da mistura das **soluções 1 e 2**;
- **Solução 4:** 10 mg de 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDC) dissolvidos em 1 ml de água ultrapura e adicionados à **Solução 3** para produção do conjugado GNE-BSA, que permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 2 horas.

#### 3.2.1.4 Purificação do conjugado por coluna de dessalinização

A purificação do conjugado preparado acima, foi feita pelo método cromatográfico utilizando coluna de dessalinização Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific®, Illinois, USA) de 5 ml. Esse processo foi importante para que os reagentes usados no preparo da conjugação fossem separados e somente o conjugado de interesse fosse obtido.

O conteúdo da coluna foi levemente homogeneizado por agitação manual e removido por centrifugação a 1.000 x g por 2 min. A coluna foi submetida a 3 etapas de lavagem com 1 ml de tampão de purificação e à centrifugação em cada lavagem, nos mesmos parâmetros citados anteriormente. Transcorrida as etapas de lavagem, a **Solução 4** foi adicionada lentamente à coluna que, novamente, foi centrifugada a 1.000 x g por 2 min, coletando-se o conteúdo em um tubo de polipropileno de 15 ml. Alíquotas de 175  $\mu$ L do conteúdo obtido foram separadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml e armazenadas a - 20°C para uso posterior.

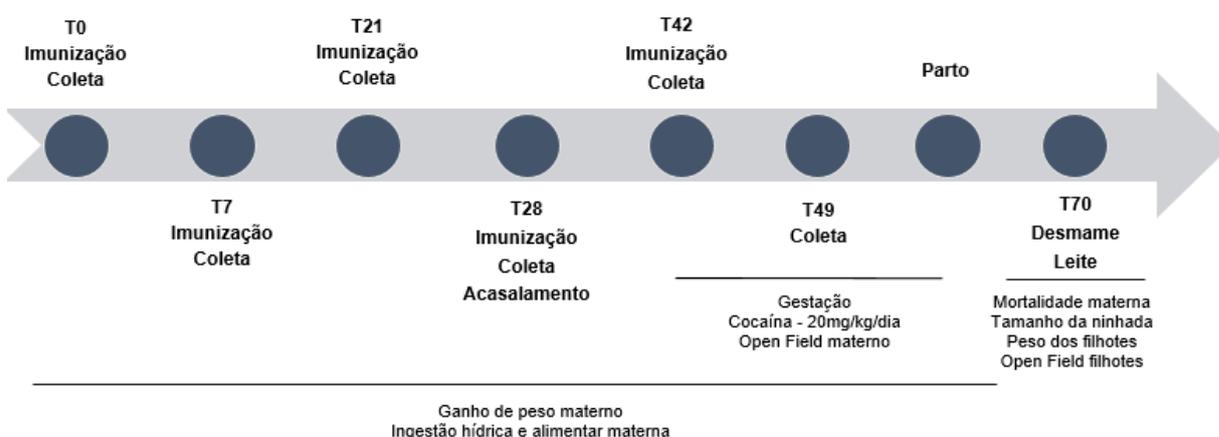
#### 3.2.1.5 Solução de cocaína

As amostras de cocaína foram legalmente cedidas pela 1ª Vara de Tóxicos do Tribunal de Justiça do Estado de Minas Gerais, conforme ofícios 14/2019; 60/2019 e 191/2019 e purificadas (DA SILVA NETO ET AL., 2021; MAIA, 2018). O preparo da solução procedeu-se dissolvendo 40 mg da droga em 2 ml de solução salina estéril, de modo a obter-se uma solução na concentração de 20 mg/ml.

### 3.2.2 Etapa 2: Cronograma e protocolo experimental

O cronograma e protocolo experimental seguiram os protocolos de imunizações com a UFMG-VAC-V4N2 já descritos (ASSIS *et al.*, 2023; DA SILVA NETO ET AL., 2021; SABATO *et al.*, 2023; CALIGIORNE *et al.*, 2023, no prelo) e o estudo com vacina GNE-KLH anticocaína em ratas grávidas (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021), conforme a **Figura 4**.

**Figura 4 - Cronograma experimental**



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 3.2.2.1 Imunizações

As formulações administradas nos grupos tratado e controle foram preparadas pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG no dia anterior à administração, conforme o protocolo descrito (ASSIS *et al.*, 2023). O grupo tratado recebeu a formulação da vacina com a molécula UFMG-V4N2 e o grupo controle apenas a formulação que atuou como placebo. O cronograma de imunizações seguiu os protocolos estabelecidos (DA SILVA NETO ET AL., 2021; MAIA, 2018; SOUZA, 2018; ASSIS *et al.*, 2023; SABATO *et al.*, 2023) e consistiu em administrações (300 µl/animal) nos tempos (T) T0, T7, T21 e T28 que correspondem ao período pré-gestacional e no T42, durante o período gestacional, para os grupos tratado e placebo, por via intramuscular (i.m), sob contenção e administração conforme as recomendações de manejo de animais experimentais (NEVES *et al.*, 2013).

### 3.2.2.2 Coleta de sangue

A coleta de sangue das ratas (mães) foi realizada na veia safena, utilizando agulhas de 0,45 x 13 mm, conforme as recomendações de manejo de animais experimentais (NEVES *et al.*, 2013) nos tempos T0, T7, T14, T21, T28 (pré-gestação), T35, T42, T49, T57 (período gestacional), T63, T70, T80, T90, T100 (pós-gestação e desmame). A coleta de sangue dos filhotes foi realizada pela veia facial mandibular (NEVES *et al.*, 2013) no desmame e 7 e 14 dias após o desmame, com agulhas de mesmo calibre e tubos de polipropileno de 0,5 mL. Após coletadas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 20 minutos e o soro separado em alíquotas em microtubos, identificados e armazenados em freezer -80°C até a execução dos ensaios imunológicos.

### 3.2.2.3 Ingestão hídrica e alimentar das mães

A ingestão hídrica e alimentar foram medidas a cada dois dias, sempre no mesmo horário, pela manhã. Para ingestão hídrica, um volume total de 600ml de água foram medidos em proveta, adicionado ao bebedouro e o volume restante no momento da medição foi descontado do volume total, obtendo-se assim o volume de consumo. Para a ingestão alimentar, foram adicionados 300 g de ração. Para os dois parâmetros, foi avaliada a média de consumo individual das fêmeas. Durante o acasalamento, o consumo dos machos foi descontado dos volumes restantes de água e peso de ração.

### 3.2.2.4 Acasalamento e período gestacional

O acasalamento foi realizado agrupando duas fêmeas com um macho 28 dias (T28) após a primeira imunização, sendo os animais mantidos na mesma caixa durante 8 dias, o que corresponde a dois ciclos estrais (NEVES *et al.*, 2013). Após o acasalamento, a gravidez foi confirmada após observação do tampão vaginal e as fêmeas foram mantidas em caixas individuais. Após o nascimento, os filhotes

permaneceram com as fêmeas por 21 dias para amamentação. Diariamente, os filhotes foram observados e contabilizados a fim de estabelecer a natalidade e mortalidade até o desmame.

Para avaliar o ganho médio de peso as fêmeas foram pesadas uma vez por semana no período pré-gestacional e diariamente durante a gestação, pela manhã, sempre no mesmo horário. O tempo de gestação, tamanho da ninhada, peso dos filhotes após o desmame e a mortalidade materna foram determinados.

### 3.2.2.5 Administração de cocaína

A solução de cocaína (20 mg/mL) foi preparada imediatamente antes da administração e o volume injetado em cada animal foi em torno de 0,2 e 0,4 mL, conforme a massa corporal no momento da administração. Após o acasalamento, a cocaína foi administrada nas fêmeas na dose diária de 20 mg/kg por via intraperitoneal (i.p) até o fim do período gestacional (21 dias). A solução também foi administrada na dose de 15 mg/kg nos filhotes após o desmame, quando submetidos ao teste de comportamento. As doses foram determinadas a partir de estudos que avaliaram a eficácia de uma imunização anticocaína em ratas grávidas (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021) e da atividade hiperlocomotora no teste de comportamento de campo aberto (*Open Field*) (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021; WILTSHIRE *et al.*, 2015).

### 3.2.2.6 Coleta de leite materno

A coleta do leite materno foi realizada imediatamente após o desmame (21 dias após o nascimento dos filhotes) mediante anestesia e relaxamento muscular do animal Cloridrato de xilazina + Cloridrato de cetamina em uma solução (1:1), na dose de 1 mL/kg por via intraperitoneal (i.p). A indução de liberação de leite foi realizada mediante administração de ocitocina injetável, na concentração de 10 UI/mL. Após constatada a sedação dos animais, estes foram posicionados em decúbito dorsal, devidamente imobilizados, e uma dose de 4 UI de ocitocina foi administrada via i.p. A coleta do leite materno foi executada 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 microtubos de polipropileno de 2 mL (PAUL *et al.*, 2015; De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021). As amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm por 60 min a 4°C para obtenção do soro que foi separado, identificado, dividido em alíquotas e armazenado em freezer -80°C para dosagem de anticorpos IgG anticocaína.

### 3.2.2.7 Teste comportamental

O teste de campo aberto ou *Open Field Test* é um método comportamental exploratório realizado com objetivo de observar se o efeito hiperlocomotor induzido pela cocaína seria atenuado pelos anticorpos IgG produzidos pela imunização com a UFMG-VAC-V4N2. Todas as mães foram submetidas ao teste durante o período gestacional, enquanto os filhotes foram escolhidos aleatoriamente após desmame, no tamanho amostral de 20 filhotes por grupo. Durante os primeiros 10 minutos os animais foram habituados à sala de experimentação e posteriormente mais 10 minutos para se habituarem à caixa de teste. Para o teste nas mães foram utilizadas duas caixas de madeira medindo 72cm (altura) x 72 cm (largura) x (profundidade) com revestimento interno. Para os filhotes foram usadas quatro caixas nas dimensões de 30 cm (altura) x 30 cm (largura) x 30 cm (profundidade).

Transcorrido as duas primeiras etapas de habituação, 15 mg/kg da solução de cocaína foi administrada nos filhotes e 20 mg/kg nas mães, por via intraperitoneal (i.p.) e o comportamento exploratório foi então registrado durante 30 minutos por uma câmera (DSC-H300, Sony Brasil®) posicionada no alto de forma a registrar os movimentos dos animais no centro e nas bordas das caixas de teste. Duas variáveis foram avaliadas: a distância total percorrida e o número de entradas no centro da caixa. As imagens foram analisadas pelo programa Any-Maze® (Stoelting Co., 2019).

### 3.2.3 Etapa 3: Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os anticorpos IgG anticocaína foram dosados no soro sanguíneo das mães e dos filhotes, e no soro do leite materno, conforme protocolo desenvolvido especificamente para dosagem de anticorpos anticocaína (PEREIRA, 2019). A partir

deste protocolo, foram testadas variações do método de detecção, a fim de definir as melhores condições de testagem para esse protocolo experimental. Esses protocolos já foram testados em trabalhos anteriores com camundongos (ASSIS *et al.*, 2023) ratos (CALIGIORNE *et al.*, 2023, no prelo; De Almeida Augusto *et al.*, 2021) e primatas não humanos (SABATO *et al.*, 2023) com resultados positivos.

### 3.2.3.1 Soluções

- Tampão de fixação – Solução utilizada para a fixação da cocaína à placa no Ensaio de Absorção Imunoenzimática (ELISA), composta por carbonato de sódio (1,5 g) - (Êxodo Científica®), bicarbonato de sódio (3,0 g) - (Êxodo Científica®) e azida sódica (0,2 g) (VETEC®) 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 (Sigma Aldrich);
- Tampão de lavagem – Solução utilizada para a lavagem das placas no ELISA, composta por Tween 20 (0,5 ml) (Sigma Aldrich), 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) (VETEC®) dissolvida em tampão PBS (1,0 L) e ajustado o pH para 7,4;
- Tampão de revelação – 5 µL de anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina (Anti-rat IgG Fab-específico – Sigma Aldrich®, Estados Unidos) dissolvido em 10 ml de tampão de amostra;
- Solução de substrato – 2 comprimidos de substrato p-nitrofenol (1 comprimido dourado e 1 comprimido prateado, Sigma Aldrich®) diluídos em 20 ml de água destilada sob agitação manual por 10 minutos até completa dissolução dos comprimidos. A solução obtida foi mantida em repouso por 20 minutos. Essa solução foi preparada trinta minutos antes do fim da incubação e mantida sob a proteção da luz;

- 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).

### 3.2.3.2 Etapa de fixação

Para dosagem dos anticorpos IgG anticocaína maternos, as amostras de soro que correspondem aos tempos das doses de reforço da imunização, foram selecionadas (T7, T14, T21, T28, T35, T42, T49). Essas amostras foram submetidas às análises nos protocolos com cocaína e com GNE-BSA fixados em fase adsortiva, conforme descritos a seguir.

No primeiro protocolo, as amostras foram testadas com a fixação de cocaína livre em fase adsortiva nas concentrações de 2, 5, 7 e 10 mg/mL. Para obter essas concentrações, a cocaína foi diluída em 1 ml de tampão de amostra. A partir dessa diluição, 10 µL de cada concentração foram diluídos individualmente em 10 mL de tampão fixação, conforme o protocolo de padronização. O mesmo foi feito para o segundo protocolo com a fixação de GNE-BSA em fase adsortiva nas concentrações 2, 5, 7 e 10 µg/mL. Com auxílio da pipeta multicanal (Research plus, Eppendorf®, Alemanha), em placas individuais, 100 µL de cada uma dessas soluções foram adicionados à sua respectiva microplaca com 96 poços (MaxiSorb™ Thermo Fisher Scientific®, MA, USA). As placas foram revestidas com papel alumínio e incubadas em refrigerador a 4°C *overnight*.

O protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva e amostras diluídas em 1:200, foi definido anteriormente como protocolo padrão ouro para quantificação de anticorpos anticocaína induzidos pela imunização com UFMG-VAC-V4N2, em modelos murinos. Portanto, o conjunto de amostras de referência foi submetido somente a este protocolo em paralelo com as amostras dos grupos vacinado e placebo. Para dosagem dos anticorpos dos filhotes, as amostras coletadas no desmame foram testadas, submetidas somente ao protocolo padrão ouro, sendo o mesmo foi feito para as amostras de soro do leite materno.

### 3.2.3.3 Etapa de incubação das amostras

Transcorrido o processo de fixação, as placas foram lavadas três vezes com 100 µL de tampão de lavagem por poço. Após a etapa de lavagem, 100 µL das amostras de soro materno, foram adicionadas em triplicata à microplaca em diluição seriada: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 no protocolo com 2mg/mL de cocaína fixada e 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 nos demais protocolos. As amostras de soro do leite e dos filhotes foram diluídas em 1:200. O tampão de amostra puro foi utilizado como branco da amostra. As placas foram novamente cobertas com papel alumínio e incubadas em refrigerador a 4°C *overnight*.

### 3.2.3.4 Etapa de revelação

Após a incubação das amostras, as placas foram lavadas três vezes com 100 µL de tampão de lavagem por poço. Após a etapa de lavagem, o anticorpo secundário (Anti-rat IgG - Sigma-Aldrich®, EUA) foi diluído em 1:2000 e 100 µL foram adicionados por poço da microplaca. Esta foi posteriormente incubada à 37°C por três horas em banho maria (Digital SSD20L SolidSteel, Brasil). Após incubação, as placas foram novamente lavadas com 100 µL de tampão de lavagem por poço e em seguida, 100 µL da solução substrato foram adicionados por poço. A microplaca foi, então, coberta com papel alumínio e mantida em repouso por 40 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, 50 µL de solução de parada foram adicionados por poço para interromper a reação enzimática. As placas preparadas foram lidas por espectrofotometria no leitor de microplacas Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, MA) com comprimento de onda de 405 nm.

### 3.2.4 Etapa 4: Análise da molécula UFMG-V4N2

O lote da molécula UFMG-V4N2 utilizado na formulação deste trabalho foi submetido à análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN) para avaliar sua integridade.

