

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Juliana Almeida Sad

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE SEGURANÇA DA VACINA ANTICOCAÍNA UFMG-
VAC-V4N2 EM RATAS GRÁVIDAS**

Belo Horizonte - MG
2023

Juliana Almeida Sad

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE SEGURANÇA DA VACINA ANTICOCAÍNA UFMG-
VAC-V4N2 EM RATAS GRÁVIDAS.**

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

Orientador

Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia

Co-orientadores

Profa. Dra. Maila de Castro Lourenço das

Neves

Profa. Dra. Sordaini Maria Caligiorne

Belo Horizonte - MG

2023

Sad, Juliana Almeida.
SA124e Estudo pré-clínico de segurança da vacina anticocaína UFMG-VAC-V4N2 em ratas grávidas [recursos eletrônicos]. / Juliana Almeida Sad. -- Belo Horizonte: 2023.
92f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Frederico Duarte Garcia.
Coorientador (a): Maila de Castro Lourenço das Neves; Sordaini Maria Caligiorne.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Toxicidade. 2. Vacinas. 3. Cocaína. 4. Efeitos Tardios da Exposição Pré-Natal. 5. Gravidez. 6. Dissertação Acadêmica. I. Garcia, Frederico Duarte. II. Neves, Maila de Castro Lourenço das. III. Caligiorne, Sordaini Maria. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QW 805

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



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE SEGURANÇA DA VACINA ANTI COCAÍNA UFMG-VAC-V4N2 EM RATAS GRÁVIDAS

JULIANA ALMEIDA SAD

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte de outubro de dois mil vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Frederico Duarte Garcia - Orientador
UFMG

Maila de Castro Lourenço das Neves - Coorientadora
UFMG

Sordaini Maria Caligiorne - Coorientadora
PCMG

Gisele Assis Castro Goulart
UFMG

Paula Vieira Teixeira Vidigal
UFMG

Belo Horizonte, 20 de outubro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Duarte Garcia, Professor do Magistério Superior**, em 24/10/2023, às 16:38, 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 **Sordaini Maria Caligiorne, Usuária Externa**, em 25/10/2023, às 17:39, 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 **Maila de Castro Lourenço das Neves, Professora do Magistério Superior**, em 08/11/2023, às 16:44, 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 **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Membro**, em 23/11/2023, às 08:23, 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 23/11/2023, às 17:18, 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?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2687906** e o código CRC **24102E3F**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a execução deste trabalho de alguma forma.

Aos meus orientadores Frederico Duarte Garcia e Maila de Castro Lourenço das Neves por terem confiado em mim para a execução desse trabalho.

Agradeço ao apoio da professora Sordaini Caligiorne, por sua dedicação durante todo o processo dessa pesquisa, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

Aos professores Ângelo de Fatima e Gisele Goulart pelo apoio científico.

A Professora Paula Vidigal, pela atenção e contribuição com o trabalho.

Aos meus amigos de pesquisa do grupo Naves - Raissa, Larissa, Paulo e Simone - meu profundo agradecimento pela disponibilidade constante e pelo auxílio nos experimentos.

Aos alunos de Iniciação Científica que contribuíram de alguma forma para a execução desse trabalho e aos cuidados com os animais do Biotério.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro que tornou possível a realização deste mestrado.

Aos meus familiares, Flávio, Maria Noemi e Rafael por terem me dado apoio ao longo da execução desse trabalho. Agradeço à minha amiga de pesquisa Maria Clara, que também foi meu apoio emocional durante todo o processo.

Agradeço à Deus por me guiar e estar sempre presente comigo em todas as etapas do meu crescimento acadêmico e pessoal.

RESUMO

As estratégias imunológicas para o tratamento da dependência química de cocaína têm se apresentado como uma estratégia promissora. A estimulação do sistema imunológico induz a produção de anticorpos específicos para a cocaína. Uma aplicação inovadora desta estratégia terapêutica é a prevenção da exposição intrauterina à droga. Neste trabalho se avaliou a segurança pré-clínica em ratas grávidas e o acompanhamento do desenvolvimento dos filhotes após o nascimento e imunização ativa materna com a vacina anticocaína UFMG-VAC-V4N2. Os grupos experimentais, imunizados com a UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo receberam 300 µL da formulação, por via intramuscular, nos dias 0, 7, 21, 28, antes da gestação e a quinta dose, durante o período gestacional (dia 42). Foram avaliados parâmetros gestacionais como ganho de peso, consumo hídrico e alimentar maternos, mortalidade, parâmetros bioquímicos e hematológicos e ao final do estudo foi realizado exame histopatológico das fêmeas. Os parâmetros pós-natais, nos filhotes, compreenderam a avaliação do tamanho da ninhada, o ganho de peso, análise do desenvolvimento físico. Os anticorpos tipo IgG do sangue do soro das mães e dos filhotes foram dosados através do método de ELISA. Os resultados demonstraram que a imunização ativa com a formulação testada 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. As variáveis analisadas nos desfechos gestacionais e pós-natais não alcançaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. As análises histopatológicas não revelaram quaisquer alterações que fossem indicativas de toxicidade. Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com os dados da literatura, em relação aos desfechos gestacionais e pós-natais. Contudo, após a análise da formulação utilizada neste estudo por ressonância magnética nuclear demonstrou a ocorrência de degradação da molécula UFMG-V4N2 na formulação. Desta forma, não foi possível concluir se a UFMG-VAC-V4N2 é imunogênico ou se ela é segura para uso durante a gravidez e para a prole. Futuros estudos, utilizando uma formulação com a molécula sem degradação são necessários para avaliar a imunogenicidade e a segurança da vacina UFMG-VAC-V4N2.

Palavras-chave: toxicidade reprodutiva, vacina anticocaína, exposição pré-natal, gestação.

ABSTRACT

Antidrug vaccines constitute a promising strategy for the treatment of cocaine addiction. Anticocaine vaccine induces the immune system to yield anti-cocaine-specific antibodies. An innovative application of this therapeutic strategy is preventing intrauterine exposure to cocaine. The present work assessed the immunogenicity and perinatal and postnatal safety of active immunization with UFMG-VAC-V4N2 in pregnant rats and monitored offspring development after birth. The experimental groups received intramuscularly 0,3 ml of UFMG-VAC-V4N2 formulation or the placebo on days 0, 7, 21, and 28 before the gestation. The fifth dose was injected during the gestational period on day 42. Gestational parameters observed were weight gain, maternal water and food consumption, mortality, biochemical, and hematology. At the end of the study, the females were autopsied, and tissues were assessed with histopathology. Postnatal parameters observed in the offspring comprised the litter size, weight gain, and physical development. Anticocaine immunoglobulins type IgG were assessed in serum using ELISA in dams and their offspring. The tested formulation did not yield anticocaine antibodies in the vaccinated dams nor observed in their offspring. Hence, none of the security parameters were statistically different between the treated and placebo groups. Histopathological analyses did not reveal any significant findings suggesting the toxicity of the tested formulation. However, considering the lack of immunogenicity, we retested the UFMG-VAC-V4N2 used in the study using magnetic resonance. The UFMG-V4N2 molecule degraded in the tested formulation, explaining the lack of immunogenicity. Given those results, further studies will assess the immunogenicity and prenatal and postnatal safety of the UFMG-VAC-V4N2. Moreover, degradation studies of the UFMG-VAC-V4N2 are assured.

Keywords: reproductive toxicity, anti-cocaine vaccine, prenatal exposure, pregnancy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação de anticorpos anticocaína.....	17
Figura 2 - Estrutura química da molécula UFMG-V4N2.....	23
Figura 3 – Escala temporal.....	34
Figura 4 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de fêmeas diluídas 1:200.....	41
Figura 5 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de filhotes diluídas 1:200.....	42
Figura 6 - Evolução da massa corporal absoluta média no período pré-gestacional..	43
Figura 7- Evolução da massa corporal absoluta média no período gestacional.....	43
Figura 8 - Evolução da massa corporal absoluta média no período pós gestacional .	44
Figura 9 - Média de consumo alimentar materno nos períodos pré-gestação, gestação e lactação.	45
Figura 10 - Média de ingestão hídrica materna nos períodos pré-gestação, gestação e lactação.	46
Figura 11 – Índice de Fertilidade.....	46
Figura 12 – Índice de Viabilidade.....	47
Figura 13 – Tamanho da Ninhada.....	48
Figura 14 – Evolução da massa corporal média da ninhada.....	48
Figura 15 – Razão Sexual dos Filhotes.....	49
Figura 16 – Níveis séricos de ureia e creatinina.....	50
Figura 17– Níveis séricos de enzimas hepáticas.....	51
Figura 18 – Níveis séricos de glicose.....	52
Figura 19 – Níveis séricos de proteínas.....	53
Figura 20 – Níveis de colesterol total e triglicérides.....	54
Figura 21 - Eritrograma.....	55
Figura 22 - Parâmetros hematimétricos.....	56
Figura 23 – Leucograma.....	58
Figura 24 – Plaquetograma.....	59
Figura 25 – Fotomicrografia do endométrio de rata pertencente ao grupo imunizado com a UFMG-VAC-V4N2.....	60
Figura 26 – Fotomicrografia do Folículo ovariano de rata pertencente ao grupo placebo.....	60
Figura 27 – Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo imunizado com a UFMG-VAC-V4N2.....	61

Figura 28 – Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo imunizado com a UFMG-VAC-V4N2.	61
Figura 29 - Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo placebo	62
Figura 30 - Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo placebo	62
Figura 31 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras diluídas 1:50.	82
Figura 32 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras diluídas 1:100.	83
Figura 33 Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras diluídas 1:400.	84
Figura 34 Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras diluídas 1:800.	85
Figura 35 Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras diluídas 1:1600..	86

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas	41
Tabela 2 – Evolução da massa corporal média no período pré-gestacional.....	43
Tabela 3 – Evolução da massa corporal média no período gestacional	44
Tabela 4 – Evolução da massa corporal média no período pós-gestacional	44
Tabela 5 – Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:50, expressos em densidade óptica (D.O)	82
Tabela 6 – Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:100, expressos em densidade óptica (D.O)	83
Tabela 7 – Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:400, expressos em densidade óptica (D.O)	84
Tabela 8 – Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:800, expressos em densidade óptica (D.O)	85
Tabela 9 – Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O)	86
Quadro 1 – Análise do perfil bioquímico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.....	86
Quadro 2 – Análise do perfil hematológico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

NAVeS	Núcleo de Pesquisa em Vulnerabilidade à Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	<i>World Health Organization</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
SNC	Sistema Nervoso Central
SAP	Síndrome associada à placenta
SL	Sistema Meso-cortico-mesolímbico
SUD	Transtorno por uso de substâncias
DPP	Deslocamento prematuro da placenta
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ICH	Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano
ANOVA	Análise de variância
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 anti cocaína
GND	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anti cocaína
GNE	Hapteno utilizado para síntese das vacinas anti cocaína
µg	Microgramas
µL	Microlitro
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 ³	Milímetro cúbico
pg	Picograma
Fl	Fentolitro
g/dL	Gramas por decilitro
U/L	Microlitros

mg/dL	Miligrama por decilitro
dL	Decilitro
mM	Concentração micromolar (micromol por litro)
n	Número de animais por grupo experimental
nm	Nanômetros
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
UFMG-VAC- V4N2	Vacina derivada da molécula de calixareno
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ALP	Fosfatase Alcalina
VCM	Volume Corpuscular Médio
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
UI	Unidade Internacional
vs	Versus
v	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Dependência química e gestação.....	15
1.2 Imunoterapia no Tratamento da Dependência Química a cocaína	17
1.3 Imunização no período gestacional	19
1.4 A formulação UFMG-VAC-V4N2	22
1.5 Condução de estudos pré-clínicos de segurança para vacinas	24
1.6 Condução de estudos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento	27
1.6.1 Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial	28
1.6.2 Desenvolvimento embrio-fetal	29
1.6.3 Desenvolvimento pré e pós-natal	29
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	31
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4. MÉTODOS	32
4.1.1 Preparo do hapteno GNE e a molécula V4N2	32
4.1.2 Protocolos experimentais	33
4.2 Animais e grupos experimentais	34
4.2.1 Observações maternas avaliadas	35
4.2.2 Ingestão alimentar e hídrica das mães	35
4.2.3 Acasalamento e avaliação do ciclo estral	35
4.2.4 Coleta sanguínea	35
4.2.5 Análise Bioquímica e hematológica do soro do sangue das mães	36
4.2.6 Observações durante a gestação e período pós-natal	37
4.2.7 Análise do desenvolvimento físico dos filhotes.....	37
4.2.8 Protocolo de eutanásia.....	38
4.3 Processamento do tecido e análise histopatológica.....	38
4.3.1 Processamento dos tecidos e montagem das lâminas	38
4.4 Análise da imunogenicidade: ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)	39
4.4.1 Etapa de fixação	39
4.4.2 Etapa de incubação das amostras maternas:.....	40
4.4.3 Etapa de revelação	40
4.5 Análise Estatística	40
5 RESULTADOS	41

5.1 Avaliação da produção de anticorpos anticocaína	41
5.1.1 Títulos de anticorpos IgG anticocaína de mães vacinadas com UFMG-VAC-V4N2: protocolo 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva	41
5.2.2 Títulos de anticorpos IgG anticocaína nos filhotes	42
5.2.1 Ganho de massa corporal materno	42
5.2.2 Consumo alimentar e ingestão hídrica materna	45
5.2.3 Índice de fertilidade	46
5.3 Avaliação de segurança da vacinação UFMG-VAC-V4N2: Parâmetros pós-natais e desenvolvimento dos filhotes.....	47
5.3.1 Índice de viabilidade.....	47
5.3.2 Tamanho da ninhada	47
5.3.3 Ganho de massa corporal da ninhada.....	48
5.3.4 Razão sexual	49
5.4 Análise do perfil bioquímico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.....	49
5.4.1 Ureia e Creatinina	49
5.4.2 ALT, AST e Fosfatase Alcalina.....	50
5.4.3 Glicose.....	52
5.4.4 Proteína total e albumina	52
5.4.5 Colesterol total e Triglicérides	53
5.5 Análise do perfil hematológico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.....	54
5.5.1 Hemácias totais, hematócrito e hemoglobina	54
5.5.2 Volume corpuscular Médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	56
5.5.2 Leucócitos totais e linfócitos.....	57
5.5.3 Contagem de plaquetas	58
5.6 Resultado Histopatológico	62
5.7 Análise da molécula UFMG-V4N2 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN).....	59
6. DISCUSSÃO.....	63
6.1 Produção de anticorpos IgG anticocaína nas mães e aquisição imunológica passiva pela prole	63
6.2 Desfechos gestacionais e pós-natais.....	65
6.3 Análise bioquímica e hematológica.....	66
6.4 Análise Histopatológica	70
6.5 Análise da UFMG-VAC-V4N2.....	68

7 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	80
1 Lista de reagentes, drogas e fármacos e materiais utilizados no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e exame histopatológico.....	78
2 Títulos de anticorpos IgG anticocaína nas mães vacinadas com UFMG-VAC-V4N2: protocolo 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva.....	81
3 Análise do perfil bioquímico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.....	87
4 Análise do perfil hematológico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.....	88
5 Análise da molécula UFMG-V4N2 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN).....	89

1 INTRODUÇÃO

A cocaína é um alcaloide tropânico extraído de folhas da planta *Erythroxylum coca*. Seu uso possui alto risco de causar dependência (Volpe *et al.*, 1992). O transtorno por uso de substância (SUD), em especial da cocaína, é considerado um problema de saúde pública. Infelizmente, o tratamento do SUD por cocaína ainda não dispõe abordagens terapêuticas farmacológicas específicas e eficazes.

A cocaína é um estimulante do sistema nervoso central (SNC). Ela ativa o Sistema Meso-cortico-límbico (SL) pelo aumento da liberação de dopamina no *nucleus accumbens* (Volpe *et al.*, 1992). A inibição da recaptação de neurotransmissores como a dopamina nos terminais pré-sinápticos, a cocaína leva à acumulação desse neurotransmissor, produzindo efeitos psíquicos como a euforia, a sensação de bem-estar e a desinibição (Kinsey; Kosten; Orson, 2010). Esse mecanismo de recaptação também modifica o funcionamento do chamado sistema de recompensa do cérebro. Essas modificações duradouras, produzem os sintomas do que caracterizamos como dependência, ou seja, o uso compulsivo da cocaína, a anedonia relativa, o estreitamento do leque de atividades e a assunção de consequências negativas com o uso da droga (Kinsey; Kosten; Orson, 2010).

O uso crônico de cocaína provoca a depleção de neurotransmissores pré-sinápticos e a redução de receptores pós-sinápticos. A consequência destes fenômenos é a habituação, ou seja, o usuário necessitará de doses maiores para obter os efeitos antes atingidos, outro sintoma da dependência (Gold *et al.*, 1985).

O abuso materno de cocaína durante a gestação acarreta problemas significativos para a mãe, o feto e ao neonato. O uso perinatal de cocaína está associado a várias complicações de saúde, incluindo doenças infecciosas, psiquiátricas, gastrintestinais, respiratórias e cardiovasculares agudas (Gouin *et al.*, 2011).

Nenhum fármaco registrado está aprovado para o tratamento da dependência à cocaína e crack (Pianca *et al.*, 2014). A farmacoterapia eficaz e segura para o tratamento da dependência à cocaína seria aquela capaz de reduzir o consumo da droga, a intensidade da fissura pela droga (*craving*) e a gravidade das consequências negativas produzidas pela mesma (Kinsey; Kosten; Orson, 2010).