### 3.2.5 Etapa 5: Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism®, versão 9.5.1 (San Diego, Estados Unidos). A normalidade das amostras foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Múltiplos teste t não pareados com correção de Welch foi usado para comparar as médias de anticorpos IgG anticocaína no soro das mães, dos filhotes e no leite materno e as médias das demais variáveis observadas. O teste t de Student pareado foi aplicado para as análises de ELISA nos protocolos que utilizaram o tempo zero (T0) de imunização como parâmetro de controle e para avaliar diferenças na ingestão hídrica e alimentar materna nos períodos gestacional, pré-gestacional e amamentação.

## 4 RESULTADOS

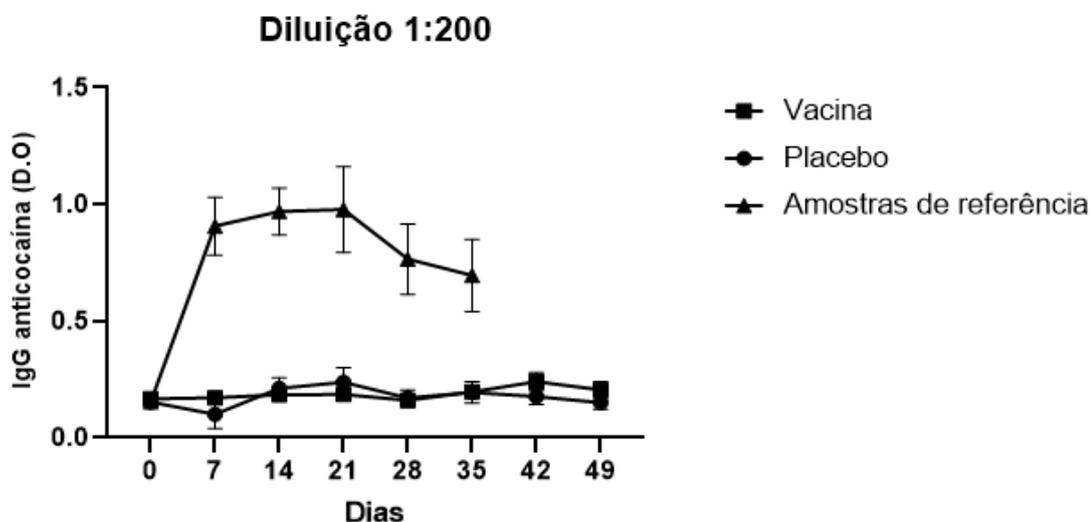
### 4.1 Avaliação da eficácia da UFMG-VAC-V4N2 na produção de anticorpos anticocaína em ratas grávidas

#### 4.1.1 Títulos de anticorpos IgG anticocaína nas mães no protocolo de 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsorviva com amostras diluídas em 1:200

Os títulos de anticorpos IgG anticocaína de mães vacinadas não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Os títulos de anticorpos das amostras de referência foram significativamente maiores em relação ao grupo vacinado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28 e 35, conforme ilustrado na **Figura 5** e **Tabela 1**.

**Figura 5** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas diluídas em 1:200, expressos em densidade óptica (D.O), no

protocolo com 2 mg/mL cocaína fixados em fase adsortiva



**Tabela 1** - Títulos de anticorpos IgG anticocaina em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:200, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias no protocolo com 2 mg/mL cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo				Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)		
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T0</b>	0,166 ± 0,007	0,153 ± 0,013	<i>p</i> = 0,661	0,166 ± 0,007	0,154 ± 0,003	<i>p</i> = 0,215
<b>T7</b>	0,172 ± 0,018	0,100 ± 0,06	<i>p</i> = 0,454	0,172 ± 0,018	0,906 ± 0,124	<i>p</i> = 0,005*
<b>T14</b>	0,184 ± 0,003	0,212 ± 0,045	<i>p</i> = 0,672	0,184 ± 0,003	0,969 ± 0,100	<i>p</i> = 0,003*
<b>T21</b>	0,186 ± 0,023	0,237 ± 0,062	<i>p</i> = 0,661	0,186 ± 0,023	0,977 ± 0,183	<i>p</i> = 0,011*
<b>T28</b>	0,160 ± 0,005	0,170 ± 0,035	<i>p</i> = 0,841	0,160 ± 0,005	0,765 ± 0,150	<i>p</i> = 0,011*
<b>T35</b>	0,196 ± 0,015	0,194 ± 0,046	<i>p</i> = 0,939	0,196 ± 0,015	0,696 ± 0,154	<i>p</i> = 0,014*
<b>T42</b>	0,240 ± 0,039	0,176 ± 0,033	<i>p</i> = 0,326	0,240 ± 0,039	s.a	-
<b>T49</b>	0,205 ± 0,035	0,151 ± 0,028	<i>p</i> = 0,331	0,205 ± 0,035	s.a	-

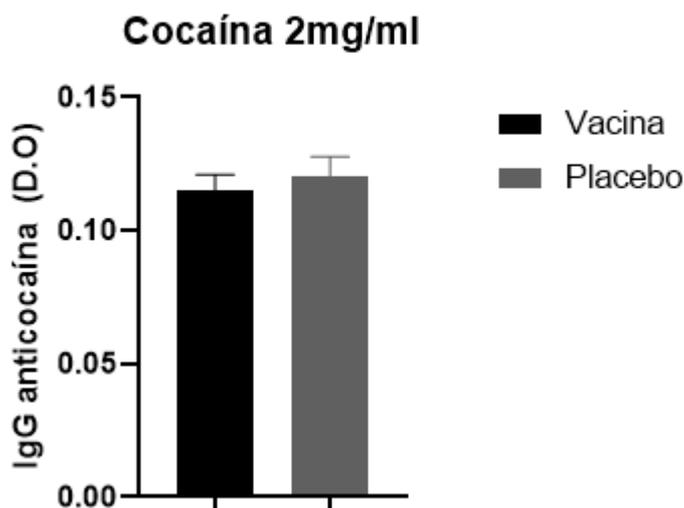
s.a = sem amostra; \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vacina e A.R; - Indica sem valor para *p* valor.

O protocolo empregado neste resultado (2 mg/mL de cocaína fixados em fase sólida e amostras diluídas em 1:200) foi definido em estudos anteriores como padrão ouro para dosagem de anticorpos anticocaína em modelos murinos imunizados com UFMG-VAC-V4N2, portanto, somente este resultado será exibido neste item. Os resultados dos demais protocolos testados podem ser consultados no **Apêndice A**.

#### 4.1.2 Títulos de anticorpos IgG anticocaína no leite materno

Os títulos de anticorpos IgG anticocaína no soro de leite de mães vacinadas não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo, em amostras diluídas em 1:200, conforme apresentado na **Figura 6 (Vacina vs. Placebo,  $0,114 \pm 0,006$  vs.  $0,120 \pm 0,007$ ;  $p = 0,382$ )**.

**Figura 6** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína expressos em densidade óptica (D.O) em amostras de leite materno diluídas em 1:200, dos grupos vacinado e placebo, no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

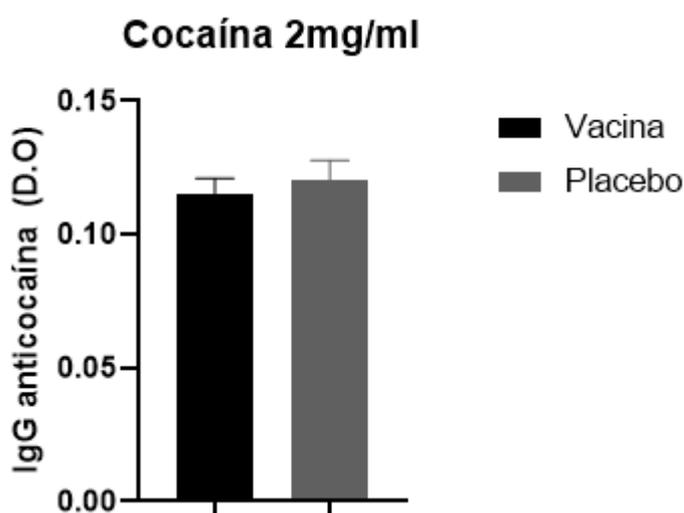


#### 4.1.3 Títulos de anticorpos IgG anticocaína em filhotes

Os títulos de anticorpos IgG anticocaína em filhotes de mães vacinadas não diferiram estatisticamente em relação ao grupo de filhotes do grupo placebo com

amostras diluídas em 1:200, conforme ilustrado na **Figura 7 (Vacina vs. Placebo**  $0,183 \pm 0,02$  vs.  $0,211 \pm 0,04$ ;  $p = 0,352$ ).

**Figura 7** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína expressos em densidade óptica (D.O) em amostras de filhotes diluídas em 1:200, dos grupos vacinado placebo, no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

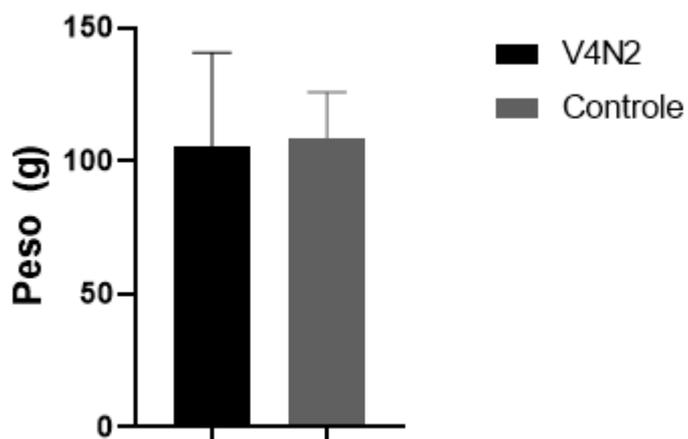


## 4.2 Avaliação da eficácia da UFMG-VAC-V4N2 na atenuação dos desfechos gestacionais e neonatais induzidos por cocaína

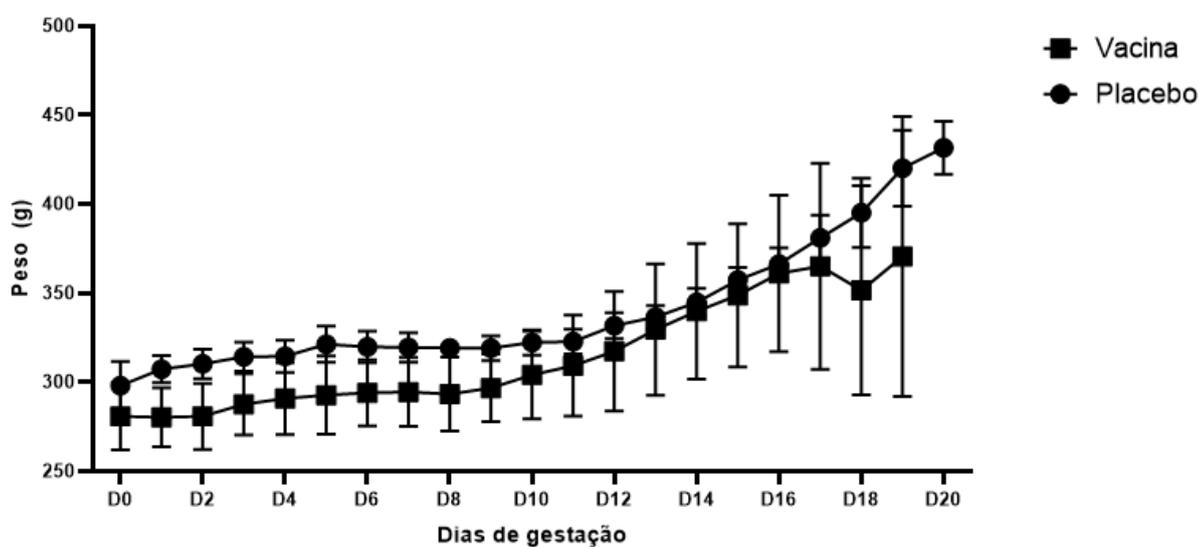
### 4.2.1 Ganho de massa corporal materno

O ganho de massa corporal total durante a gestação não diferiu entre os grupos vacinado e placebo (**Figuras 8 e 9, Vacina vs. Placebo**,  $105,3 \pm 35,48$  vs.  $108,5 \pm 17,25$ ;  $p = 0,885$ ).

**Figura 8** - Ganho de massa corporal média, expressa em gramas (g), durante a gestação nos grupos vacinado e placebo



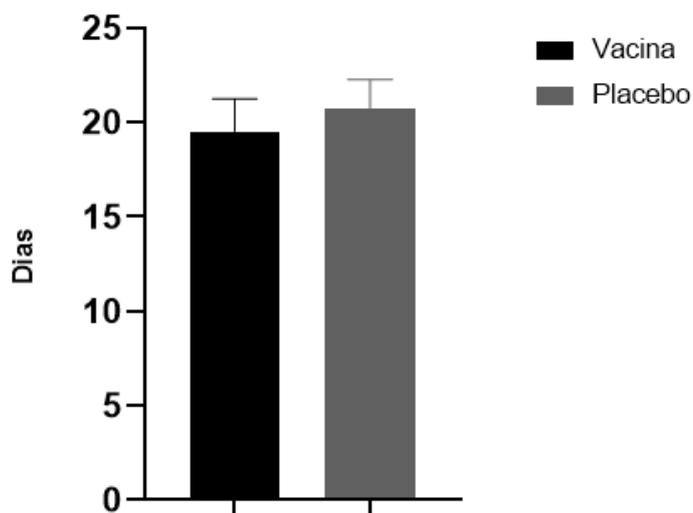
**Figura 9** - Ganho médio de peso, expresso em gramas (g), durante a gestação dos grupos vacinado e placebo



#### 4.2.2 Tempo de gestação, tamanho da ninhada, mortalidade materna

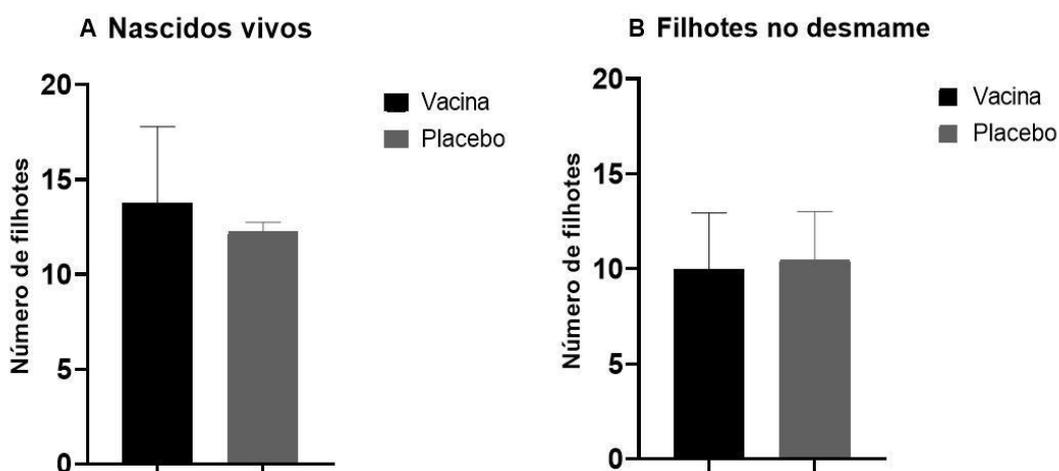
Não houve diferença estatística no tempo de gestação entre os grupos vacinado e placebo (**Figura 10, Vacina vs. Placebo**,  $19,50 \pm 1,73$  vs.  $20,75 \pm 1,50$ ;  $p = 0,342$ ).

**Figura 10** - Tempo médio das gestações, expresso em dias, nos grupos vacinado e placebo



A vacinação com UFMG-VAC-V4N2 não interferiu no tamanho da ninhada. Não houve diferença estatística significativa no número médio de filhotes nascidos vivos (**Figura 11<sup>a</sup>, Vacina vs. Placebo**  $13,75 \pm 4,03$  vs.  $12,25 \pm 0,50$ ;  $p = 0,512$ ) e no número de filhotes no desmame, entre os grupos vacinado e placebo (**Figura 11B, Vacina vs. Placebo**  $10,00 \pm 2,94$  vs.  $10,50 \pm 2,51$ ;  $p = 0,805$ ). Nenhuma fêmea de qualquer um dos grupos veio a óbito no decorrer deste experimento.

**Figura 11** - Número médio de filhotes nascidos vivos e no desmame nos grupos vacinado e placebo

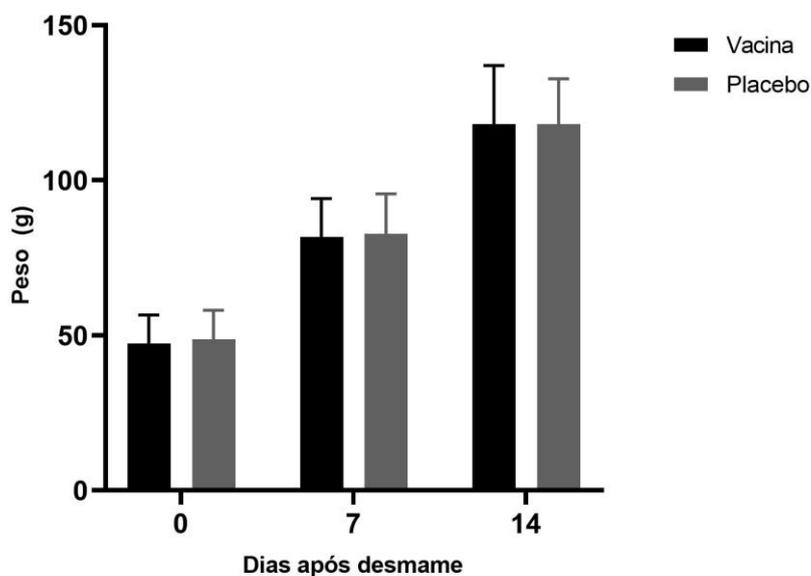


A. Número médio de filhotes nascidos vivos nos grupos de mães vacinadas e placebo; B. Número de filhotes nos grupos de mães vacinadas e placebo no desmame.

#### 4.2.3 Peso médio dos filhotes após desmame

Não houve diferenças estatisticamente significativas na massa corporal média após o desmame entre filhotes de mães vacinadas e não vacinadas (**Figura 12, Vacina vs. Placebo - Desmame**,  $38,75 \pm 9,103$  vs.  $44,12 \pm 9,322$ ,  $p = 0,309$ ; **Dia 7 após desmame**,  $39,60 \pm 12,435$  vs.  $43,31 \pm 12,87$ ,  $p = 0,483$ ; **Dia 14 após desmame**,  $39,71 \pm 18,855$  vs.  $43,20 \pm 14,617$ ,  $p = 0,510$ ).

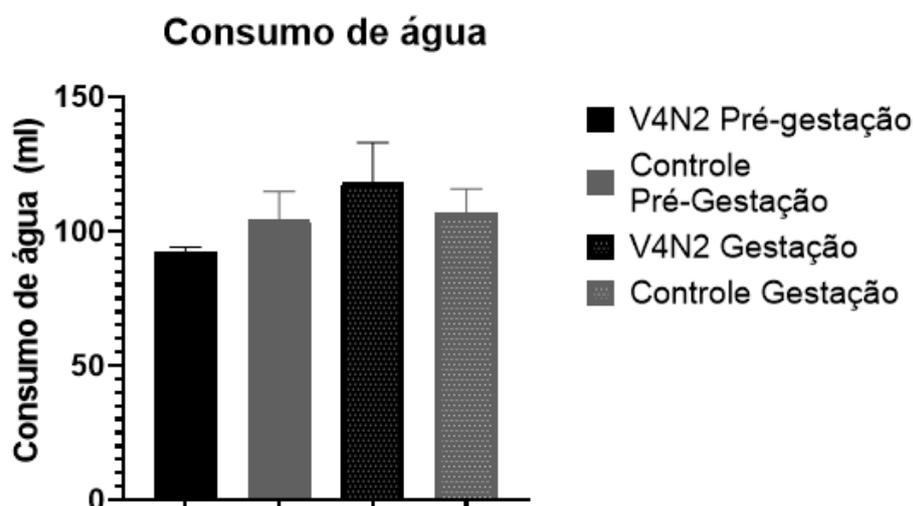
**Figura 12** - Massa corporal média expressa em gramas (g) em filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo após o desmame



#### 4.2.4 Ingestão hídrica e alimentar materna

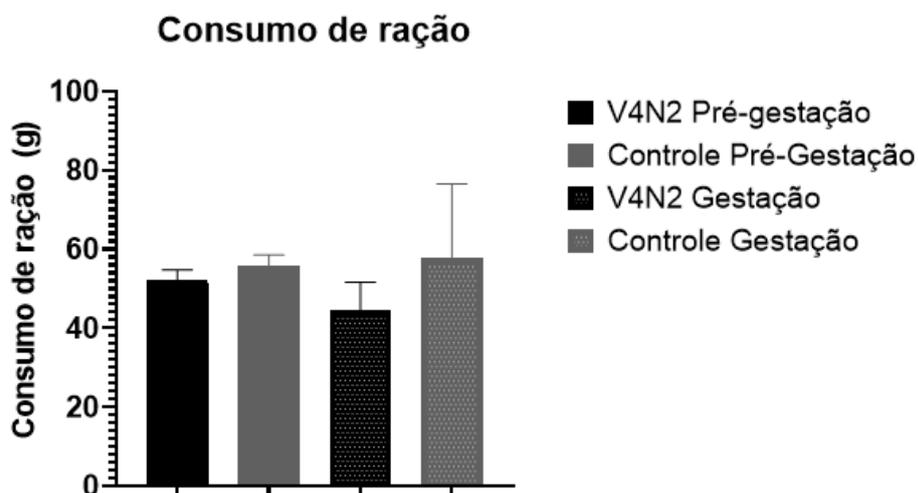
Não houve diferenças estatisticamente significativas no consumo hídrico entre mães vacinadas e placebo durante o estudo (**Vacina vs. Placebo**,  $94,00 \pm 16,20$  vs.  $97,76 \pm 20,32$ ,  $p = 0,543$ ). Portanto, o consumo de água foi maior no período gestacional quando comparado ao período pré-gestacional no grupo vacinado (**Figura 13, Vacina pré-gestação vs. Vacina gestação**  $92,15 \pm 19,66$  vs.  $119,1 \pm 30,07$ ;  $p = 0,032$ ; **Placebo pré-gestação vs. Placebo gestação**,  $103,9 \pm 21,76$  vs.  $108,5 \pm 41,59$ ;  $p = 0,797$ ).

**Figura 13** - Média de consumo hídrico materno, expressos em mililitros (ml) nos períodos pré-gestacional e gestacional nos grupos vacinado e placebo



Não houve diferenças estatisticamente significativas no consumo alimentar entre mães vacinadas e placebo durante o estudo (**Figura 14, Vacina vs. Placebo**,  $49,67 \pm 12,17$  vs.  $52,52 \pm 14,87$   $p = 0,570$ ) e nem quando comparado entre os períodos pré-gestacional e gestacional (**Figura 14, Vacina pré-gestação vs. Vacina gestação**,  $52,23 \pm 11,88$  vs.  $45,79 \pm 17,0$ ;  $p = 0,137$ ; **Placebo pré-gestação vs. Placebo gestação**,  $55,92 \pm 13,80$  vs.  $62,93 \pm 41,86$ ;  $p = 0,859$ ).

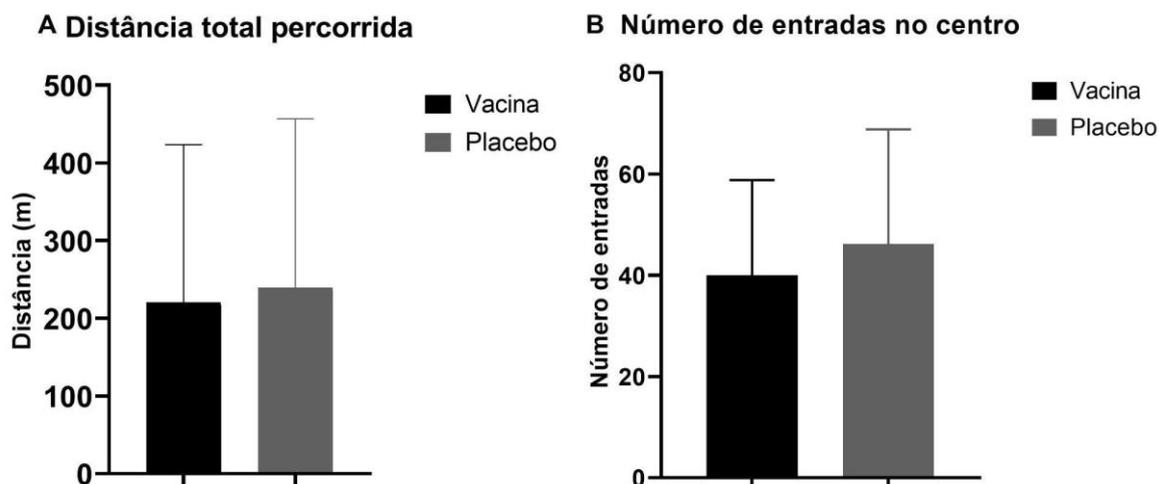
**Figura 14** - Média de consumo alimentar materno, expressos em gramas (g) nos períodos pré-gestacional e gestacional nos grupos vacinado e placebo



#### 4.2.5 Atividade locomotora materna em modelo de campo aberto

Não houve diferença estatística na distância total média percorrida (**Figura 15, Vacina vs. Placebo**,  $220,5 \pm 202,78$  vs.  $239,3 \pm 217,45$ ;  $p = 0,903$ ) e no número médio de entradas no centro da caixa de teste (**Figura 15, Vacina vs. Placebo**  $40,00 \pm 18,81$  vs.  $46,25 \pm 22,6$ ;  $p = 0,686$ ), após administração de cocaína, entre as mães dos grupos vacinado e placebo.

**Figura 15** - Distância total média percorrida e número médio de entradas no centro da caixa de teste em mães dos grupos vacinado e placebo

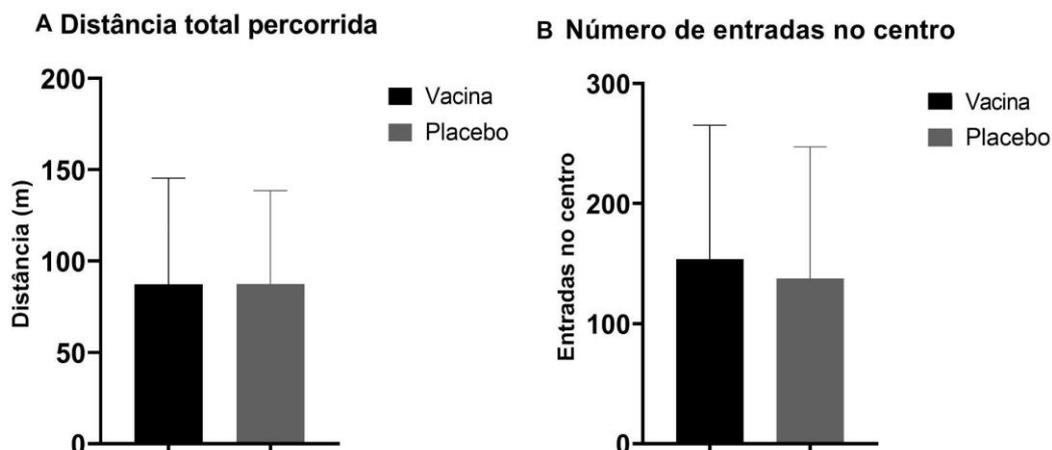


A. Distância média percorrida em metros (m) após tratamento com cocaína, nos grupos vacinado e placebo; B. Número médio de entradas no centro da caixa de teste, após tratamento com cocaína, nos grupos vacinado e placebo.

#### 4.2.6 Atividade locomotora dos filhotes em modelo de campo aberto

Assim como nas mães, não houve diferença estatística na distância total média percorrida (**Figura 16A - Vacina vs. Placebo**,  $87,09 \pm 58,28$  vs.  $87,34 \pm 51,12$ ;  $p = 0,988$ ) e no número médio de entradas no centro da caixa de teste (**Figura 16B - Vacina vs. Placebo**  $153,4 \pm 111,9$  vs.  $137,6 \pm 109,5$ ;  $p = 0,653$ ), após administração de cocaína, entre os filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo.

**Figura 16** - Distância total média percorrida e número médio de entradas no centro da caixa de teste em filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo



- A. Distância média percorrida em metros (m) após tratamento com cocaína, por filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo; B. Número médio de entradas no centro da caixa de teste, após tratamento com cocaína, por filhotes de mães dos grupos vacinado e placebo.

### 4.3 Análise da molécula UFMG-V4N2 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN)

O lote de UFMG-V4N2 usado na formulação foi analisado pelo método de RMN e o laudo técnico descreve que a molécula apresenta pontos de degradação que indicam provável hidrólise do grupo benzoato na estrutura da cocaína, em 20,54% dos haptenos que compõem a molécula. Os detalhes desta análise podem ser consultados no **Anexo A**.

## 5 DISCUSSÃO

As hipóteses propostas neste estudo foram parcialmente rejeitadas, visto que após os estudos, constatou-se a degradação do lote de UFMG-V4N2 usado na formulação. Neste estudo não foram identificados anticorpos IgG anticocaína no soro de sangue, do leite e de filhotes de ratas vacinadas submetidos aos testes de quantificação, por consequência também não foi observada a atenuação dos desfechos obstétricos e neonatais associados ao uso de cocaína. Diante dos

resultados negativos, foram pesquisadas justificativas na literatura e na metodologia utilizada.

### **5.1 Produção de anticorpos IgG anticocaína nas mães e aquisição imunológica passiva pela prole**

Embora a gravidez esteja associada a uma imunossupressão antigênica e já tenha sido descrito que mulheres grávidas podem responder de maneira menos efetiva a estímulos imunológicos (BISCHOFF *et al.*, 2013; SCHLAUDECKE *et al.*, 2012; NASIDI *et al.*, 1993; HEALY & BACKER, 2013), avaliações descritas em modelos pré-clínicos e clínicos demonstram que gestantes, são claramente capazes de responder imunologicamente contra agentes infecciosos (ERLEBACHER, 2013; MCGREGOR *et al.*, 1970) e contra antígenos de origem vacinal (BISCHOFF *et al.*, 2013; SCHLAUDECKE *et al.*, 2012; NASIDI *et al.*, 1993), inclusive quando imunizadas com uma vacina antidroga, descrito pela primeira vez por De Almeida Augusto *et al.* (2021).

No presente estudo, os resultados mostraram que não foi possível identificar e quantificar anticorpos IgG anticocaína em nenhum dos tempos correspondentes às imunizações e aos reforços com a vacina UFMG-VAC-V4N2. O fator interferente neste estudo não pode estar ligado diretamente a gravidez. Quatro imunizações foram administradas no período pré-gestacional, e de acordo com cronograma de imunizações previamente testado neste modelo (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021).

Por se tratar de um produto de inovação, que carece de padrões externos de comparação, o método analítico é um fator importante a ser discutido. O método de ELISA desenvolvido e padronizado especificamente para quantificação de anticorpos anticocaína (PEREIRA, 2019), não propiciou a quantificação de anticorpos nas amostras coletadas neste protocolo experimental.

O protocolo utilizando 2 mg/mL de cocaína, fixados em fase adsortiva e amostras de soro diluídas em 1:200, foi definido como a melhor condição para quantificação de anticorpos em modelos murinos, imunizados com a vacina UFMG-VAC-V4N2. Este protocolo quantificou anticorpos IgG anticocaína em camundongos

(DA SILVA NETO ET AL., 2021; ASSIS *et al.*, 2023) e em ratos (CALIGIORNE *et al.*, 2023, no prelo). A partir deste protocolo definido como padrão ouro, foram testadas variações no método quanto à concentração de cocaína fixada em fase adsortiva e diluição seriada das amostras, a fim de verificar se haveria novas condições de quantificação para este trabalho. Ressalta-se que os pesquisadores envolvidos na execução do método possuem experiência em modelos grávidos e participaram de pelo menos três experimentos pré-clínicos com murinos envolvendo imunização com a UFMG-VAC-V4N2, e não houve nenhuma intercorrência durante a experimentação.