Desde 2012, o grupo de pesquisa do professor Frederico Garcia coordenador do Núcleo de Apoio e Vulnerabilidade em Saúde (NAVeS) da Faculdade de Medicina da UFMG, vêm desenvolvendo novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dependência química à cocaína e crack. A molécula UFMG-V4N2 foi patenteada e os resultados dos estudos pré-clínicos demonstraram potencial imunogênico na produção de anticorpos específicos anticocaína, bem como inibição dos efeitos da resposta à droga em modelos de comportamentais em animais (Da Silva Neto *et al.*, 2022; Assis, *et al.*, 2023).

Os resultados preliminares sugerem que a UFMG-V4N2 seja uma forte candidata a um insumo farmacêutico ativo para uma vacina anticocaína.

Visando a aplicação dessa nova imunoterapia em gestantes, ensaios pré-clínicos de segurança reprodutiva e do desenvolvimento devem ser conduzidos, conforme as regulamentações exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

1.1 Dependência química e gestação

O uso de cocaína durante a gestação tem sido objeto de estudo desde os anos 80. De um lado pelo risco de teratogenicidade, de outro, pelo risco de prejuízos no neurodesenvolvimento fetal (Cressman *et al.*, 2014). O período crítico da exposição de qualquer droga durante a gravidez é o primeiro trimestre, ou seja, durante o período de organogênese. Embora ainda não sejam conclusivos, alguns estudos associaram a exposição pré-natal à cocaína com o surgimento de anomalias congênitas (Behke *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2018). As possíveis associações entre a exposição pré-natal à cocaína e a teratogenicidade podem ser explicadas pelo potente efeito vasoconstritor da droga, resultando na interrupção do fluxo sanguíneo para o feto, reduzindo significativamente a chegada de nutrientes, oxigênio e outros elementos essenciais ao desenvolvimento (Krishna; Levitz; Dancis, 1993).

A exposição à cocaína no período perinatal afeta tanto a vulnerabilidade da mãe quanto a do feto. A cocaína produz alterações metabólicas e exposição prolongada aumenta a toxicidade dos seus efeitos (Cain; Bornick; Whiteman, 2013). A cocaína atravessa rapidamente a barreira placentária, devido ao seu baixo peso molecular e lipossolubilidade. Nesse processo ela não é metabolizada e age diretamente na vasculatura placentária e fetal e acaba por atuar no desenvolvimento cerebral do feto.

Esse efeito, associado à imaturidade da barreira hematoencefálica (BHE) e do sistema nervoso central (SNC), torna o feto mais suscetível a potenciais danos neurobiológicos (Chasin *et al.*, 2014), provavelmente interferindo na neurotransmissão e no desenvolvimento sináptico (Cressman *et al.*, 2014). Além disso, com o uso crônico materno, ocorre a diminuição do neurotransmissor de dopamina nas terminações nervosas, causando disforia e a constante necessidade da droga (Volpe *et al.*, 1992). Assim, funções como excitação, atenção e memória podem ser adversamente afetadas a longo prazo pela exposição pré-natal à cocaína (Behnke *et al.*, 2013).

O uso de cocaína produz repercussões graves na gestação, com prejuízos para o feto, muitas vezes associados a outros fatores de risco socioambientais presentes em populações socialmente negligenciadas (Behke *et al.*, 2013). O uso perinatal da droga foi associado a maior incidência de fetos com restrição de crescimento intrauterino, partos prematuros, síndrome associada à placenta (SAP) e pré-eclâmpsia (Dos santos *et al.*, 2018; Mbah *et al.*, 2012). O uso dessa substância durante a gravidez aumenta significativamente os riscos de resultados adversos, que incluem crises hipertensivas, perda fetal intrauterina inexplicada e prematuridade (Cain; Bornick; Whiteman, 2013).

As principais complicações perinatais do uso de cocaína incluem as cardiovasculares. A cocaína produz efeitos estimulantes e vasoconstritores aumentando o tônus vascular e redução do fluxo sanguíneo uteroplacentário (Mbah *et al.*, 2012). A cocaína aumenta a concentração de ocitocina e os níveis de norepinefrina induzindo à atividade uterina. Conseqüentemente, isso pode levar ao descolamento prematuro da placenta (DPP), levando ao parto prematuro. O uso crônico perinatal da cocaína está associado as altas taxas de DPP grave, podendo ocasionar mortes maternas e perinatais (Yamaguchi *et al.*, 2008).

Os fetos expostos à cocaína apresentam um baixo peso ao nascer, uma menor circunferência cefálica e estatura, quando comparados a fetos não expostos (Gouin *et al.*, 2011). O uso da cocaína no período perinatal também é associado à restrição do crescimento fetal intrauterino, resultando em bebês com baixo peso ao nascer e pequenos para a idade gestacional, acidose fetal, isquemia e morte (Cressman *et al.*, 2014). Além da exposição através do sangue materno, a cocaína e seu metabólito, a

benzoilecgonina são armazenadas nas membranas placentárias e no miométrio, como consequência, o feto sofre com exposição aguda e prolongada à droga e seus metabólitos (De Giovanni; Marchetti, 2012).

1.2 Imunoterapia no tratamento da dependência química à cocaína

O uso de moléculas estimuladoras do sistema imunológico destinadas a induzir a produção de anticorpos altamente específicos, que se ligam a moléculas de drogas na circulação sistêmica, reduzem ou impedem a passagem da droga pela barreira hematoencefálica (BHE), por aumentar seu tamanho molecular (Lockner *et al.*, 2015). Ligada a um anticorpo específico, a droga não consegue atingir seus sítios de ligação no Sistema nervoso central (SNC), o que por sua vez impede a manifestação de seus efeitos reforçadores. Conforme ilustrado na **Figura 1**, acredita-se que a falta do efeito reforçador faça com que o usuário tenha tendência a diminuir ou abandonar o uso da droga, interrompendo o ciclo que mantém a dependência química (Haney *et al.*, 2010; Kinsey; Kosten; Orson, 2010).

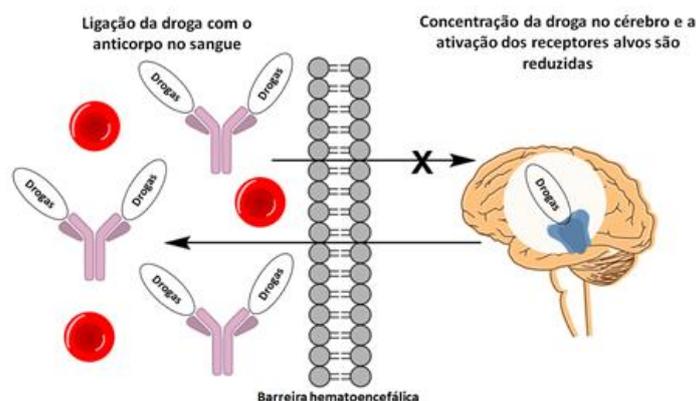


Figura 1 - Mecanismo de ação de anticorpos anticocaína. Anticorpos anticocaína capturando moléculas de droga na circulação sanguínea e impedindo sua passagem através da barreira hematoencefálica. Fonte: Adaptado de Bremer & Janda (2017).

A cocaína é uma molécula de baixo peso molecular (303 g/mol), que por si só não é capaz de induzir resposta imunológica efetiva e protetora. No entanto, os anticorpos anticocaína são produzidos quando a droga é ligada quimicamente a um carreador, uma substância sabidamente imunogênica, de alto peso molecular, que pode ser uma proteína ou outras substâncias de natureza química diferente. Uma estratégia comumente utilizada é a modificação química da cocaína, como, por exemplo a adição de um grupo funcional, como a amina, tiol ou carboxila, os quais permitam a

sua ligação às moléculas carreadoras e a formação de imunocombinados. Essa modificação química na molécula de cocaína a torna haptênica (Ramakrishnan *et al.*, 2014).

Os principais haptenos desenvolvidos para estudos de imunogenicidade são o GNE, o GNC, o GND, o GNT e a succinilnorcocaína (Cai *et al.*, 2013). O GNE tem sido o hapteno de escolha nos estudos com animais experimentais, por apresentar maior estabilidade química em relação aos demais (Cai *et al.*, 2013; Kimishima *et al.*, 2016; Lockner *et al.*, 2015).

A combinação do hapteno com o carreador e moléculas imunoestimulantes, ou seja, adjuvantes, completa o processo de produção de uma formulação vacinal. Assim a administração desta vacina em um indivíduo irá promover resposta imune mediada por anticorpos IgG contra o hapteno da droga (Bremer; Janda, 2017).