O protocolo utilizando GNE-BSA fixado em fase sólida foi efetivo para quantificação de anticorpos anticocaína em murinos imunizados pela formulação de GNE-KLH com adjuvante completo e incompleto de Freund, testada em modelos grávidos (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021), e em modelos de primatas não humanos imunizados com a vacina UFMG-VAC-V4N2 (SABATO *et al.*, 2023). Para os modelos murinos grávidos, o protocolo de 5 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva e a diluição da amostra em 1:500, foi efetivo na quantificação de anticorpos. Para as amostras dos modelos de primatas não humanos a quantificação foi realizada em diluição 1:250 com a concentração de 7 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva. Apesar deste protocolo não ter quantificado anticorpos anticocaína em modelos murinos, imunizados pela vacina UFMG-VAC-V4N2, também foi considerado e testado com variações para as amostras das mães coletadas neste trabalho. Assim como nas variações do método com cocaína fixada em fase adsortiva, este protocolo também não quantificou anticorpos IgG anticocaína nas amostras maternas.

Amostras de referência de animais imunizados com UFMG-VAC-V4N2 por via intramuscular (CALIGIORNE *et al.*, 2023, no prelo), foram submetidas aos testes em paralelo com as amostras das mães vacinadas, no protocolo padrão (2 mg/mL de cocaína fixados em fase sólida e amostras diluídas em 1:200), que quantificou anticorpos IgG anticocaína nas amostras de referência com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo de mães vacinadas, o que descarta a hipótese de falhas no método de quantificação neste experimento.

Por se tratar de um produto de inovação, é relevante ressaltar a importância do processo de padronização dos métodos de quantificação para determinar as melhores condições em cada protocolo experimental, uma vez que pode diferir de acordo com

propriedades de cada espécie, com a formulação, com a via de administração e ainda com as limitações do próprio método. O teste de diferentes concentrações de uma mesma amostra e diferentes concentrações dos analitos fixados em fase adsortiva, auxilia na compreensão dos parâmetros de detecção do método proposto e definição das melhores condições que atendam a essas variáveis. A produção de anticorpos IgG induzidos pela imunização com UFMG-VAC-V4N2 foi primeiramente quantificada nas amostras maternas e a avaliação das demais variáveis propostas, foram observadas de maneira secundária e diretamente dependentes da produção materna de anticorpos. Dito isso, não foi observado nenhum viés relacionado ao método de quantificação de anticorpos utilizado, já previamente referenciado na literatura (DA SILVA NETO ET AL., 2021; ASSIS *et al.*, 2023; CALIGIORNE *et al.*, 2023, no prelo; PEREIRA, 2019), que explicasse os resultados negativos.

Considerando que os anticorpos IgG encontrados em recém-nascidos são de origem materna, os níveis de anticorpos nas mães é o fator mais preditivo para uma transferência eficientemente protetora ao feto e ao recém-nascido (POU *et al.*, 2017; ALBRECHT & ARCK, 2020), seja por via transplacentária ou pela amamentação. Os anticorpos produzidos contra diferentes antígenos são transferidos de forma variável através da barreira placentária (CALVERT & JONES, 2017). Vacinas que contêm antígenos proteicos, como o toxóide tetânico ou a toxina pertussis, induzem transferência com mais eficiência, principalmente para a subclasse IgG1 (SASO & KAMPMANN, 2020). Já as vacinas que contêm antígenos polissacarídeos induzem transferência menos eficiente da subclasse IgG2 (ALBRECHT & ARCK, 2020; GONZALEZ & GONZALEZ, 2020).

Por se tratar de uma substância totalmente sintética, não proteica, produto de inovação e sem padrões de comparação, os estudos de resposta celular induzida por UFMG-VAC-V4N2 são fundamentais para o conhecimento dos mecanismos imunológicos induzidos pela vacina. Além disso, as subclasses de IgG podem ter diferentes níveis de afinidade e especificidade pela droga tanto no contexto materno, quanto no contexto fetal e neonatal, e sendo esse um fator importante para melhor compreensão da eficácia e segurança da vacina. A partir da conclusão desses estudos que já estão em andamento, novas hipóteses e discussões poderão ser levantadas

acerca da transferência placentária de anticorpos e suas subclasses em estudos futuros.

Apesar da maior parte da resposta imune humoral ser assegurada pela transferência placentária, a expressão do FcRn também foi demonstrada nos intestinos, mas apenas uma pequena concentração de IgG é transportada por esse mecanismo em humanos (YOSHIDA *et al.*, 2004). Em contrapartida, em modelos murinos, o IgG é transmitido principalmente após o nascimento, por meio da amamentação, devido aos altos níveis de expressão de FcRn no epitélio intestinal (PENTSUK & Van der LAAN, 2009; PYZIK *et al.*, 2019). Há também mecanismos de seleção mediados por receptores de membrana na superfície de células epiteliais, preferencialmente nas porções proximais do intestino delgado e transportados para a circulação do neonato nestes modelos (RODEWALD, 1970; RODEWALD, 1980; JONES & WALDMANN, 1972).

Diante disso, amostras de leite materno foram investigadas quanto à presença de anticorpos IgG anticocaína e, assim como nas amostras de soro materno e da prole, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na densidade óptica para a quantificação de IgG entre as amostras de leite de mães vacinadas e placebo. O IgG do leite materno se origina do soro de sangue via transporte de FcRn e de linfócitos B residentes (MARCHANT *et al.*, 2017; TUAILLON *et al.*, 2009). Os resultados obtidos no ELISA para quantificação dos anticorpos IgG anticocaína nas amostras de soro materno e dos filhotes, reduziram a possibilidade de que esses anticorpos pudessem ser detectados nas amostras de leite.

A aquisição dos anticorpos IgG pelo mecanismo de transcitose no epitélio intestinal é totalmente dependente da amamentação, dessa forma, uma vez cessada, os níveis decaem abruptamente (Van DE PERRE, 2003). Resultados concordantes foram observados para os níveis de anticorpos IgG anticocaína na prole de mães vacinadas, que decaíram significativamente sete dias após o desmame, não sendo mais detectados nos dias 14 e 21 após desmame (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021).

## **5.2 Desfechos gestacionais e pós-natais**

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de mães vacinadas e placebo para as variáveis ganho de peso na gestação, ingestão hídrica e alimentar materna duração da gestação, tamanho da ninhada, peso dos filhotes no desmame e mortalidade materna. Diante dos resultados da quantificação de anticorpos IgG anticocaína já discutidos, a vacina não promoveu proteção aos desfechos associados à exposição da cocaína na gestação.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no ganho de peso médio durante a gestação entre ratas do grupo vacinado e placebo. As ratas dos dois grupos ganharam em média 105 g, e esse resultado está de acordo com o ganho de peso médio de parâmetros fisiológicos gestacionais em ratos (CORVINO *et al.*, 2015; BAUTISTA *et al.*, 2013). Enquanto Dow-Edwards *et al.* (2014) e De Almeida Augusto *et al.* (2021) não observaram menor ganho de peso médio na gestação, outros estudos demonstram que o ganho médio de peso pode ser afetado pela exposição à cocaína de maneira dose-dependente. Bane, Stump & Avery (1994), demonstraram que o ganho de peso médio durante a gestação foi significativamente menor para as mães expostas a 60 mg/kg/dia de cocaína nas últimas semanas de gestação e na primeira semana de lactação, comparado ao grupo controle. Já o grupo de mães expostas a 40 mg/kg/dia de cocaína, apresentaram menor ganho de peso somente na primeira semana de lactação. Resultados semelhantes foram observados em relação a essa variável na dose de 30 mg/kg/dia (ADAM *et al.*, 1996; McMURRAY *et al.*, 2013; Mc MURRAY *et al.*, 2008). Os resultados deste trabalho podem estar associados a administração da dose de 20 mg/kg/dia de cocaína seguindo o protocolo executado anteriormente em nosso laboratório (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021). Além disso, o ganho de peso observado nos estudos citados pode sofrer interferências de outras variáveis como espécie, frequência, duração e via de administração da droga.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de mães vacinadas e placebo em relação ao consumo hídrico e alimentar. Durante a gestação, o consumo de ração não diferiu do período pré-gestacional, já o consumo hídrico foi maior durante a gravidez comparado ao período pré-gestacional no grupo de ratas vacinadas. A avaliação de parâmetros fisiológicos durante a gestação de modelos murinos descreve que a ingestão alimentar durante a gravidez

aumenta em relação ao período pré-gestacional, e durante a amamentação o consumo pode ser de duas a três vezes maior, quando comparados com modelos não grávidos e não lactantes; (CORVINO *et al.*, 2015; COLE & HART, 1938; ANDERSON & TURNER, 1963; CRIPPS & WILLIAMS, 1975; HAMMOND, 1997). Os resultados demonstraram que o consumo alimentar na gestação não diferiu do consumo pré-gestacional, em desacordo com os dados de parâmetros fisiológicos observados em modelos murinos grávidas já citados. Mas está de acordo com a literatura que descreve que os parâmetros de consumo podem ser afetados em animais expostos à cocaína durante a gestação, que apresentam menor consumo alimentar e maior consumo hídrico quando comparados aos não expostos (CHURCH, DINTCHEFF & GESSNER, 1988; BANE, STUMPS & AVERY, 1994; CHURCH *et al.*, 2004; CHURCH, OVERBECK & ANDRZEJCZAK, 1990; CHURCH, MORBACH & SUBRAMANIAN, 1995; McMURRAY *et al.*, 2013; PEEKE *et al.*, 1994).

Foi observado maior consumo hídrico durante a gestação quando comparado ao período pré-gestacional em ratas vacinadas. Esse achado pode estar relacionado ao fator gravidez ou à exposição à cocaína, uma vez que animais expostos à cocaína apresentam maior ingestão hídrica quando comparados aos não expostos. Esses achados podem estar relacionados com efeitos estimulantes da droga, que aumentam a atividade locomotora dos animais. Além disso, por se tratar de uma droga vasoconstritora, seus efeitos podem interferir na diurese, uma vez que o aumento da pressão arterial pode aumentar a filtração glomerular e assim como em outras drogas de abuso, como o álcool, a cocaína pode inibir a produção do hormônio antidiurético e contribuir para maior ingestão de água (CHURCH *et al.*, 1995; CHURCH & RAUCH, 1992).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no tempo de gestação, tamanho da ninhada, peso dos filhotes no desmame e mortalidade materna, entre os grupos vacinado e placebo. Essas variáveis não foram afetadas pela administração de 20 mg/kg de cocaína na gestação, e estão de acordo com os estudos que descrevem que a exposição a doses mais baixas de cocaína não afeta esses parâmetros de maneira significativa como observado para as variáveis discutidas acima (De ALMEIDA AUGUSTO *et al.*, 2021; McMURRAY *et al.*, 2013; CHURCH, OVERBECK & ANDRZEJCZAK 1990; CHURCH *et al.*, 2004; DOW-EDWARDS *et al.*,

2014). A mortalidade materna foi observada quando foram administradas doses a partir de 30mg/kg/dia (CHURCH, OVERBECK & ANDRZEJCZAK, 1990; CHURCH, MORBACH & SUBRAMANIAN, 1995; DOW-EDWARDS *et al*, 2014).

Esses achados rejeitam a hipótese de proteção aos desfechos gestacionais induzidos por cocaína. Porém, estão de acordo com os demais achados de não produção de anticorpos pela vacina UFMG-VAC-V4N2 neste trabalho.

### **5.3 Efeitos hiperlocomotores induzidos por cocaína**

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de mães vacinadas e placebo e seus respectivos filhotes, na atividade locomotora induzida por cocaína (distância total percorrida e número de entradas no centro da caixa de teste).

O teste de campo aberto (*Open Field*) é amplamente aplicado para medir comportamentos animais bem definidos, especialmente roedores. Vários parâmetros podem ser avaliados envolvendo diferentes tipos de atividade motora, incluindo os efeitos psicoestimulantes de drogas e fármacos (SEIBENHENER & WOOTER, 2015). A cocaína aumenta a atividade locomotora e o comportamento de desinibição dos animais, que podem ser avaliados, respectivamente, pela distância total percorrida e pelo número de entradas no centro da caixa de teste, por um tempo determinado, definido a partir do desenho de estudo (JONHS *et al.*, 1992; ERHARDT *et al.*, 2006; CAREY & GUI, 1998; TAKAHASHI, VENGELIENE & SPANAGEL, 2017; COUCEYRO *et al.*, 2005).

Para atenuação da hiperlocomoção induzida por cocaína em ensaios comportamentais, são necessários títulos de anticorpos que capture parte da cocaína livre disponível na corrente sanguínea, de forma a reduzir sua passagem pela BHE e seus efeitos estimulantes no SNC, que refletem em efeitos periféricos (HANEY *et al.*, 2010.) Foi sugerido que em animais os títulos de anticorpos anticocaína podem se relacionar diretamente com a neutralização dos efeitos psicoativos da droga (CARRERA *et al.*, 1995; CARRERA *et al.*, 2001; BAGASRA *et al.*, 1992; KANTAK *et al.*, 2000). Em contrapartida, essa relação não foi observada no estudo conduzido com imunização anticocaína em ratas grávidas (De Almeida Augusto *et al.*, 2021). Em

humanos imunizados por uma vacina anticocaína em fase clínica, foram observados efeitos protetores dependentes do título de anticorpos produzidos. Os indivíduos que produziram maiores títulos mostraram redução imediata e robusta dos efeitos intoxicantes da cocaína, quando comparados aos que produziram baixos títulos (HANEY *et al.*, 2010).

Para alcançar esses resultados, além do título de anticorpos, os parâmetros de especificidade e força de ligação antígeno-anticorpo são importantes (FOX, 1997). A especificidade dos anticorpos pela cocaína pode ser mensurada pelo método de ELISA de competição, que avalia quanto de anticorpo presente na amostra captura a cocaína livre em uma solução de concentração conhecida. Nos estudos anteriores, em animais vacinados com UFMG-VAC-V4N2, os anticorpos anticocaína dosados em amostra de camundongos (ASSIS *et al.*, 2023) e primatas não humanos (SABATO *et al.*, 2023), demonstraram ter especificidade pela cocaína. Além da especificidade, outro fator importante a se destacar é a avidéz, que corresponde a força de ligação antígeno-anticorpo e pode ser mensurada pelo método de ELISA e, por meio deste ensaio, foi observado que os anticorpos produzidos pela vacina UFMG-VAC-V4N2 em primatas não humanos possuem avidéz pela cocaína (SABATO *et al.*, 2023).

Uma vez que a vacina estimule a produção de anticorpos que atendam a esses parâmetros, além de reduzir a passagem pela BHE, os anticorpos poderiam também contribuir para a minimização dos efeitos periféricos causados pela cocaína, quando capturada antes de atuar em seus receptores periféricos e exerça seus efeitos vasculares (HANEY *et al.*, 2010). O mesmo poderia acontecer na placenta durante a gestação e essas hipóteses podem ser testadas em trabalhos futuros.

#### **5.4 A vacina UFMG-VAC-V4N2**

A literatura traz evidências que sustentam as vantagens e benefícios da vacinação para a saúde materna e fetal, para uma variedade de doenças infecciosas. A proposta de vacinação materna com uma formulação antidroga, visando a proteção materno-fetal, é totalmente inovadora e promissora.

A partir dos testes realizados nos protocolos de quantificação de anticorpos anticocaína, utilizando dois diferentes analitos em fase sólida, cinco pontos de diluição

das amostras, e a confirmação da efetividade do método em amostras positivas, novas investigações foram feitas a fim de esclarecimento dos desfechos obtidos neste trabalho. Visto se tratar de uma substância inovadora, não proteica, sintética, nunca administrada em humanos, e sem padrões de comparação para as técnicas de caracterização e método analítico, os desafios são muitos. O desenvolvimento de uma vacina anticocaína totalmente sintética, envolve toda a cadeia de processos, iniciando na química orgânica que inclui a síntese, caracterização e purificação do hapteno GNE, da plataforma calixareno e do acoplamento químico dessas estruturas que originam a molécula UFMG-V4N2.

Dessa forma, foi levantada a hipótese de que os resultados obtidos pudessem estar relacionados com a formulação utilizada nas imunizações e as etapas de produção foram verificadas, iniciando pela análise da molécula UFMG-V4N2. A UFMG-V4N2 foi submetida a análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e o laudo técnico descreve pontos de degradação com provável hidrólise do grupo benzoato na estrutura da cocaína, que transformou parte dos haptenos cocainérgicos em haptenos ecgoninérgicos.

Uma hipótese é que tal mudança no hapteno possa ter comprometido a resposta imune e produção de anticorpos anticocaína no experimento descrito neste trabalho. A degradação pode ter induzido produção de anticorpos com especificidade e avidéz diferentes entre si, e por isso não terem sido quantificados pelo método proposto como padrão e nem com suas variações. Além disso, a eficácia de uma vacina está em parte diretamente relacionada com a apresentação efetiva do antígeno, de forma a induzir produção de anticorpos de maneira específica. Com a degradação, a molécula pode não ter sido efetivamente apresentada ao sistema imunológico como antígeno, e ainda induzir outros tipos de anticorpos que afetam a produção de anticorpos contra a molécula íntegra, ou induzir respostas imunológicas de outras vias que não promovem produção de anticorpos.

Por se tratar de um produto de inovação, alguns parâmetros ainda não foram totalmente compreendidos. A molécula ainda carece de estudos mais específicos a respeito da sua estabilidade, o conhecimento e caracterização dos possíveis mecanismos e produtos de degradação, e seus efeitos na imunogenicidade, eficácia e segurança da formulação. Os achados aqui descritos inviabilizaram a execução do

segundo bloco experimental previsto e sugerem que para os estudos futuros, todos os lotes de UFMG-V4N2 sejam analisados quanto a sua integridade antes do início dos protocolos de imunização.

## 6 CONCLUSÃO

A proposta de uso de uma vacina terapêutica para prevenção de desfechos psiquiátricos em fetos expostos a cocaína é um constructo inovador proposto recentemente por nosso grupo de pesquisa. Nossos resultados apontam que a vacina UFMG-VAC-V4N2 não foi capaz de produzir anticorpos anticocaína em ratas grávidas e seus filhotes e protegê-los dos desfechos negativos da exposição pré-natal à cocaína. Porém, diante dos resultados negativos, investigamos as possíveis causas e descobrimos que nossos achados possivelmente estavam associados a uma degradação da molécula UFMG-V4N2 na vacina e não a ineficácia do modelo proposto.

Neste trabalho enfrentamos dois problemas inerentes à ciência, mas nem por isso fáceis de lidar: a inovação e o resultado negativo. A inovação nos coloca diante de desafios difíceis de calcular. Por outro lado, a possibilidade de aprendizado é redobrada. Nossos achados sugerem que procedimentos operacionais padrão devem ser adotados quando lidamos com o desconhecido. Além disso, resultados negativos são uma realidade que fingimos desconhecer. Poucos periódicos científicos aceitam, editam números especiais ou são dedicados à publicação de resultados negativos (SAYÃO; SALES & FELIPE, 2021). O paradoxo é que resultados negativos são vistos como fracasso e não parte de uma trajetória que busca informações realmente desconhecidas e relevantes. Nossos achados apontam que resultados negativos podem contribuir para o avanço da ciência, e sobretudo para formação de cientistas resilientes e dispostos a encarar desafios.

Finalmente, diante do exposto, salientamos a importância de investigar a causa do resultado negativo sempre que possível. Em relação ao experimento apresentado, nossos resultados apontam que o trabalho de caracterização e posterior avaliação de parâmetros de estabilidade da molécula UFMG-V4N2 é essencial para a continuidade da pesquisa apresentada. Além disso, não podemos concluir sobre a eficácia ou não

da vacina UFMG-VAC-V4N2 em ratas grávidas devido aos problemas apresentados e discutidos no trabalho. Novos testes serão conduzidos para contornar essas limitações e obtermos um resultado conclusivo.

## 7 REFERÊNCIAS

ABU-RAYA, B. *et al.* **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.

ADDIS, A. *et al.* **Fetal effects of cocaine: an updated meta-analysis.** *Reproductive Toxicology*, v. 15, n. 4, p. 341–369, 2001.

ADAM R. *et al.* **Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: Preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth.** *Neurotoxicology and teratology*, v. 18, n. 6, p. 635–643, 1996.

ALBRECHT, M.; ARCK, P.C. **Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators.** *Frontiers in Immunology*, v.11, p. 555, 2020.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. **Breastfeeding and the Use of Human Milk.** *Pediatrics*, v. 115, n. 2, p. 496–506, 2005.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. **The Transfer of Drugs and Other Chemicals Into Human Milk.** *Pediatrics*, v. 108, n. 3, p. 776–789, 2001.

ANDERSON, R. R.; TURNER, C. W. **Feed Consumption During Lactation and Involution in Sprague-Dawley-Rolfsmeyer Rats.** *Experimental Biology and Medicine*, v. 113, n.2, p. 334–336, 1963.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não Clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia** – GESEF, Brasília, p. 1-48, 31 jan. 2013

ASSIS, B.R.D. *et al.* **Low doses of pharmaceutical formulations loaded with UFMG-V4N2 immunogen induce the production of IgG anti-cocaine antibodies and provide evidence of cerebral protection in the preclinical model.** *Journal of Colloid and Interface Science Open*, v. 9, p. 100078, 2023.

BADA, H.S. *et al.* **Preadolescent behavior problems after prenatal cocaine exposure: Relationship between teacher and caretaker ratings (Maternal Lifestyle Study).** *Neurotoxicol Teratol*, v. 33, n. 1, p. 78-87, 2011.

BADA, H.S. *et al.* **Impact of prenatal cocaine exposure on child behavior problems through school age.** *Pediatrics*, v. 119, n. 2, p. 348-359, 2007.

BAGASRA, O. *et al.* **A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis.** *Immunopharmacology*, v. 23, n. 3, p. 173-179, 1992.

BANE, A.J; STUMP, B.S; AVERY, D.D. **Effects of cocaine on dietary self-selection during pregnancy and lactation in the rat.** *Physiology and Behavior*, v. 56, n. 2, p. 305-10, 1994.

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?** *ICICT/FIOCRUZ*, p. 224, 2014.

BAUTISTA, C.J. *et al.* **Protein Restriction in the Rat Negatively Impacts Long-chain Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Mammary Gland Development at the End of Gestation.** *Archives of Medical Research*, v. 44, n.6, p. 429 – 436, 2013.

BECKWITH, L. *et al.* **Psychopathology, mother-child interaction, and infant development: substance-abusing mothers and their offspring.** *Development and Psychopathology*. v. 11, n. 4, p. 715 - 725, 1999.

BEHNKE, M.; SMITH, V.C. **Prenatal Substance Abuse: Short- and Long-Term Effects on the Exposed Fetus.** *Pediatrics*, v. 131, n. 3, p. 1009 - 1024, 2013.

BISCHOFF, A.L. *et al.* **Altered response to A(H1N1)pnd09 vaccination in pregnant women: a single blinded randomized controlled trial.** *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. 56700, 2013.

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

BRIMIJOIN, S. *et al.* **Anti-cocaine antibody and butyrylcholinesterase-derived cocaine hydrolase exert cooperative effects on cocaine pharmacokinetics and cocaine-induced locomotor activity in mice.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 203, n.1, p. 212-216, 2013.

BUCKINGHAM-HOWES, S. *et al.*, **Systematic review of prenatal cocaine exposure and adolescent development.** *Pediatrics*, v. 131, n.6, p. 1917-1936, 2013.

CAMARGO, P.O.; MARTINS, 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.

CAI, X. *et al.* **Probing active cocaine vaccination performance through catalytic and noncatalytic hapten design.** *Journal of Medical Chemistry*, v. 56, n. 9, p. 3701-3709, 2013.

CALIGIORNE, M.S. *et al.* **Safety and immunogenicity of the anticocaine vaccine UFMG-VAC-V4N2 in Wistar rat.** 2023. No prelo.

CALVERT, A.; JONES, C.E. **Placental transfer of antibody and its relationship to vaccination in pregnancy.** *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 30, n. 3, 268–273, 2017.

CAREY, R.J; GUI, J. **Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship?** *Behavioral Brain Research*, v. 92, n.1, p. 67-76, 1998

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. *et al.* **Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization.** *Nature*, v. 378, n. 6558, p. 727-730, 1995.

CARRERA, M.R. *et al.* **A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n.4, p. 1988 - 1992, 2001.

CHURCH, M.W. *et al.* **Prenatal cocaine exposure influences the growth and life span of laboratory rats.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, n.3, p. 429-441, 2004.

CHURCH, M.W; MORBACH, C.A.; SUBRAMANIAN, M.G. **Comparative effects of prenatal cocaine, alcohol, and undernutrition on maternal/fetal toxicity and fetal body composition in the Sprague-Dawley rat with observations on strain-dependent differences.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 17, n.5, p. 559-567, 1995.

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.

CHURCH, M.W; RAUCH, H.C. **Prenatal cocaine exposure in the laboratory mouse: effects on maternal water consumption and offspring outcome.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 14, n.5, p. 313-319, 1992.

COLE, H.H; HART, G.H. **The effect of pregnancy and lactation on growth in the rat.** *American Journal of Physiology*, v. 123, n.3, p. 589–597. 1938.

COSTANTINE, M.M. **Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy.** *Frontier Pharmacology*, v.5, p. 65, 2014.

CORVINO, S.B. *et al.* **Physiological and biochemical measurements before, during and after pregnancy of healthy rats.** *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 30, n. 10, 668–674, 2015.

COUCEYRO, P.R. *et al.* **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides modulate the locomotor and motivational properties of psychostimulants.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 315, n.3, p. 1091-1100, 2005.

CRIPPS, A.W.; WILLIAMS, V.J. **The effect of pregnancy and lactation on food intake, gastrointestinal anatomy and the absorptive capacity of the small intestine in the albino rat.** *British Journal of Nutrition*, v. 33, n.1, p. 17-32, 1975.

Da SILVA NETO, L. *et al.* **Calix[n]arene-based immunogens: A new non-proteic strategy for anti-cocaine vaccine.** *Journal of Advanced Reserach*. v. 13, n. 38, p. 285-298, 2021.

DE ALMEIDA AUGUSTO, P.S. *et al.* **The GNE-KLH anti-cocaine vaccine protects dams and offspring from cocaine-induced effects during the prenatal and lactating periods.** *Molecular Psychiatry*, v. 26, n.12, p. 7784-7791, 2021.

DE FÁTIMA, A. *et al.* **Calixarenes as new platforms for drug design.** *Current Drug Discovery Technologies*, v. 6, n. 2, p. 151-170, 2009.

DEMERS-MATHIEU, V. *et al.* **Comparison of human milk immunoglobulin survival during gastric digestion between preterm and term infants.** *Nutrients*, v. 10, n. 5, p. 631-644, 2018.

DOS SANTOS, J.F. *et al.* **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. *et al.* **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.

ERLEBACHER, A. **Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus.** *Nature Reviews, Immunology*, v. 13, n.1, p. 23-33, 2013.

ERHARDT, E. *et al.* **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.

FALCK, R.S. *et al.* **The prevalence and correlates of depressive symptomatology among a community sample of crack-cocaine smokers.** *Journal of Psychoactive Drugs*. v. 34, n. 3, p.281 - 288, 2002.

FATIMA, A. *et al.* **Molecules that stimulate the immune system for treatment of drug addiction, methods of synthesis, antidrug vaccine drug use.** *United States patent*, 2020.

FOUDA, G.G. *et al.* **The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity.** *Immunohorizons*, v.2, n.1, p. 14-25, 2018.

FOX, B. S. *et al.* **Efficacy of a therapeutic cocaine vaccine in rodent models.** *Nature Medicine*, v. 2, n. 10, p. 1129-1132, 1996.

Fox B.S. **Development of a therapeutic vaccine for the treatment of cocaine addiction.** *Drug and Alcohol Dependence*, v. 48, n.3, p. 153-158, 1997.

GERACI, C. *et al.* **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.

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

GONZALEZ, C.A.; GONZALEZ, S. **Fetal and neonatal allo-immune response.** *Transfusion Apheresis Science*, v. 59, n.5, p. 102945, 2020.

HAMMOND, K.A. **Adaptation of the maternal intestine during lactation.** *Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 2, n.3, p. 243-252, 1997.

HANEY, M. **Cocaine-specific antibodies blunt the subjective effects of smoked cocaine in humans.** *Biological Psychiatry*, v. 67, n.1, p. 59-65, 2010.

HARVEY, J.A. **Cocaine effects on the developing brain: current status.** *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v. 27, n.8, p. 751-764, 2004.

HEALY, C.M.; RENCH, M.A.; BAKER, C.J. **Importance of timing of maternal combined tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization and protection of young infants.** *Clinical Infectious Disease*, v. 56, n.4, p. 539-544, 2013.

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.

HOWARD, C.R.; LAWRENCE, R.A. **Breast-feeding and drug exposure.** *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, v. 25, n.1, 195–217, 1998.

JONES, E.A.; WALDMANN, T.A. **The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat.** *The Journal Clinical Investigation*, v. 51, n.11, p. 2916-2927, 1972.

JOHNS, J.M. *et al.* **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.

KANTAK K.M. *et al.* **Evaluation of anti-cocaine antibodies and a cocaine vaccine in a rat self-administration model.** *Psychopharmacology*, v. 148, n. 3, p. 251-262, 2000.

KARILA, L. *et al.* **Pharmacological treatments for cocaine dependence is there something new.** *Current pharmaceutical design*, v. 17, n.14, p. 1359-1368, 2011.

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

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

KOSTEN, T.R. *et al.* **Human therapeutic cocaine vaccine: safety and immunogenicity.** *Vaccine*, v. 20, n. 7-8, p. 1196-1204, 2002.

KOSTEN, T.R. *et al.* **Vaccine for cocaine dependence: a randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial.** *Drug and Alcohol Dependence*. v, 140, p. 42-47, 2014.

KOOB, G. *et al.* **Anti-cocaine vaccine based on coupling a cocaine analog to a disrupted adenovirus.** *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, v. 10, n.8, p.899-904, 2011.

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

LATUSKIE, K. A. *et al.* **Reasons for substance use continuation and discontinuation during pregnancy: A qualitative study.** *Women and Birth*. 2018.

LOCKNER, J.W. *et al.* **Flagellin as Carrier and Adjuvant in Cocaine Vaccine Development.** *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 653–662, 2015.

LOWELL, J.A. *et al.* **Vaccination against cocaine using a modifiable dendrimer nanoparticle platform.** *Vaccine*, v. 38, n. 50, p. 7989-7997, 2020.

LOZANO, N.A. *et al.* **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.

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

MARCHANT, A. *et al.* **Maternal immunization: collaborating with mother nature**. *The Lancet, Infectious Disease*, v. 17, n.7, p.197-208, 2017.

MARTELL, B.A. *et al.* **Vaccine pharmacotherapy for the treatment of cocaine dependence**. *Biological Psychiatry*, v. 58, n.2, p.158-164, 2005.

McGREGOR I.A. *et al.* **Plasma immunoglobulin concentrations in an African (Gambian) community in relation to season, malaria and other infections and pregnancy**. *Clinical and Experimental Immunology*, v.7, n.1, p. 51-74, 1970.

McMURRAY, M.S. *et al.* **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. *et al.* **Effect of prenatal cocaine on early postnatal thermoregulation and ultrasonic vocalization production**. *Frontiers in Psychology*, v. 4, p. 1-13, 2013.

MINNES, S. *et al.* **Cocaine use during pregnancy and health outcome after 10 years**. *Drug and Alcohol Dependence*, v.126, n.1-2, p. 71-79, 2012.

MINNES, S. *et al.* **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.

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.

NASEER, M. M.; AHMED, M.; HAMEED, S. **Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents**. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 89, n. 2, p. 243-256, 2017.

NASIDI, A. *et al.* **Yellow fever vaccination and pregnancy: a four-year prospective study**. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n.3, p. 337-339, 1993.

NIEWIESK, S. **Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies**. *Frontiers and Immunology*, v. 16, n. 5, p. 446, 2014.

NEVES, M.P.; FILHO, J.M.; MENEZES E.W.D. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação.** FCF-IQ/USP, 2013.

OEI, J. *et al.* **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.

PALMEIRA, P. *et al.* **IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies.** *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, ID. 985646, p. 1-13, 2012.