A eficácia de uma vacina antidrogas está diretamente ligada à quantidade e qualidade dos anticorpos que a vacina pode produzir, que inclui a capacidade da resposta policlonal de se ligar à cocaína (Cai *et al.*, 2013). Vários carreadores têm sido investigados no desenvolvimento de vacinas anticocaína desde os anos 90 (Sakurai; Wirsching; Janda, 1996). A maioria das inovações nas preparações de vacinas contra a cocaína podem ser vistas no desenho do hapteno, cujo principal objetivo é preservar a estrutura química nativa da droga, tanto quanto possível, para gerar anticorpos com maior grau de avidéz com a droga (Bremer *et al.*, 2017).

Estudos realizados em murinos, usando um hapteno de cocaína (GNE) acoplado a molécula KLH, proteína carreadora hemocianina de *Megathura crenulata* e numa formulação com o adjuvante de Freund, demonstraram que esta formulação é capaz de induzir anticorpos específicos contra a cocaína. Esses anticorpos foram capazes de capturar a droga na corrente sanguínea dos animais, reduzindo a passagem pela BHE e impedindo seus efeitos positivos, que reforçam o comportamento de uso (Cai *et al.*, 2013; Lockner *et al.*, 2015). Essa terapêutica mostrou-se promissora com resultados satisfatórios de eficácia na produção de anticorpos (Augusto *et al.*, 2021) e foi possível que novas propostas fossem discutidas.

Outros estudos pré-clínicos mostraram que o GNE acoplado ao KLH (GNE-KLH) ou à flagelina induz a produção de níveis elevados de anticorpos IgG anticocaína de alta

afinidade pela droga, atenuando o efeito hiperlocomotor induzido pela cocaína em animais murinos, após a administração de uma única dose de cocaína. Dessa forma foi possível conferir a proteção dos desfechos negativos da droga (Cai *et al.*, 2013; Lockner *et al.*, 2015).

Estudos anteriores realizados pelo NAVEs proveram evidências de uma nova aplicabilidade da imunoterapia com GNE-KLH em ratas grávidas. Os resultados revelaram a produção de anticorpos IgG de alta afinidade pela droga durante toda a gestação de mães vacinadas com GNE-KLH e a proteção dos filhotes a exposição pré e pós-natal aguda à cocaína. Os anticorpos produzidos foram capazes de reduzir os efeitos da administração da droga nos filhotes, diminuindo o comportamento hiperlocomotor induzido pela droga em modelo de campo aberto em animais (Augusto *et al.*, 2021).

1.3 Imunização no período gestacional

A vacinação na gravidez para a prevenção primária de doenças transmissíveis provou ser uma das intervenções de saúde pública mais eficazes nas últimas décadas, levando a reduções significativas na morbimortalidade materna e perinatal (Mackin; Walker, 2021). Além de oferecer benefícios diretos para a mãe, que responde de forma eficiente à imunização ativa, também proporciona benefícios fetal e infantil por meio da imunidade passiva, através da transferência transplacentária dos anticorpos maternos induzidos pela vacinação (Swamy; Heine, 2015).

É bem estabelecido que, nos primeiros meses de vida, os bebês contam com a proteção naturalmente fornecida pelos anticorpos de origem materna para resistir à ameaça de infecção até que seu sistema imunológico seja capaz de responder eficientemente a um patógeno, ou à imunização ativa (Hussain *et al.*, 2022; Muñoz, 2016). A transmissão de anticorpos maternos para o bebê pode ocorrer no período pré-natal, por meio da placenta, e/ou pós-natal, via leite materno, para proteger diretamente a criança durante os primeiros meses de vida contra doenças para as quais outras estratégias preventivas são indisponíveis ou ineficazes (Abu-Haya *et al.*, 2020).

A imunoglobulina G (IgG) é o isotipo de imunoglobulina dominante que atravessa a placenta e contribui para a imunidade passiva materna durante a primeira infância. O

receptor neonatal Fc (FcRn) regula a transferência transplacentária de IgG através da ligação ao seu domínio constante e a transporta ativamente para a circulação fetal. A IgG começa a ser transferida no final do primeiro trimestre da gestação humana e aumenta com a progressão da gravidez, e atingindo maior concentração no terceiro trimestre (Abu-Haya *et al.*, 2020; Simister, 2003), período em que os níveis deste anticorpo podem ultrapassar os níveis de concentração séricos de IgG de origem materna. Após o nascimento, a proteção do recém-nascido é fornecida através do leite materno, através da imunoglobulina IgA (Faucette *et al.*, 2015).

Apesar da vacinação materna fornecer imunidade passiva para o feto mediante anticorpos específicos IgG, pouco se sabe sobre o efeito da vacinação durante a gravidez na transferência de anticorpos maternos secretores de imunoglobulina IgA, induzidos pela vacinação através da amamentação (Saso; Kampmann, 2020). A possível transferência desses anticorpos, produzidos ativamente através da vacinação de mães usuárias de cocaína e crack, poderia proteger o feto, evitando ou reduzindo os efeitos nocivos da droga.

O objetivo da imunização materna é, portanto, aumentar os níveis de imunoglobulinas acima do suposto limiar de proteção. A especificidade do IgG ao antígeno é um fator importante na transferência placentária, que é influenciada por diferentes subclasses dessa imunoglobulina. Antígenos proteicos induzem predominantemente a secreção de IgG1 e IgG3, enquanto a IgG2 é produzida em antígenos encapsulados de polissacarídeos (Vidarsson; Dekkers; Rispens, 2014).

A decisão de administrar uma vacina em um determinado momento da gravidez é baseada em vários fatores, incluindo o risco de exposição à doença, o perfil de segurança da vacina, a eficácia da imunização e a proteção que a vacina pode oferecer ao recém-nascido (Healy *et al.*, 2013). A vacinação durante o primeiro trimestre é evitada devido ao período de organogênese, ocorrendo transferência mínima de anticorpos pela placenta durante as primeiras oito semanas de gestação (Martin *et al.*, 2009). Dentre as vantagens relacionadas ao sucesso da imunização durante o terceiro trimestre de gravidez, estão relacionadas a meia-vida relativamente curta dos anticorpos induzidos pela vacina, os quais ajudam a proteger o bebê nas primeiras semanas ou meses de vida, quando o sistema imunológico continua em

desenvolvimento. O pico de transporte transplacentário de IgG ocorre durante o terceiro trimestre de gestação (Healy; Rench; Baker, 2013).

Os benefícios da vacinação na gravidez são inúmeros, e abrangem a prevenção de complicações e óbitos maternos, redução do risco de infecções intrauterinas e doenças fetais, bem como a transmissão da imunidade passiva aos recém-nascidos, oferecendo anticorpos às crianças em um período no qual sua capacidade de resposta aos estímulos vacinais é limitada (Hussain *et al.*, 2022; Mackin; Walker, 2021). Entretanto, baixas taxas de cobertura vacinal em gestantes ainda são discutidas, sendo um reflexo das preocupações em relação à segurança ou falta de conhecimento do impacto de vacinas para as gestantes (Mackin; Walker, 2021).

O avanço da inclusão de mulheres grávidas em ensaios clínicos foi acelerado após a pandemia de influenza H1N1 em 2009, de modo a incluí-las em programas de vacinação (Mackin; Walker, 2021). Atualmente, nos Estados Unidos, apenas duas vacinas são recomendadas rotineiramente para todas as mulheres grávidas, vacinas inativadas contra influenza e vacinas combinadas contra tétano, difteria e coqueluche (Tdap), embora outras vacinas recomendadas para mulheres em idade reprodutiva sejam às vezes administradas durante a gravidez quando necessário (DeStefano; Offit; Fisher, 2018).

A agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration (FDA)*, possui regulamentos para a proteção de seres humanos em pesquisa. Especificamente no regulamento *45 CFR Parte 46*, que se refere a pesquisas envolvendo fetos e mulheres grávidas, há uma política de inclusão desse grupo em pesquisas clínicas desde que estudos pré-clínicos e clínicos sejam cientificamente conduzidos em mulheres não grávidas e apresentem benefícios diretos na mulher, no feto ou em ambos.

Os riscos associados à imunização durante o período gestacional são fundamentados em uma avaliação integrada entre os dados pré-clínicos e clínicos existentes. Esses dados, incluem considerações farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas, além da experiência clínica e o objetivo terapêutico do fármaco em questão. Durante o período de desenvolvimento pré-registo, os dados de maior relevância são os não clínicos conduzidos em animais, uma vez que a experiência clínica é inexistente ou limitada na área da reprodução (ICH, 2020; Barrow, 2012).