PAUL, H.A., HALLAM, M.C., REIMER, R.A. **Milk Collection in the Rat Using Capillary Tubes and Estimation of Milk Fat Content by Creamatocrit.** *Journal of Visualized Experiments*, v. 106, p. 53476, 2015.

PEEKE, H.V.S. *et al.* **Cocaine exposure prebreeding to weaning: maternal and offspring effects.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 48, n. 2, p. 403-410, 1994.

PENTSUK, N.; VAN DER LAAN, J.W. **Interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies.** *Birth Defects Research. Part B Developmental Reproductive Toxicology*, v. 86, n.4, p. 328-344, 2009.

PEREIRA, C. *et al.* **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. 9, p. 518-526, 2018.

PEREIRA, R. L. G. **Comparação de técnicas de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anticocaína tipo IgG em camundongos.** Orientador: Frederico Duarte Garcia. Coorientador: Sordaini Maria Caligiorne. 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), n. 11, p. 151-170, 2014.

POU, C. *et al.* **The repertoire of maternal anti-viral antibodies in human newborns.** *Nature Medicine*, v. 25, n.4, p. 591-596, 2019.

PYZIK, M. *et al.* **The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer?.** *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1540, 2019.

RAO, H. *et al.* **Altered resting cerebral blood flow in adolescents with in utero cocaine exposure revealed by perfusion functional MRI.** *Pediatrics*, v. 120, n. 5, 1245-1254, 2007.

RICHARDSON, G.A. *et al.* **Effects of prenatal cocaine exposure on adolescent development.** *Neurotoxicology and Teratology*, v.49, p.41-48, 2015.

RODEWALD, R. **Selective antibody transport in the proximal small intestine of the neonatal rat.** *The Journal of Cell Biology*, v. 45, n.3, 635-640, 1970.

RODEWALD, R. **Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat.** *The Journal of Cell Biology*, v. 85, n.1, p. 18-32, 1980.

SABATO, B. *et al.* **Safety and immunogenicity of the anti-cocaine vaccine UFMG-VAC-V4N2 in a non-human primate model.** *Vaccine*, v. 41, n. 13, p. 2127-2136, 2023.

SANSONE, F. *et al.* **Calixarenes: from biomimetic receptors to multivalent ligands for biomolecular recognition.** *New Journal of Chemistry*, v. 34, n.12, p. 2715-2728, 2010.

SASO, A.; KAMPMANN, B. **Maternal Immunization: Nature Meets Nurture.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p.1499, 2020.

SAYÃO, L.S; SALES, L.F; FELIPE, C.B.M. **Invisible science: publication of negative research results.** *Transinformação*, v. 33, 2021.

SCHLAUDECKER, E.P. *et al.* **Pregnancy modifies the antibody response to trivalent influenza immunization.** *The Journal of Infectious Disease*, v. 206, n.11, p.1670-3, 2012.

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

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.

SOUZA, L.C.R. **Avaliação da segurança das moléculas de V4N2 e V8N2 para o tratamento da dependência de cocaína em modelos in vitro e in vivo.** 2018. Dissertação (Mestrado em Análises clínicas e toxicológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

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

TAKAHASHI, T.T.; VENGELIENE, V.; SPANAGEL, R. **Melatonin reduces motivation for cocaine self-administration and prevents relapse-like behavior in rats.** *Psychopharmacology*, v. 234, n.11, p. 1741-1748, 2017.

TUAILLON, E. *et al.* **Human milk-derived B cells: a highly activated switched memory cell population primed to secrete antibodies.** *Journal of Immunology*, v. 182, n.11, p. 7155-7162, 2009.

VAN DE PERRE, P. **Transfer of antibody via mother's milk.** *Vaccine*, v.21, n.24, p. 3374-3376, 2003.

VAN DEN BERG, J.P. *et al.* **Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature.** *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 87, n.2, p. 67-72, 2010.

VAREJÃO, E.V.; De FÁTIMA, A.; FERNANDES, S.A. **Calix[n]arenes as goldmines for the development of chemical entities of pharmaceutical interest.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, n.36, p. 6507-6521, 2013.

WENTHUR, C.J. *et al.* **Augmenting the efficacy of anti-cocaine catalytic antibodies through chimeric hapten design and combinatorial vaccination.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 27, n.16, p. 3666-3668, 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines**, 2013.

WILTSHIRE, T. *et al.* **Initial locomotor sensitivity to cocaine varies widely among inbred mouse strains.** *Genes, Brain and Behavior*, v. 14, n. 3, p. 271-280, 2015.

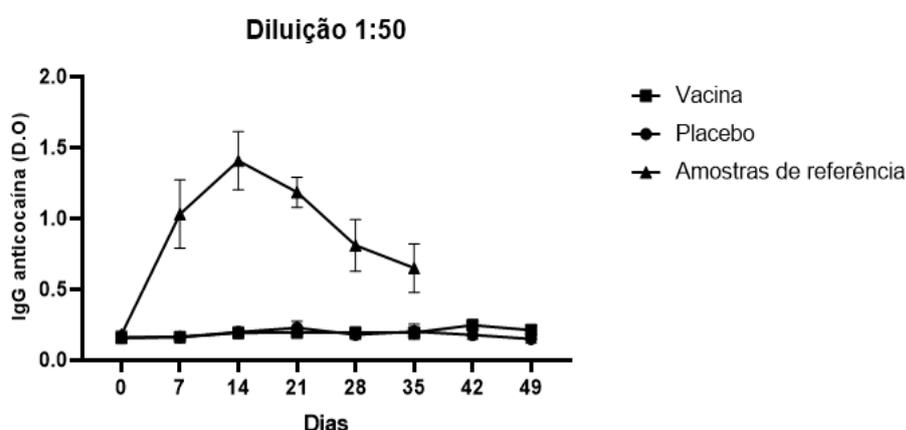
YOSHIDA, M. *et al.* **Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells.** *Immunity*, v. 20, n. 6, p. 769-783, 2004.

ZHANG, R.; ULERY, B.D. **Synthetic vaccine characterization and design.** *Journal of Bionanoscience*, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2018.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Quantificação de anticorpos IgG anticocaína pelo método de ELISA e suas variações

**Figura 1** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas diluídas em 1:50, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsorviva



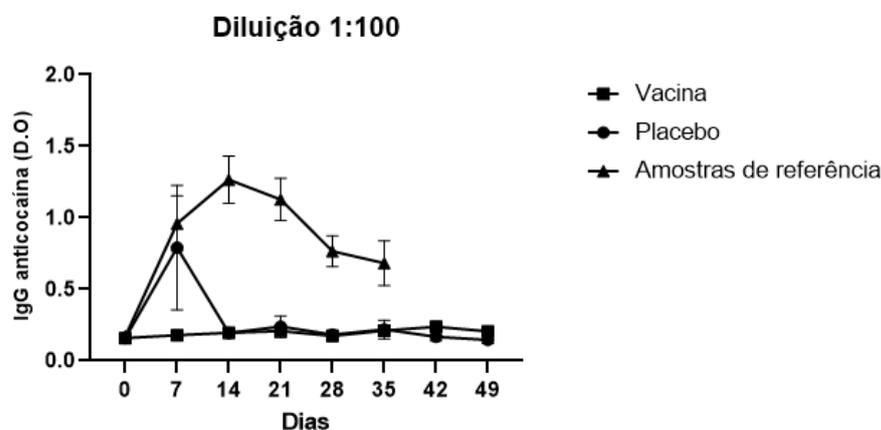
**Tabela 1** - Títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:50, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsorviva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo				Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)		
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T0</b>	0,158 ± 0,01	0,160 ± 0,025	<i>p</i> =0,997	0,158 ± 0,01	0,182 ± 0,024	<i>p</i> = 0,378
<b>T7</b>	0,163 ± 0,008	0,163 ± 0,018	<i>p</i> = 0,997	0,163 ± 0,008	1,031 ± 0,241	<i>p</i> = 0,021*
<b>T14</b>	0,193 ± 0,002	0,199 ± 0,033	<i>p</i> = 0,997	0,193 ± 0,002	1,408 ± 0,204	<i>p</i> = 0,006*
<b>T21</b>	0,195 ± 0,009	0,229 ± 0,463	<i>p</i> = 0,802	0,195 ± 0,009	1,185 ± 0,106	<i>p</i> = 0,001*
<b>T28</b>	0,195 ± 0,016	0,181 ± 0,034	<i>p</i> = 0,971	0,195 ± 0,016	0,810 ± 0,182	<i>p</i> = 0,021*
<b>T35</b>	0,195 ± 0,022	0,201 ± 0,054	<i>p</i> = 0,997	0,195 ± 0,022	0,650 ± 0,171	<i>p</i> = 0,024*

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo				Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)		
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T42</b>	0,247 ± 0,028	0,178 ± 0,031	<i>p</i> = 0,138	0,247 ± 0,028	s.a	-
<b>T49</b>	0,212 ± 0,030	0,150 ± 0,028	<i>p</i> = 0,169	0,212 ± 0,030	s.a	-

s.a = sem amostra; \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vacina e A.R; - Indica sem valor para *p* valor.

**Figura 2** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas em 1:100, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 mg/mL cocaína fixados em fase adortiva



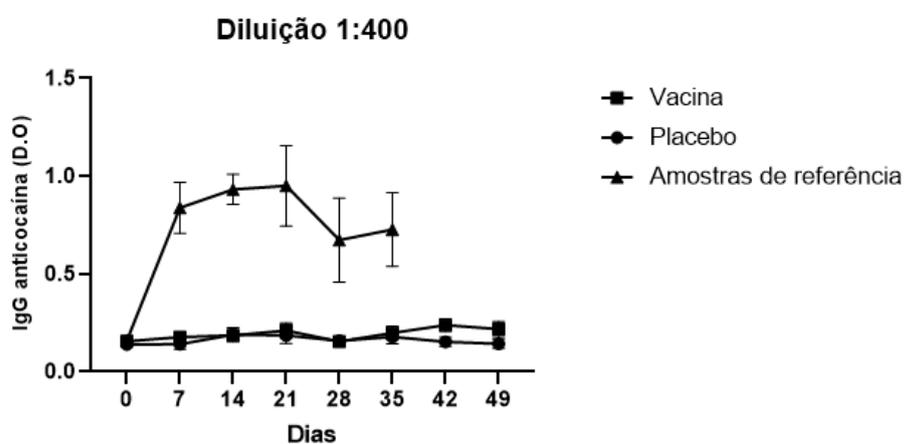
**Tabela 2** - Títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:100, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo				Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)		
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T0</b>	0,159 ± 0,003	0,159 ± 0,028	<i>p</i> = 0,997	0,159 ± 0,003	0,170 ± 0,01	<i>p</i> = 0,345
<b>T7</b>	0,179 ± 0,022	0,790 ± 0,434	<i>p</i> = 0,341	0,179 ± 0,022	0,959 ± 0,193	<i>p</i> = 0,001*
<b>T14</b>	0,185 ± 0,006	0,193 ± 0,036	<i>p</i> = 0,997	0,185 ± 0,006	1,266 ± 0,164	<i>p</i> = 0,005*

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo			Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)			
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T21</b>	0,208 ± 0,026	0,238 ± 0,076	<i>p</i> = 0,969	0,208 ± 0,026	1,128 ± 0,148	<i>p</i> = 0,005*
<b>T28</b>	0,173 ± 0,006	0,182 ± 0,03	<i>p</i> = 0,975	0,173 ± 0,006	0,765 ± 0,108	<i>p</i> = 0,006*
<b>T35</b>	0,211 ± 0,035	0,218 ± 0,066	<i>p</i> = 0,997	0,211 ± 0,035	0,682 ± 0,156	<i>p</i> = 0,001*
<b>T42</b>	0,237 ± 0,024	0,167 ± 0,028	<i>p</i> = 0,082	0,237 ± 0,024	s.a	-
<b>T49</b>	0,205 ± 0,017	0,146 ± 0,025	<i>p</i> = 0,082	0,205 ± 0,017	s.a	-

s.a = sem amostra; \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vacina e A.R; - Indica sem valor para *p* valor.

**Figura 3** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas em 1:400, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 mg/mL cocaína fixados em fase adsorptiva

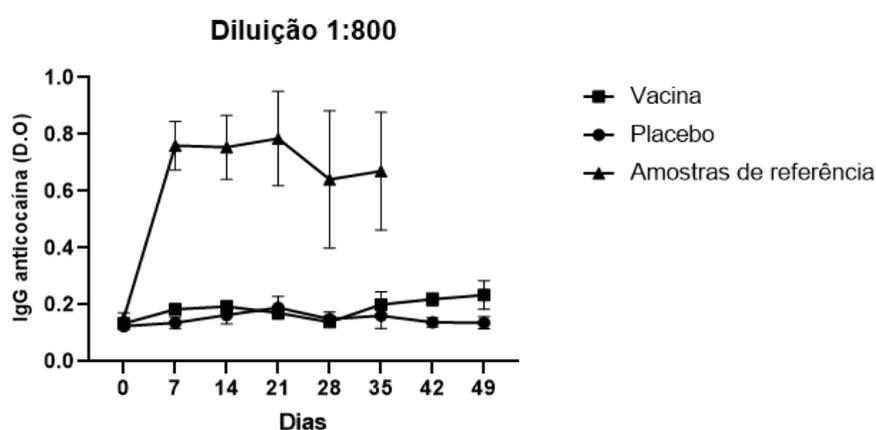


**Tabela 3** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:400, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsorptiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo			Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)			
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T0</b>	0,156 ± 0,01	0,139 ± 0,008	<i>p</i> = 0,695	0,156 ± 0,01	0,159 ± 0,01	<i>p</i> = 0,769
<b>T7</b>	0,177 ± 0,013	0,140 ± 0,025	<i>p</i> = 0,283	0,177 ± 0,013	0,838 ± 0,138*	<i>p</i> = 0,009*
<b>T14</b>	0,185 ± 0,007	0,189 ± 0,035	<i>p</i> = 0,945	0,185 ± 0,007	0,932 ± 0,077*	<i>p</i> = 0,001*
<b>T21</b>	0,210 ± 0,038	0,185 ± 0,041	<i>p</i> = 0,888	0,210 ± 0,038	0,950 ± 0,206*	<i>p</i> = 0,018*
<b>T28</b>	0,154 ± 0,011	0,157 ± 0,019	<i>p</i> = 0,945	0,154 ± 0,011	0,673 ± 0,215	<i>p</i> = 0,033*
<b>T35</b>	0,197 ± 0,034	0,178 ± 0,035	<i>p</i> = 0,888	0,197 ± 0,034	0,727 ± 0,188*	<i>p</i> = 0,029*
<b>T42</b>	0,237 ± 0,03	0,153 ± 0,023	<i>p</i> = 0,044	0,237 ± 0,03	s.a	-
<b>T49</b>	0,217 ± 0,04	0,143 ± 0,024	<i>p</i> = 0,173	0,217 ± 0,04	s.a	-

s.a = sem amostra; \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vacina e A.R; - Indica sem valor para *p* valor.