Considerando que as mulheres grávidas são geralmente excluídas da participação em ensaios clínicos, as conclusões sobre os riscos reprodutivos, e no desenvolvimento, são baseadas em dados de estudos de toxicidade reprodutiva, e do desenvolvimento, em modelos animais. Esses dados são gerados com o intuito de fornecer dados empíricos para inclusão de mulheres grávidas em ensaios de segurança clínica (Klein *et al.*, 2021), os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser executados antes dos ensaios clínicos de fase III, conforme as regulamentações internacionais (Woldemeskel, 2022).

1.4 A formulação UFMG-VAC-V4N2

As vacinas antidrogas, usualmente, tem como insumo farmacêutico ativo (IFA) o hapteno conjugado a um carreador sabidamente imunogênico, sendo muito comum o uso de proteínas como estruturas carreadoras de haptenos (Kinsey; Kosten; Orson, 2010). No entanto, para induzir uma resposta imunológica pelo organismo, e, conseqüentemente, a produção de anticorpos, não é obrigatória a presença de uma unidade proteica (Orson *et al.*, 2009). Dessa forma, moléculas de alto peso molecular (acima de 1000 g mol^{-1}) podem ser utilizadas como estruturas carreadoras em novos possíveis imunógenos, sendo capazes de induzir a produção segura e eficaz de anticorpos específicos (Bremer *et al.*, 2017).

A molécula UFMG-V4N2 é uma nova uma estrutura química derivada do calixareno, preferencialmente calix[4]areno, acoplada a quatro haptenos da cocaína, o hapteno GNE (Da Silva *et al.*, 2021) conforme ilustrado na **Figura 2**. Essa plataforma sintética pode ser utilizada como sistema carreador biologicamente ativo, apresentando peso molecular acima de 1000 g mol^{-1} , característica essencial para a indução da resposta imunológica. Os calixarenos, também demonstraram atividades antivirais, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas (De Fátima *et al.*, 2009; Naseer; Ahmed; Hameed, 2017). Além disso, compostos sintéticos à base de calixareno e seus inúmeros derivados, apresentam baixo sinal de citotoxicidade, os qualificando para serem usados como potenciais carreadores (Dawn *et al.*, 2019).

Figura 2 - Estrutura química da molécula UFMG-V4N2.

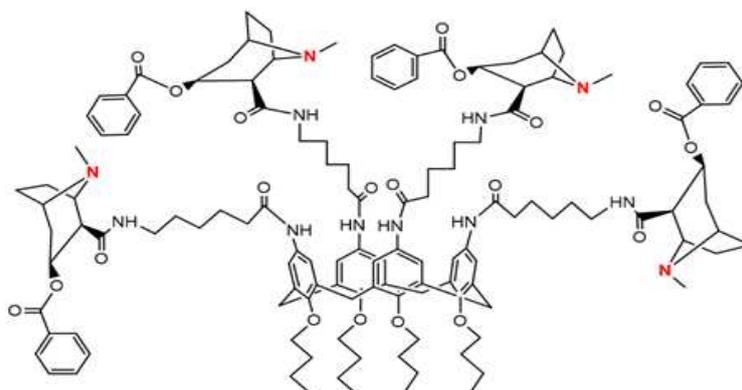


Figura 2 – Quatro moléculas de GNE acoplada a plataforma do calix[4]areno. Fonte: Adaptado de Da Silva Neto *et al.*, 2022.

A imunoterapia com a molécula UFMG-V4N2 vem se mostrando promissora nos estudos já conduzidos. No estudo conduzido por Da Silva Neto (2022) e colaboradores foi observado que camundongos imunizados com a molécula UFMG-V4N2 associado ao adjuvante de Freund foi capaz de induzir a produção de títulos de anticorpos IgG anticocaína com especificidade pela droga. Nos animais, os anticorpos diminuíram a passagem de um análogo de cocaína radiomarcado (Trodat[®]) pela BHE e reduziram os efeitos de comportamento hiperlocomotor em modelo de campo aberto (Da Silva Neto *et al.*, 2022).

O estudo de citotoxicidade e mutagenicidade *in vitro* da molécula UFMG-V4N2, conduzido por Souza (2018) a partir do ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN-Cyt), mostrou que a molécula não demonstrou citotoxicidade. A toxicidade aguda foi testada também em modelo *in vivo*, onde camundongos foram imunizados com uma dose única da molécula UFMG-V4N2 associada ao adjuvante fosfato de alumínio. Os animais foram observados por um período de quatorze dias, a fim de avaliar possíveis sinais de toxicidade, como mudança no comportamento, peso, consumo alimentar e morte. Os resultados foram satisfatórios, estando conforme a literatura para a avaliação da toxicidade aguda.

A partir dos estudos citados anteriormente, e visando a aplicação do imunógeno UFMG-V4N2 em humanos, Assis *et al.*, 2023 avaliaram diferentes doses da molécula, formulações e adjuvantes em camundongos. Ensaio de biodistribuição foram realizados utilizando o análogo de cocaína radiomarcado (Trodat[®]). Diferentes doses da vacina foram aplicadas nos animais, sendo observado que os camundongos que

receberam a menor dose imunogênica apresentaram uma tendência de redução de Trodat® no tecido cerebral em relação ao grupo controle (Assis, *et al.*, 2023). Visto a aplicação da UFMG-V4N2 em humanos, foi estabelecida uma formulação farmacêutica, na menor dose, em suspensão, associada ao adjuvante fosfato de alumínio (Adjuphos®) e com excipientes licenciados para uso em humanos, compondo assim, a formulação denominada UFMG-VAC-V4N2.

Os resultados dos testes pré-clínicos realizados até o presente momento, sugerem que a molécula UFMG-V4N2 seja uma candidata a um insumo farmacologicamente ativo para uma vacina anticocaína.

Embora a perspectiva de desenvolver uma imunoterapia eficaz no tratamento da dependência a cocaína seja uma estratégia promissora, até o momento não houve aprovação de uma vacina para aplicação clínica por parte dos órgãos regulatórios, tais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o FDA. A aprovação regulatória é um processo rigoroso, que exige a demonstração da eficácia e segurança, bem como evidências substanciais de benefícios para a saúde dos pacientes.

1.5 Condução de estudos pré-clínicos de segurança para vacinas

Para a regulamentação e comercialização de uma nova vacina destinada para uso em humanos, testes pré-clínicos devem ser estabelecidos e conduzidos conforme as orientações recomendadas pelas diretrizes internacionais, da Organização Mundial da Saúde (OMS), Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH), Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Dentre outras diretrizes existentes, estão incluídas as agências reguladoras de diversos países, as quais possuem suas próprias diretrizes.

Atualmente, a ANVISA, não possui diretriz própria e específica para condução de ensaios pré-clínicos destinado ao desenvolvimento de vacinas. A agência possui somente um guia específico para a condução de ensaios pré-clínicos destinados ao licenciamento de medicamentos (ANVISA, 2013). Dessa forma, para a execução dos ensaios voltados ao desenvolvimento de vacinas, a ANVISA adere às recomendações

tanto das diretrizes internacionais além de seguir seu próprio guia (ICH, 2020; OMS 2005; OMS 2013).

O processo de licenciamento de um produto destinado a humanos, exige a realização de cinco testes de toxicidade (WHO, 2013; ICH, 2020). Esses estudos abrangem a avaliação da toxicidade aguda, toxicidade crônica, genotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento. No contexto da nova formulação UFMG-VAC-V4N2, dois estudos independentes foram conduzidos e apresentaram resultados satisfatórios em testes de toxicidade aguda e toxicidade local. Ratos da espécie *Wistar* (dados não publicados) e primatas não humanos da espécie *Callithrix Penicillatra* (Sabato *et al.*, 2023) receberam doses repetidas da formulação UFMG-VAC-V4N2 associado ao adjuvante fosfato de alumínio (Adjuphos®), de acordo com o protocolo de imunização estabelecido por Da Silva Neto *et al.*, 2022 e Assis, *et al.*, 2023.

Conforme preconizado pelas diretrizes internacionais (WHO, 2013; ICH, 2020), para a execução de testes de toxicidade relacionado a vacinas, foi realizado um estudo histopatológico completo de ambas as espécies imunizadas com a vacina. Os resultados sugeriram que a formulação UFMG-VAC-V4N2 foi bem tolerada após a administração de quatro doses, exceto por um leve edema no local da injeção em ambas as espécies (Caligiorne *et al.*, 2019 no prelo).

Os estudos empregados para avaliar a toxicidade reprodutiva e/ou do desenvolvimento de vacinas preventivas e terapêuticas variam conforme o grupo populacional a quem a vacina se destina e a relevância do risco reprodutivo associado. Para vacinas destinadas especificamente a mulheres grávidas e em idade reprodutiva, é necessária a condução de estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento em pelo menos uma espécie animal (ICH, 2020; Green; Al-Humadi 2017). A justificativa para a escolha da espécie, irá depender se em estudos anteriores, a vacina apresentou perfil de segurança favorável e resposta imunológica (Barrow, 2012).

Geralmente, ratos e camundongos são as espécies de escolha para a realização dos estudos de toxicidade reprodutiva. Os murinos possuem boa comparabilidade e são de fácil manipulação, sendo utilizados nos estudos o qual já existe amplo

conhecimento prévio (ICH, 2020; FDA, 2021). As espécies de animais recomendadas pelas diretrizes do ICH coincidem com as mesmas espécies recomendadas pelo guia da ANVISA (ANVISA, 2013).

A imunização de mulheres grávidas apresenta questões únicas, uma vez que o sistema imunológico na gravidez é modulado (Ander; Diamond; Coyne, 2019). É importante abordar não apenas a segurança e a eficácia nas mulheres grávidas, mas também no bebê. Assim, qualquer recomendação para o uso de uma vacina em gestantes exigirá dados de estudos de segurança pré-clínicos para garantir que não sejam detectadas complicações na gravidez, durante o trabalho de parto e no desenvolvimento do bebê (Gruber, 2003). Deve-se ressaltar que os resultados dos testes de segurança deverão estar disponíveis antes da inclusão de mulheres grávidas em ensaios clínicos de fase III. E, esses resultados irão determinar condutas para o desenho do estudo, dependendo das características do fármaco em questão, doença ou condição para a qual o fármaco pretende prevenir o/ou proteger (WHO, 2013).

As vacinas podem ser justificadamente consideradas uma das classes mais seguras de agentes medicinais no que diz respeito aos riscos reprodutivos e do desenvolvimento (Verdier; Barrow; Burge, 2003). A toxicidade associada às vacinas, surgem de vários fatores envolvidos a partir de eventos inflamatórios que possuem relação com a resposta ao antígeno e também ao adjuvante administrado (Green; Al-Humadi 2017). Quaisquer novos componentes da formulação da vacina (adjuvantes, excipientes, estabilizadores e conservantes) também podem ser testados quanto às influências na reprodução e desenvolvimento, embora, os riscos sejam limitados pelas dosagens muito baixas utilizadas na formulação vacinal (Verdier; Barrow; Burge, 2003; Barrow, 2012).

Os estudos de toxicologia regulatória pré-clínica podem ser conduzidos para avaliar a toxicidade inerente da vacina, toxicidade de impurezas, contaminantes e/ou excipientes, toxicidade devido à interação dos componentes da formulação, bem como toxicidade ligada à resposta imune, visando abordar o potencial risco reprodutivo. Deve-se ressaltar que a ausência de toxicidade detectável em estudos com animais não significa necessariamente que uma vacina será segura em humanos (Faqi *et al.*, 2013; OMS, 2005).

Não existe uma diretriz padronizada capaz de abranger todas as classes de vacinas. O estudo de segurança pré-clínica na avaliação de uma vacina é dependente do tipo de molécula (proteica, sintética ou de outra natureza biológica) utilizada na formulação, e a condução destes estudos é delimitada caso a caso. A vacina UFMG-VAC-V4N2 é classificada como sintética e utiliza de uma proposta totalmente inovadora, o que dificulta o processo de encaixá-la em uma classificação. Nesse contexto, a vacina anticocaína aplicada em ratas grávidas, classifica-se como candidata a submissão de estudos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento.

1.6 Condução de estudos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento

Durante o curso de desenvolvimento de novos fármacos, testes de toxicologia reprodutiva são realizados para determinar os efeitos de novos compostos no sistema reprodutivo de mamíferos, através da exposição de animais adultos a substâncias ativas em diferentes estágios de reprodução e desenvolvimento (ICH, 2020). Estes incluem a avaliação do comprometimento da função reprodutiva (infertilidade); a indução de efeitos adversos no embrião (teratogenicidade), como retardo de crescimento, malformações e morte; e a indução de efeitos adversos pós-natais na prole em desenvolvimento (Woldemeskel, 2022).

Os segmentos e a condução dos testes variam conforme o objetivo farmacológico ou terapêutico da molécula a ser testada (Barrow, 2012; Faqi *et al.*, 2013). Como citado no tópico anterior, embora as diretrizes internacionais forneçam apenas recomendações para a condução de estudos de segurança pré-clínica de vacinas em toxicidade reprodutiva, não existe padronização na condução dos estudos destinado aos diferentes tipos de vacinas (WHO, 2013; ICH 2011; ICH, 2020; Barrow, 2012). As discussões concentram-se apenas nos aspectos técnicos, desenho experimental e modelos animais para estudos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento. Estudos de toxicidade anteriores são recomendados antes de iniciar os estudos reprodutivos, a fim de garantir que sejam relevantes e úteis para a avaliação de risco na imunização de gestantes (ICH, 2020; ICH, 2011; Gruber, 2003).

Na avaliação da toxicidade reprodutiva de vacinas é recomendado analisar apenas um único nível de dose. A determinação do momento e a quantidade, irá depender do início e da duração da resposta imune específica do imunógeno. O plano de

vacinação deve otimizar os níveis de anticorpos maternos e/ou a resposta imune durante os estágios embrionário, fetal e pós-natal imediato. Ao desenvolver vacinas para uso durante a gravidez é necessário justificar o desenho específico do estudo, com base na finalidade pretendida, como proteger mãe durante a gestação e também o recém-nascido logo após o parto. Além disso, a via de administração deve ser a mesma via pretendida na aplicação em humanos (ICH, 2020; Faqi *et al.*, 2013).

A vacinação com a UFMG-VAC-V4N2 em estudos conduzidos anteriormente, mostrou-se eficaz em murinos e em primatas não-humanos com a administração de cinco doses, em intervalos espaçados e na composição da menor dose imunogênica (Assis *et al.*, 2023; Caligiorne, *et al.*, 2019 no prelo; Sabato *et al.*, 2023). Visando a nova aplicação da UFMG-VAC-V4N2 em modelo de animais gravídicos, os objetivos implicados na vacinação materna é proteger os fetos através da imunização passiva de anticorpos IgG anticocaína através da placenta. Outra forma de proteção, também seria pela transmissão passiva de anticorpos IgA e IgG anticocaína através do leite materno. Dessa forma visa-se, proteger, os fetos dos desfechos negativos do uso e abuso de cocaína durante o período de gravidez, e o recém-nascido logo após o parto.

Devido ao curto período gestacional em roedores, as diretrizes recomendam a administração das doses primárias da imunização antes do acasalamento, para garantir o pico de anticorpos maternos durante a gestação. Após a confirmação da gravidez, é necessário realizar, no mínimo, uma imunização durante o estágio de organogênese, referente a segunda semana de gestação. Com esse protocolo tem-se o intuito de avaliar possíveis efeitos embriotóxicos diretos dos componentes da formulação da vacina no desenvolvimento embrionário (ICH, 2020).

A seguir serão descritas as principais recomendações dos três segmentos para a condução dos estudos pré-clínicos de toxicidade e do desenvolvimento em animais murinos.

1.6.1 Fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial

O estudo de Fertilidade e Desenvolvimento Embrionário inicial é o segmento que permite verificar a fertilidade geral das fêmeas como a avaliação da maturação de gametas, transporte tubário, comportamento de acasalamento, efeitos no ciclo estral, estágio de pré-implantação embrionária e implantação. Durante o estudo são

observados parâmetros como peso corporal, consumo alimentar e hídrico, mortalidade materna.

O exame histopatológico dos órgãos reprodutivos é opcional, e deve ser considerada conforme o objetivo terapêutico do fármaco (Denny; Faqi, 2017). Dados de estudos de toxicidade anteriores devem estar disponíveis antes da realização dos estudos de toxicidade reprodutiva. O exame histopatológico dos órgãos reprodutivos é realizado com base na morfologia subjacente de um ciclo normal, incluindo a avaliação do ovário para identificar achados patológicos de toxicidade ovariana, como diminuição de folículos, aumento de folículos atresícos, aumento de corpos lúteos, dentre outros (Denny; Faqi, 2017; Lanning *et al.*, 2002).

1.6.2 Desenvolvimento embrio-fetal

Os testes de desenvolvimento embrio-fetal incluindo a avaliação da função materna, tem por objetivo avaliar as fêmeas grávidas expostas ao imunógeno durante o período de organogênese. Também são investigados possíveis efeitos na sobrevivência do feto, crescimento e desenvolvimento morfológico (ICH, 2020). Durante o período gestacional são monitorados indicadores como ganho de peso corporal, consumo alimentar e hídrico e mortalidade materna. Incluindo também, observações relevantes e provenientes de estudos de toxicidade anteriores (ANVISA, 2013).