**Figura 4** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas diluídas em 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

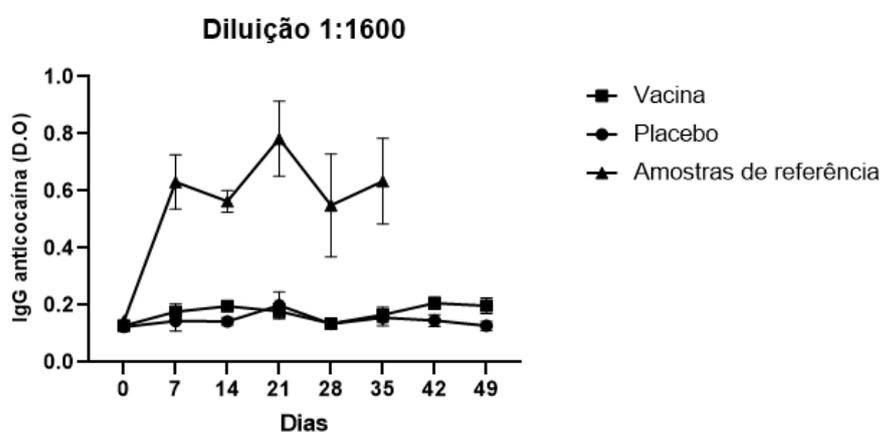


**Tabela 4** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo			Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)			
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T0</b>	0,133 ± 0,002	0,124 ± 0,011	<i>p</i> = 0,817	0,133 ± 0,002	0,152 ± 0,018	<i>p</i> = 0,386
<b>T7</b>	0,183 ± 0,018	0,136 ± 0,02	<i>p</i> = 0,100	0,183 ± 0,018	0,760 ± 0,085	<i>p</i> = 0,003*
<b>T14</b>	0,193 ± 0,009	0,163 ± 0,03	<i>p</i> = 0,537	0,193 ± 0,009	0,754 ± 0,112	<i>p</i> = 0,010*
<b>T21</b>	0,171 ± 0,004	0,189 ± 0,039	<i>p</i> = 0,817	0,171 ± 0,004	0,785 ± 0,166	<i>p</i> = 0,020*
<b>T28</b>	0,139 ± 0,009	0,149 ± 0,024	<i>p</i> = 0,817	0,139 ± 0,009	0,641 ± 0,241	<i>p</i> = 0,052
<b>T35</b>	0,200 ± 0,044	0,161 ± 0,045	<i>p</i> = 0,713	0,200 ± 0,044	0,670 ± 0,207	<i>p</i> = 0,052
<b>T42</b>	0,219 ± 0,022	0,137 ± 0,016	<i>p</i> = 0,011	0,219 ± 0,022	s.a	-
<b>T49</b>	0,234 ± 0,05	0,136 ± 0,021	<i>p</i> = 0,132	0,234 ± 0,05	s.a	-

s.a = sem amostra; \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vacina e A.R; - Indica sem valor para *p* valor.

**Figura 5** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas diluídas em 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

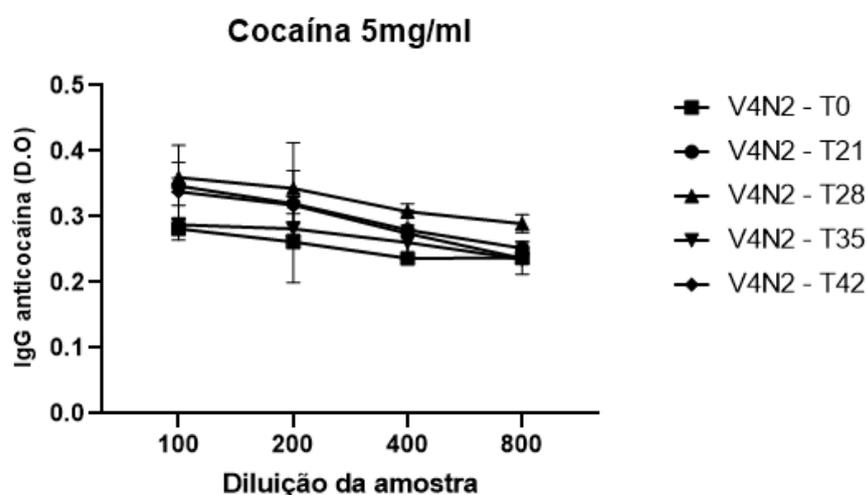


**Tabela 5** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 no protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
Vacina vs. Placebo			Vacina vs. Amostras de Referência (A.R)			
	Vacina	Placebo	<i>p</i> valor	Vacina	A. R	<i>p</i> valor
<b>T0</b>	0,127 ± 0,005	0,124 ± 0,009	<i>p</i> = 0,999	0,127 ± 0,005	0,143 ± 0,003	<i>p</i> = 0,109
<b>T7</b>	0,177 ± 0,026	0,144 ± 0,034	<i>p</i> = 0,999	0,177 ± 0,026	0,631 ± 0,094	<i>p</i> = 0,007*
<b>T14</b>	0,196 ± 0,011	0,143 ± 0,014	<i>p</i> = 0,009	0,196 ± 0,011	0,563 ± 0,038	<i>p</i> = 0,0007*
<b>T21</b>	0,178 ± 0,025	0,199 ± 0,046	<i>p</i> = 0,999	0,178 ± 0,025	0,783 ± 0,13	<i>p</i> = 0,008*
<b>T28</b>	0,135 ± 0,008	0,134 ± 0,016	<i>p</i> = 0,999	0,135 ± 0,008	0,549 ± 0,18	<i>p</i> = 0,037*
<b>T35</b>	0,166 ± 0,026	0,156 ± 0,028	<i>p</i> = 0,999	0,166 ± 0,026	0,633 ± 0,15	<i>p</i> = 0,021*
<b>T42</b>	0,206 ± 0,021	0,146 ± 0,02	<i>p</i> = 0,050	0,206 ± 0,021	s.a	-
<b>T49</b>	0,197 ± 0,027	0,127 ± 0,015	<i>p</i> = 0,062	0,197 ± 0,027	s.a	-

s.a = sem amostra; \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vacina e A.R; - Indica sem valor para *p* valor.

**Figura 6** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 5 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

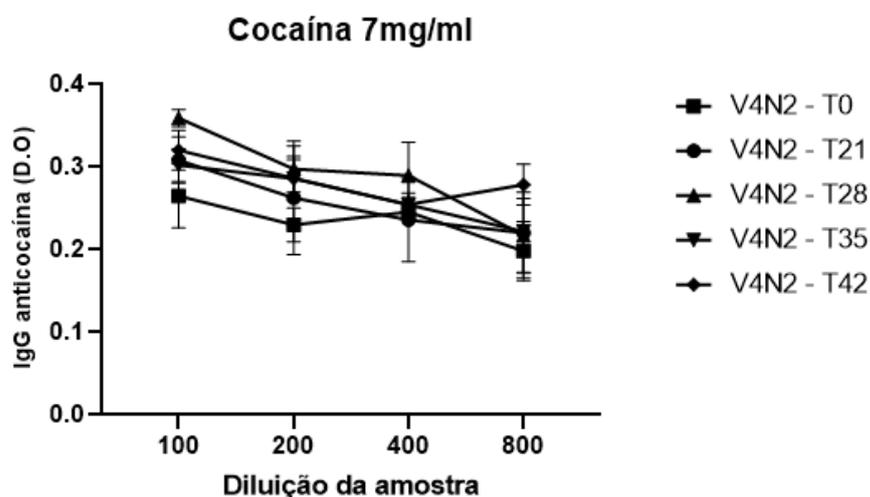


**Tabela 6** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:800, expressos em

densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 21, 28, 35, 42 no protocolo com 5 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T21				T0 vs T28		
Diluição	T0	T21	<i>p</i> valor	T0	T28	<i>p</i> valor
1:100	0,281 ± 0,017	0,347 ± 0,061	<i>p</i> = 0,448	0,281 ± 0,017	0,359 ± 0,022	<i>p</i> = 0,391
1:200	0,261 ± 0,062	0,320 ± 0,05	<i>p</i> = 0,595	0,261 ± 0,062	0,343 ± 0,069	<i>p</i> = 0,156
1:400	0,236 ± 0,008	0,270 ± 0,04	<i>p</i> = 0,428	0,236 ± 0,008	0,307 ± 0,001	<i>p</i> = 0,156
1:800	0,237 ± 0,024	0,251 ± 0,009	<i>p</i> = 0,405	0,237 ± 0,024	0,289 ± 0,013	<i>p</i> = 0,391
T0 vs T35				T0 vs T42		
Diluição	T0	T35	<i>p</i> valor	T0	T42	<i>p</i> valor
1:100	0,281 ± 0,017	0,287 ± 0,007	<i>p</i> = 0,543	0,281 ± 0,017	0,338 ± 0,02	<i>p</i> = 0,282
1:200	0,261 ± 0,062	0,281 ± 0,01	<i>p</i> = 0,680	0,261 ± 0,062	0,317 ± 0,012	<i>p</i> = 0,354
1:400	0,236 ± 0,008	0,260 ± 0,025	<i>p</i> = 0,298	0,236 ± 0,008	0,274 ± 0,002	<i>p</i> = 0,136
1:800	0,237 ± 0,024	0,235 ± 0,004	<i>p</i> = 0,936	0,237 ± 0,024	0,236 ± 0,007	<i>p</i> = 0,966

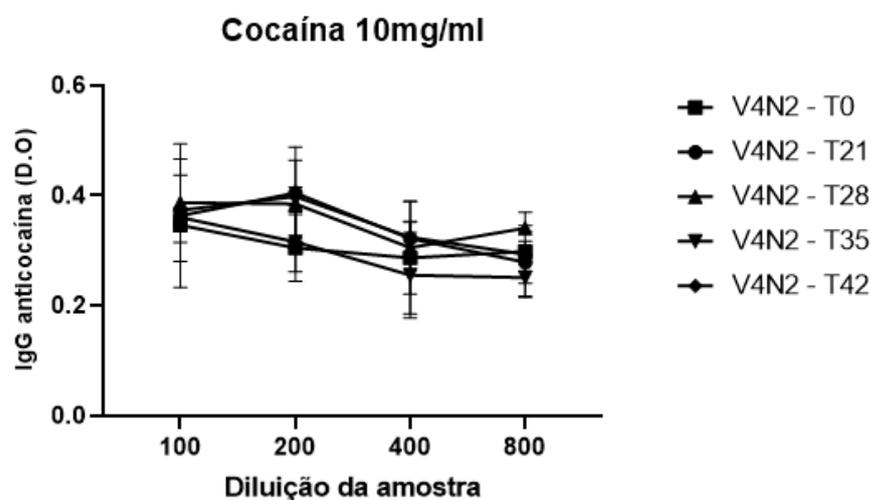
**Figura 7** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 7 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva



**Tabela 7** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 21, 28, 35, 42 no protocolo com 7 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T21				T0 vs T28		
Diluição	T0	T21	<i>p</i> valor	T0	T28	<i>p</i> valor
1:100	0,264 ± 0,038	0,308 ± 0,028	<i>p</i> = 0,108	0,264 ± 0,038	0,358 ± 0,01	<i>p</i> = 0,133
1:200	0,229 ± 0,02	0,262 ± 0,068	<i>p</i> = 0,695	0,229 ± 0,02	0,297 ± 0,027	<i>p</i> = 0,296
1:400	0,245 ± 0,001	0,235 ± 0,05	<i>p</i> = 0,835	0,245 ± 0,001	0,289 ± 0,04	<i>p</i> = 0,367
1:800	0,197 ± 0,035	0,219 ± 0,048	<i>p</i> = 0,773	0,197 ± 0,035	0,216 ± 0,044	<i>p</i> = 0,795
T0 vs T35				T0 vs T42		
Diluição	T0	T35	<i>p</i> valor	T0	T42	<i>p</i> valor
1:100	0,264 ± 0,038	0,301 ± 0,019	<i>p</i> = 0,528	0,264 ± 0,038	0,319 ± 0,023	<i>p</i> = 0,119
1:200	0,229 ± 0,02	0,285 ± 0,022	<i>p</i> = 0,081	0,229 ± 0,02	0,285 ± 0,026	<i>p</i> = 0,339
1:400	0,245 ± 0,001	0,253 ± 0,014	<i>p</i> = 0,584	0,245 ± 0,001	0,254 ± 0,008	<i>p</i> = 0,355
1:800	0,197 ± 0,035	0,221 ± 0,056	<i>p</i> = 0,584	0,197 ± 0,035	0,278 ± 0,024	<i>p</i> = 0,311

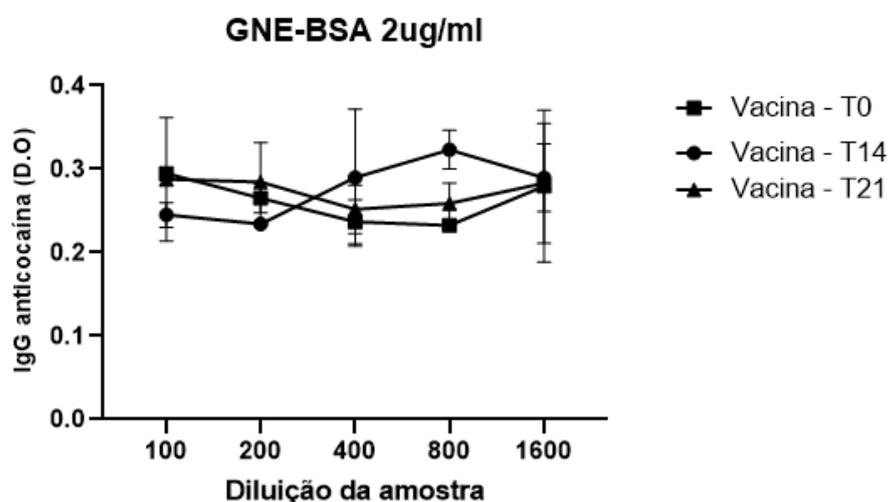
**Figura 8** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 10 mg/mL cocaína fixados em fase adsortiva



**Tabela 8** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 21, 28, 35, 42 no protocolo com 10 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T21				T0 vs T28		
Diluição	T0	T21	<i>p</i> valor	T0	T28	<i>p</i> valor
1:100	0,346 ± 0,031	0,363 ± 0,13	<i>p</i> = 0,906	0,346 ± 0,031	0,387 ± 0,05	<i>p</i> = 0,199
1:200	0,305 ± 0,06	0,404 ± 0,083	<i>p</i> = 0,506	0,305 ± 0,06	0,384 ± 0,079	<i>p</i> = 0,106
1:400	0,286 ± 0,102	0,322 ± 0,031	<i>p</i> = 0,772	0,286 ± 0,102	0,305 ± 0,084	<i>p</i> = 0,371
1:800	0,298 ± 0,008	0,278 ± 0,038	<i>p</i> = 0,660	0,298 ± 0,008	0,340 ± 0,005	<i>p</i> = 0,145
T0 vs T35				T0 vs T42		
Diluição	T0	T35	<i>p</i> valor	T0	T42	<i>p</i> valor
1:100	0,346 ± 0,031	0,360 ± 0,001	<i>p</i> = 0,643	0,346 ± 0,031	0,373 ± 0,092	<i>p</i> = 0,812
1:200	0,305 ± 0,06	0,316 ± 0,054	<i>p</i> = 0,248	0,305 ± 0,06	0,398 ± 0,016	<i>p</i> = 0,338
1:400	0,286 ± 0,102	0,255 ± 0,077	<i>p</i> = 0,314	0,286 ± 0,102	0,324 ± 0,027	<i>p</i> = 0,607
1:800	0,298 ± 0,008	0,251 ± 0,036	<i>p</i> = 0,248	0,298 ± 0,008	0,293 ± 0,076	<i>p</i> = 0,947

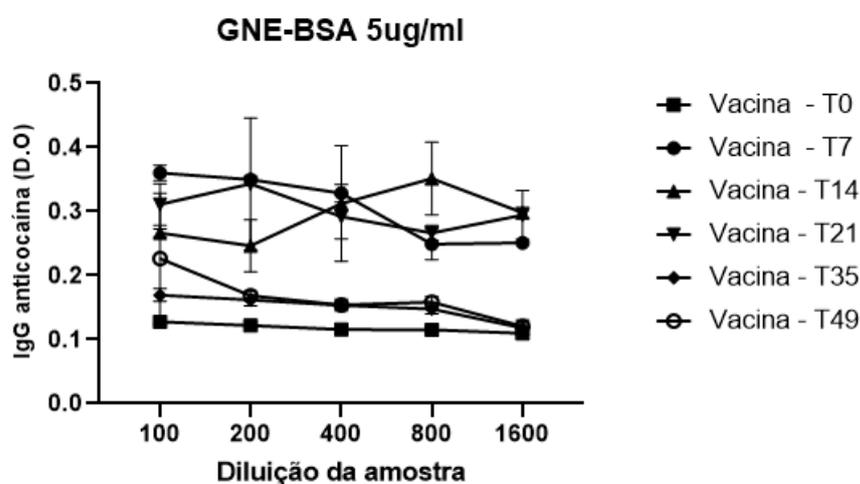
**Figura 9** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:800, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 2 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva



**Tabela 9** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 14 e 21 no protocolo com 2 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T14				T0 vs T21		
Diluição	T0	T14	<i>p</i> valor	T0	T21	<i>p</i> valor
1:100	0,294 ± 0,007	0,245 ± 0,014	<i>p</i> = 0,063	0,294 ± 0,007	0,305 ± 0,073	<i>p</i> = 0,922
1:200	0,265 ± 0,017	0,234 ± 0,001	<i>p</i> = 0,225	0,265 ± 0,017	0,321 ± 0,047	<i>p</i> = 0,091
1:400	0,237 ± 0,026	0,280 ± 0,082	<i>p</i> = 0,615	0,237 ± 0,026	0,273 ± 0,029	<i>p</i> = 0,050
1:800	0,232 ± 0,000	0,323 ± 0,023	<i>p</i> = 0,117	0,232 ± 0,0007	0,269 ± 0,024	<i>p</i> = 0,360
1:1600	0,279 ± 0,09	0,289 ± 0,04	<i>p</i> = 0,931	0,279 ± 0,09	0,230 ± 0,071	<i>p</i> = 0,636

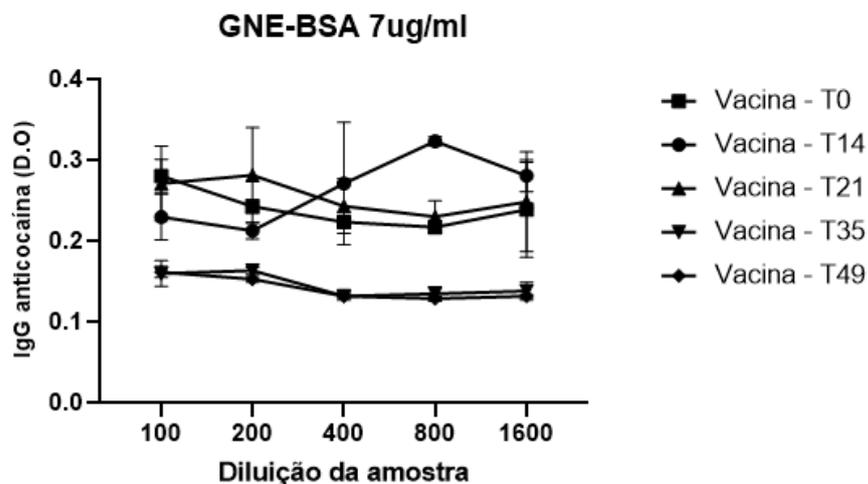
**Figura 10** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 5 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva



**Tabela 10** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 7, 14, 21, 35 e 49 no protocolo com 5 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T7				T0 vs T14		
Diluição	T0	T7	<i>p</i> valor	T0	T14	<i>p</i> valor
1:100	0,127 ± 0,001	0,360 ± 0,012	p = 0,106	0,127 ± 0,001	0,266 ± 0,006	p = 0,067
1:200	0,121 ± 0,004	0,350 ± 0,005	p = 0,100	0,121 ± 0,004	0,246 ± 0,04	p = 0,306
1:400	0,115 ± 0,004	0,328 ± 0,013	p = 0,103	0,115 ± 0,004	0,312 ± 0,09	p = 0,306
1:800	0,115 ± 0,004	0,249 ± 0,024	p = 0,475	0,115 ± 0,004	0,351 ± 0,056	p = 0,306
1:1600	0,109 ± 0,002	0,251 ± 0	p = 0,040	0,109 ± 0,002	0,298 ± 0,008	p = 0,067
T0 vs T21				T0 vs T35		
Diluição	T0	T35	<i>p</i> valor	T0	T42	<i>p</i> valor
1:100	0,127 ± 0,001	0,301 ± 0,032	p = 0,212	0,127 ± 0,001	0,169 ± 0,009	p = 0,306
1:200	0,121 ± 0,004	0,429 ± 0,103	p = 0,168	0,121 ± 0,004	0,161 ± 0,009	p = 0,185
1:400	0,115 ± 0,004	0,307 ± 0,034	p = 0,212	0,115 ± 0,004	0,153 ± 0,005	p = 0,096
1:800	0,115 ± 0,004	0,271 ± 0,011	p = 0,168	0,115 ± 0,004	0,147 ± 0,007	p = 0,306
1:1600	0,109 ± 0,002	0,267 ± 0,038	p = 0,085	0,109 ± 0,002	0,118 ± 0,009	p = 0,337
T0 vs 49						
Diluição	T0	T49	<i>p</i> valor			
1:100	0,127 ± 0,001	0,226 ± 0,102	p = 0,399			
1:200	0,121 ± 0,004	0,168 ± 0,007	p = 0,111			
1:400	0,115 ± 0,004	0,154 ± 0,009	p = 0,153			
1:800	0,115 ± 0,004	0,158 ± 0,008	p = 0,133			
1:1600	0,109 ± 0,002	0,120 ± 0,01	p = 0,299			

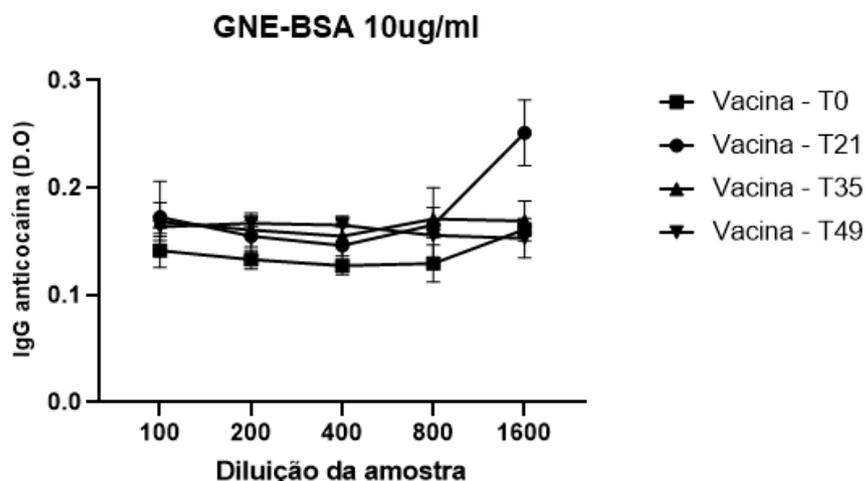
**Figura 11** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 7 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva



**Tabela 11** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaina em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 14, 21, 35 e 49 no protocolo com 7 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T14				T0 vs T21		
Diluição	T0	T14	<i>p</i> valor	T0	T21	<i>p</i> valor
1:100	0,280 ± 0,02	0,229 ± 0,028	<i>p</i> = 0,203	0,280 ± 0,02	0,285 ± 0,046	<i>p</i> = 0,952
1:200	0,242 ± 0,008	0,212 ± 0,01	<i>p</i> = 0,153	0,242 ± 0,008	0,327 ± 0,058	<i>p</i> = 0,106
1:400	0,223 ± 0,002	0,271 ± 0,075	<i>p</i> = 0,795	0,223 ± 0,002	0,269 ± 0,033	<i>p</i> = 0,175
1:800	0,217 ± 0,007	0,323 ± 0,005	<i>p</i> = 0,203	0,217 ± 0,007	0,242 ± 0,019	<i>p</i> = 0,219
1:1600	0,238 ± 0,058	0,280 ± 0,019	<i>p</i> = 0,795	0,238 ± 0,058	0,219 ± 0,061	<i>p</i> = 0,700
T0 vs T35				T0 vs T49		
Diluição	T0	T35	<i>p</i> valor	T0	T49	<i>p</i> valor
1:100	0,280 ± 0,02	0,160 ± 0,015	<i>p</i> = 0,250	0,280 ± 0,02	0,161 ± 0,006	<i>p</i> = 0,195
1:200	0,242 ± 0,008	0,163 ± 0,004	<i>p</i> = 0,193	0,242 ± 0,008	0,152 ± 0,003	<i>p</i> = 0,087
1:400	0,223 ± 0,002	0,132 ± 0,005	<i>p</i> = 0,149	0,223 ± 0,002	0,131 ± 0,002	<i>p</i> = 0,001
1:800	0,217 ± 0,007	0,134 ± 0,008	<i>p</i> = 0,034	0,217 ± 0,007	0,128 ± 0,002	<i>p</i> = 0,087
1:1600	0,238 ± 0,058	0,138 ± 0,01	<i>p</i> = 0,250	0,238 ± 0,058	0,132 ± 0,001	<i>p</i> = 0,243

**Figura 12** - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno diluídas de 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), no protocolo com 10 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva



**Tabela 12** - Médias e desvio padrão dos títulos de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue materno, diluídas em 1:100 a 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O), nos tempos 0, 21, 35 e 49 no protocolo com 10 µg/mL de GNE-BSA fixados em fase adsortiva

Média ± Desvio padrão da média (SD) e <i>p</i> valor						
T0 vs T21				T0 vs T35		
Diluição	T0	T7	<i>p</i> valor	T0	T14	<i>p</i> valor
1:100	0,141 ± 0,015	0,172 ± 0,033	<i>p</i> = 0,782	0,141 ± 0,015	0,168 ± 0,017	<i>p</i> = 0,721
1:200	0,133 ± 0,008	0,154 ± 0,018	<i>p</i> = 0,593	0,133 ± 0,008	0,160 ± 0,015	<i>p</i> = 0,387
1:400	0,127 ± 0,004	0,146 ± 0,026	<i>p</i> = 0,782	0,127 ± 0,004	0,154 ± 0,018	<i>p</i> = 0,721
1:800	0,129 ± 0,017	0,165 ± 0,034	<i>p</i> = 0,593	0,129 ± 0,017	0,170 ± 0,01	<i>p</i> = 0,307
1:1600	0,161 ± 0,026	0,251 ± 0,03	<i>p</i> = 0,096	0,161 ± 0,026	0,169 ± 0,002	<i>p</i> = 0,757

T0 vs 49			
Diluição	T0	T49	<i>p</i> valor
1:100	0,141 ± 0,015	0,163 ± 0,008	<i>p</i> = 0,667
1:200	0,133 ± 0,008	0,167 ± 0,002	<i>p</i> = 0,263
1:400	0,127 ± 0,004	0,165 ± 0,001	<i>p</i> = 0,165

<b>T0 vs 49</b>			
<b>Diluição</b>	<b>T0</b>	<b>T49</b>	<b><i>p</i> valor</b>
<b>1:800</b>	0,129 ± 0,017	0,155 ± 0,002	p = 0,570
<b>1:1600</b>	0,161 ± 0,026	0,152 ± 0,002	p = 0,711

**ANEXO****ANEXO A – Certificado de análise da molécula UFMG-V4N2**

Instituto de Ciências  
Exatas Departamento de  
Química

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

<b>DATA</b>	27/04/2023
<b>EMITIDO POR</b>	HENRIQUE ESTEVES
<b>ANALITO</b>	V4N2
<b>APRESENTAÇÃO</b>	Sólido branco com cristalinidade aparente.
<b>DATA DE ANÁLISE</b>	21/10/2022
<b>ARMAZENAMENTO</b>	-20 °C

<b>TÉCNICA DE ANÁLISE</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>EQUIPAMENTO</b>	BRUKER AVANCE NEO 600 MHz
<b>MÉTODO DE ANÁLISE</b>	Polarização de spin com relaxação prolongada (zgig)
<b>PARÂMETROS</b>	(vide spectra)

### PARECER TÉCNICO

Deslocamentos químicos e multiplicidade de sinais de acordo com o descrito na literatura.<sup>1</sup> Presença de sinais duplicados para o hidrogênio carbinólico (5,49 e 5,21 ppm) na proporção de 3,869:1,000, respectivamente, sendo o sinal mais intenso referente à V4N2 e indicando provável hidrólise do grupo benzoato na estrutura da cocaína (caso ocorra, a unidade cocainérgica passará a atuar como ecgoninérgica em 20,54% das unidades de hapteno). Baseado na análise, 79,46% das unidades de hapteno contendo unidades cocainérgicas permanecem intactas na estrutura do analito.

**ANALISTA RESPONSÁVEL**

Henrique Esteves, Sc.D.

<sup>1</sup> Neto *et al.* Calix[n]arene-based immunogens: A new non-proteic strategy for anti-cocaine vaccine. *J. Adv. Res.*, 2022, 38, 285.

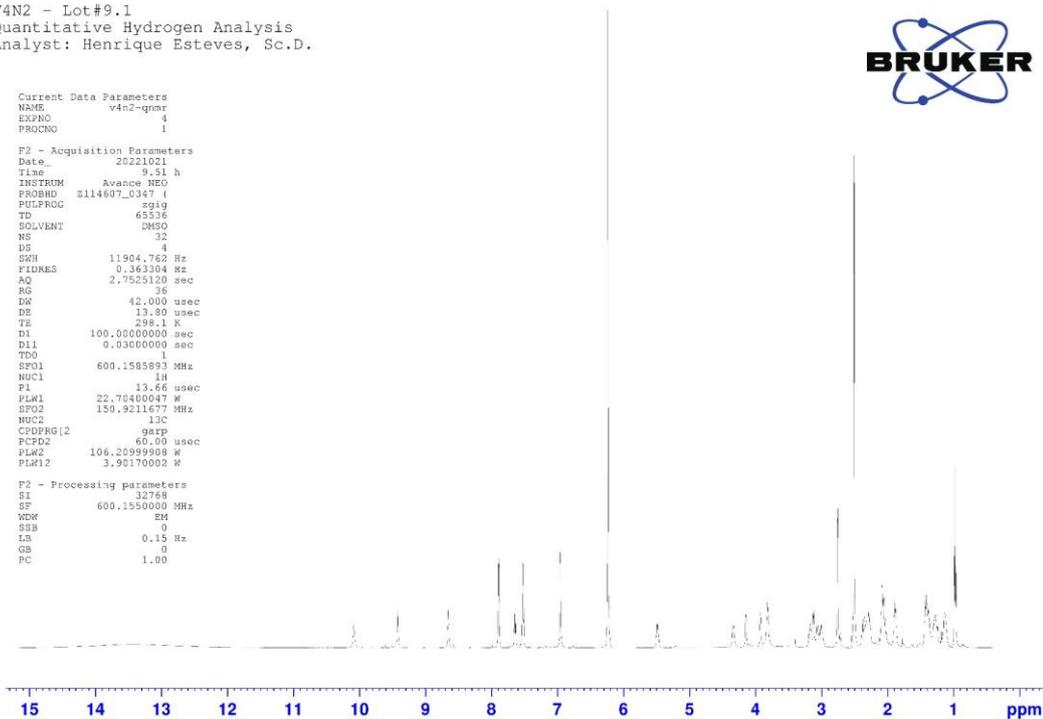
V4N2 - Lot#9.1  
Quantitative Hydrogen Analysis  
Analyst: Henrique Esteves, Sc.D.

```

Current Data Parameters
NAME          v4n2-qnmr
EXPNO        4
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20221021
Time         9.51 h
INSTRUM      Avance NEO
PROBHD       Z114607_0347 (
PULPROG      zgpg
TD           65536
SOLVENT      DMSO
NS           32
DS           4
RG           36
DM           42.000 usec
DE           13.80 usec
TE           298.1 K
D1           100.0000000 sec
D11          0.03000000 sec
TDO         1
SF01         600.1585893 MHz
NUC1         1H
P1           13.66 usec
PLW1         22.79400047 W
SF02         150.9211677 MHz
NUC2         13C
CPDPRG2      gsdp
PCPD2        60.00 usec
PLW2         106.20999908 W
PLW12        3.90170002 W

F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           600.1550000 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.15 Hz
GB           0
PC           1.00
  
```



V4N2 - Lot#9.1  
Quantitative Hydrogen Analysis  
Analyst: Henrique Esteves, Sc.D.

```

Current Data Parameters
NAME          v4n2-qnmr
EXPNO        4
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20221021
Time         9.51 h
INSTRUM      Avance NEO
PROBHD       Z114607_0347 (
PULPROG      zgpg
TD           65536
SOLVENT      DMSO
NS           32
DS           4
RG           36
DM           42.000 usec
DE           13.80 usec
TE           298.1 K
D1           100.0000000 sec
D11          0.03000000 sec
TDO         1
SF01         600.1585893 MHz
NUC1         1H
P1           13.66 usec
PLW1         22.79400047 W
SF02         150.9211677 MHz
NUC2         13C
CPDPRG2      gsdp
PCPD2        60.00 usec
PLW2         106.20999908 W
PLW12        3.90170002 W

F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           600.1550000 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.15 Hz
GB           0
PC           1.00
  
```