A função materna é avaliada um ou dois dias antes da data prevista para o parto. Nessa etapa do estudo, ambos os grupos, fêmeas tratadas com a vacina teste e grupo placebo, são divididas em dois estudos distintos. Metade das fêmeas grávidas são submetidas a cesariana e a outra metade é destinada ao parto normalmente. As fêmeas submetidas a cesariana, são avaliadas conforme o número e distribuição de corpos lúteos, locais de implantação e viabilidade embrio-fetal (número de fetos vivos, mortos, reabsorções precoces e tardias). Na sequência, 50% dos fetos de cada ninhada são examinados quanto a alterações viscerais e os outros 50% restantes são examinados quanto a alterações esqueléticas (ANVISA, 2013; ICH, 2020).

A outra metade das fêmeas prossegue com a gestação até o parto normal, e os filhotes são avaliados até o período de desmame, conforme o estudo de desenvolvimento pré e pós-natal. Adicionalmente, amostras sorológicas de fetos e

filhotes são coletadas de ambos os grupos no término do estudo, para a quantificação de anticorpos induzidos pela vacina (ANVISA, 2013; ICH, 2020; WHO, 2005).

1.6.3 Desenvolvimento pré e pós-natal

O estudo do desenvolvimento pré e pós-natal é o segmento que permite detectar efeitos adversos desde a confirmação da gestação até período de desmame dos filhotes, a fim de avaliar parâmetros associados a toxicidade materna e/ou lactante, e no desenvolvimento da prole. Durante o período de gestação são observados sinais clínicos de mortalidade, alteração de peso corpóreo, ingestão hídrica e alimentar, bioquímica do soro e hematologia, duração da prenhez e parição, e possíveis observações relevantes provenientes de estudos de toxicidade anteriores. Após o desmame dos filhotes, as fêmeas são necropsiadas e submetidas a análise macroscópica dos tecidos e posterior análise histopatológica.

O desenvolvimento dos filhotes é avaliado diariamente quanto à sobrevivência após o nascimento, ganho de peso corporal, considerando a ninhada como análise de medida. Os marcos do desenvolvimento físico são avaliados quanto a erupção dos incisivos deslocamento dos pavilhões auriculares, surgimento de pelos, abertura palpebral ocular bilateral (ANVISA, 2013; Denny; Faqi, 2017; ICH, 2020). As manifestações das características sexuais são medidas através da distância anogenital (AGD), que é a distância do ânus ao broto genital em desenvolvimento. O AGD é normalmente cerca de duas vezes mais longo em ratos machos do que em fêmeas (Griffith Jr; Farris, 1942).

As avaliações de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento relacionadas às vacinas são, geralmente, restritas a estudos embrio-fetais e do desenvolvimento pré-natal e pós-natal, pois a principal preocupação é qualquer efeito prejudicial potencial no embrião, feto ou recém-nascido em desenvolvimento (WHO, 2005). Conforme mencionado anteriormente, as vacinas são classificadas como uma classe segura de fármacos. Evidências obtidas em outros estudos de toxicidade podem definir o desenho do estudo de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento (Garg *et al.*, 2017). De acordo com as diretrizes internacionais, a equipe de pesquisa tem a flexibilidade de escolher o método e o desenho de estudo mais adequados. É fundamental destacar que os três segmentos dos estudos de toxicidade reprodutiva não precisam obrigatoriamente ser realizados em uma ordem específica,

possibilitando a integração entre eles e a eliminação de observações consideradas irrelevantes para o resultado e interpretação dos dados do estudo (ICH, 2020; FDA, 2021).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O uso de drogas na gestação pode interferir em diversos processos do desenvolvimento fetal, pós-natal até a puberdade (Schwetz *et al.*, 1991). O uso de cocaína e crack durante a gestação pode ocasionar consequências negativas para as mães e o feto em desenvolvimento, a curto e longo prazo (Behke *et al.*, 2013). A imunoterapia, por meio da vacinação anticocaína, tem sido estudada como alternativa promissora para auxiliar no tratamento da dependência química e proteger o recém-nascido dos desfechos negativos da droga.

Para o sucesso de uma vacina antidrogas destinada a mulheres grávidas, estudos pré-clínicos de segurança devem ser realizados antes de ocorrer a aplicação em mulheres grávidas, em estudos de fase clínica (ANVISA, 2013). Nesse contexto, conforme determina a ANVISA, o presente estudo visou a avaliação da segurança da formulação vacinal UFMG-VAC-V4N2, em ratas grávidas, especificamente relativo ao período gestacional e ao desenvolvimento da prole. Em estudos conduzidos anteriormente, a imunoterapia com a UFMG-VAC-V4N2 mostrou-se eficaz e segura em ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* (Souza, 2018; Assis *et al.*, 2023).

Com o objetivo de avançarmos nos estudos para a fase clínica em mulheres grávidas, aventamos a hipótese de que a vacinação com UFMG-VAC-V4N2 não induz efeitos tóxicos significativos em ratas grávidas e seus filhotes, assegurando proteção e segurança durante o período pré-gestacional, gestação, período pós-natal imediato e na prole, até o período de desmame.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança da vacina UFMG-VAC-V4N2 em ratas no período gestacional, pós-natal imediato e na prole até o período de desmame.

3.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar e quantificar anticorpos IgG anticocaína induzidos pela vacina UFMG-VAC-V4N2 em ratas grávidas;
- B) Avaliar a aquisição passiva de anticorpos IgG anticocaína em filhotes;
- C) Avaliar possíveis alterações durante o período gestacional e pós-natal: ganho de peso, consumo alimentar e hídrico materno e avaliação dos parâmetros pós-natais nos filhotes, como número de nativos e natimortos, ganho de peso e tamanho da ninhada;
- D) Avaliar longitudinalmente indicadores hematológicos e bioquímicos de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo;
- E) Avaliar histopatologicamente os principais órgãos de ratas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UFMG. Este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA e está registrado com o número 213/2021. Os procedimentos em animais foram realizados considerando as normas providas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA de demais padrões humanitários de experimentação animal.

4. MÉTODOS

4.1.1 Preparo do hapteno GNE e a molécula V4N2

O hapteno GNE foi sintetizado e acoplado à plataforma do calix[4]areno conforme descrito por Da Silva Neto (2022) ambos produzidos pelo Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFMG. Após a síntese da molécula UFMG-V4N2, foi preparada a formulação da vacina UFMG-VAC-V4N2, conforme o protocolo descrito por Assis (2023).

4.1.2 Formulação da vacina UFMG-VAC-V4N2

A formulação da vacina compreendeu uma suspensão de $6,74 \times 10^{-5}$ mg/mL de UFMG-V4N2, 10mg/mL de álcool etílico (Merck®, Alemanha), 120 mg/mL de propileno glicol (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. As concentrações dos excipientes e adjuvante utilizados correspondem com os requisitos regulamentares para aprovação para uso em humanos (Assis *et al.*, 2023).

4.2 Protocolos experimentais

Para esta etapa do estudo foi realizada uma pesquisa documental conforme as recomendações das diretrizes internacionais da Organização Mundial da Saúde (OMS), Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH) e *Food and Drug Administration* (FDA) aplicáveis ao desenvolvimento de vacinas e considerações para o estudo de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento (FDA, 2021; ICH, 2020; WHO, 2005).

O estudo foi realizado para a avaliação dos parâmetros que incluem alguns testes embrio-fetais e estudo de toxicidade do desenvolvimento pré e pós-natal dos filhotes. Para melhor entendimento dos testes realizados, a metodologia do estudo foi empregada a fins de obter desfechos analisados em parâmetros maternos, fetais e dos filhotes após o nascimento até o desmame.

Os parâmetros fisiológicos maternos foram avaliados quanto ao ganho de peso pré-gestação, gestação e pós-gestação, consumo alimentar e hídrico durante a pré-gestação, gestação e pós-gestação, parâmetros bioquímicos do soro e hematologia sanguínea, análise anatomopatológica e avaliação da imunogenicidade para quantificação de anticorpos anticocaína dosados nas amostras de soro de sangue maternos.

Os parâmetros pré-natais e pós-natais dos filhotes foram avaliados quanto ao índice de fertilidade, viabilidade, mortalidade, razão sexual, tamanho e ganho de peso da ninhada, avaliação do desenvolvimento físico e da imunogenicidade para quantificação de anticorpos IgG anticocaína dosados nas amostras de soro de sangue dos filhotes.

4.2.1 Animais e grupos experimentais

Ratos da espécie *Sprague Dawley* (NTacUnib:SD) foram adquiridos do Biotério da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Para a condução do estudo foram utilizadas doze ratas fêmeas nulíparas com massa corporal média de 230 g e machos com 350 g, ambos com aproximadamente 8 semanas, que corresponde ao início da idade reprodutiva. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), e ciclo claro-escuro constante (12 horas cada). As fêmeas foram alojadas em dupla em caixa de propileno com dimensões de 60 x 50 x 22 cm forradas com maravalha com ração e água *ad libitum*.

Os grupos experimentais foram divididos conforme especificado abaixo:

Grupo vacinado: 8 fêmeas imunizadas com $6,74 \times 10^{-5}$ mg/mL UFMG-VAC-V2N2 + Adjuvos[®]

Grupo placebo: 4 fêmeas imunizados com Adjuvos[®]

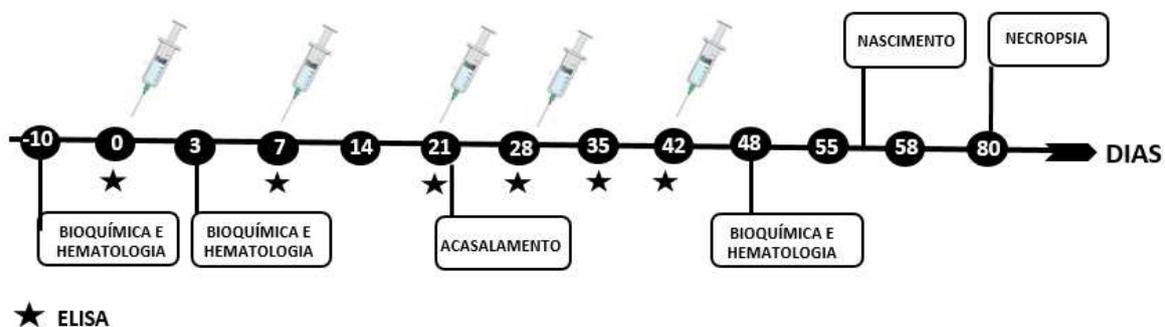


Figura 3 – Escala temporal. Protocolo de imunização com UFMG-VAC-V4N2 e coletas sanguíneas das fêmeas. Fonte: Elaborado pelo autor.

O cronograma de imunização foi realizado baseado em estudos anteriores (Da Silva Neto *et al.*, 2022; Maia, 2018; Souza, 2018; Assis *et al.*, 2023; Sabato *et al.*, 2023). Os animais do grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo foram imunizados em 5 tempos distintos, nos dias (T) T0, T7, T21 e T28 que correspondem ao período pré-gestacional e no T42 durante o período gestacional, especificamente durante a organogênese. Cada animal recebeu 300 μL da formulação vacinal (UFMG-VAC-V4N2 ou Adjuvos[®]) por via intramuscular (i.m) a mesma via pretendida para uso em humanos. Cada formulação foi preparada no dia anterior à administração,

conforme o protocolo descrito por Assis *et al.*, 2023. A escala temporal do protocolo está ilustrada na **Figura 3**.

4.2.1 Observações maternas avaliadas

O ganho de peso das ratas foi avaliado uma vez por semana no período pré-gestacional, diariamente durante a gestação e a cada 3 dias no desmame; a pesagem foi realizada sempre no mesmo horário (manhã). As fêmeas foram observadas diariamente, quanto ao nível de estresse e aspecto físico, a partir da primeira imunização no tempo T0. Para a avaliação do nível de estresse foram observados aspectos como apetite (ingestão alimentar e hídrica), agitação, agressividade, resposta ao manejo e perda de peso. Após a quinta imunização, no T42 (gestacional), especificamente no período de organogênese, as mães foram avaliadas diariamente quanto a sinais de aborto (ICH 2020; Denny; Faqi, 2017).

4.2.2 Ingestão alimentar e hídrica das mães

O consumo de água e ração foi mensurado, a cada dois dias, utilizando-se proveta e balança, respectivamente (ICH 2020; Denny; Faqi, 2017). A cada dois dias, pela manhã, foram oferecidos 300 g de ração e 600 mL de água, em cada caixa, para ambos os grupos. Os valores de consumo de ração e água foram calculados como o total consumido por gaiola dividido pelo número de ratos por gaiola.

4.2.3 Avaliação do ciclo estral e acasalamento

Duas fêmeas foram agrupadas com um macho em caixas de propileno com dimensões de 60 x 50 x 22 cm, durante um período de 8 dias, equivalente a dois ciclos estrais (Neves *et al.*, 2013). Durante esse período, foram coletados esfregaços vaginais diariamente para acompanhamento do ciclo estral. O início da gravidez (dia 0) foi considerado após a observação do tampão vaginal. Após confirmação da gravidez, as fêmeas foram alojadas em caixas individuais e, após o parto, os filhotes permaneceram com as fêmeas durante 21 dias, destinado ao período de amamentação.

4.2.4 Coleta sanguínea

Para a análise sorológica de anticorpos anticocaína, a coleta sanguínea foi realizada na veia safena, utilizando agulhas de calibre 0,45 x 13, nos tempos T0, T7, T14, T21,

T28 (pré-gestação), T35, T42, T49, T57 (período gestacional), T63, T70 (pós-gestação e desmame). Após coleta, o sangue total foi centrifugado a 10.000 rpm (4°C 20 minutos) para obtenção do soro, sendo posteriormente distribuídos em microtubos, identificados, os quais foram armazenados em freezer -80°C até a execução dos ensaios imunológicos.

Para análise bioquímica o sangue materno foi coletado em tubo de polipropileno de 0,5 mL e para a análise hematológica, o sangue foi coletado em microtubo Vacutainer® tampa roxa contendo ácido etilendiamino tetracético (EDTA). As amostras foram encaminhadas imediatamente para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFMG, onde foram centrifugadas a 10.000 rpm (4°C, 20 minutos) para obtenção do soro e posterior análise bioquímica. As amostras em EDTA foram avaliadas para verificar a presença ou ausência de coágulos.

Para a análise sorológica de anticorpos IgG anticocaína no soro de sangue dos filhotes, a coleta foi realizada pela veia facial mandibular (Neves *et al.*, 2013) com agulhas de calibre 0,45 x 13. O sangue dos filhotes foi coletado em três dias distintos, nos tempos T0, T7 e T14 após o desmame. O sangue total foi centrifugado a 10.000 rpm (4°C, 20 minutos) para obtenção do soro. As amostras sorológicas foram distribuídas em microtubos, identificadas e armazenadas em freezer -80°C até a execução dos ensaios imunológicos.

4.2.5 Análise Bioquímica e hematológica do soro do sangue das mães

Conforme especificado para os testes pré-clínicos de segurança (WHO, 2013), foram realizadas três coletas para analisar os parâmetros bioquímicos e hematológicos. A primeira coleta foi realizada antes da primeira imunização, no tempo T-10. A segunda coleta ocorreu três dias após a primeira imunização com UFMG-VAC-V4N2, no tempo T3. E a terceira coleta foi realizada após a última imunização, durante o período gestacional, no tempo T48. Os materiais utilizados na coleta podem ser consultados no **Apêndice 1**.

Na noite anterior à coleta sanguínea, as ratas tiveram sua ração retirada das gaiolas e foram submetidas a jejum noturno de 12 horas. Procedeu-se a dosagem das enzimas plasmáticas, como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), colesterol total, triglicérides, ureia,

creatinina, glicose, albumina e proteínas totais utilizando kits da BIOTECNICA® e equipamento Cobas MIRA® Plus analyzer (Roche Diagnostic Systems, GmbH, Germany).

O hemograma completo foi realizado para determinar os valores totais de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, plaquetas. Também foram avaliados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (HCM), utilizando analisador automático de células hematológicas ICOUNTER 3D (DIAGNO®).

4.2.6 Observações durante a gestação e período pós-natal

Alguns parâmetros foram calculados durante a gestação até o período de desmame (ICH, 2020; Denny; Faqi, 2017), sendo eles:

- A) Índice de fertilidade:** número de fêmeas grávidas e o número de fêmeas paridas.
- B) Índice de viabilidade:** número de filhotes que permaneceram vivos até o quarto dia de lactação e o total de filhotes nascidos vivos.
- C) Tamanho da ninhada:** número total de filhotes que permaneceram vivos até o 21º dia.
- D) Razão sexual:** razão entre o número de filhotes machos e o número de filhotes fêmeas.

4.2.7 Análise do desenvolvimento físico dos filhotes

A avaliação dos parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes está diretamente relacionada com o ganho de peso corporal. Os parâmetros avaliados após o desmame, consistem na observação da abertura dos olhos, desdobramento do pavilhão auricular, crescimento de pelos e erupção dos dentes incisivos (ICH, 2020).

O número de filhotes vivos e mortos foram registrados diariamente, considerado o dia T0 de nascimento como o dia do parto até desmame no T21. Os filhotes encontrados mortos foram investigados macroscopicamente quanto às alterações estruturais. Cada ninhada foi pesada individualmente a cada três dias, sendo a última pesagem no dia do desmame. Cada filhote foi avaliado diariamente quanto a viabilidade a partir do T0 de nascimento, conforme os marcos do desenvolvimento físico, os quais

consistiram na avaliação de cinco parâmetros: 1) Erupção dos incisivos 2) Deslocamento dos pavilhões auriculares (quando ambos estavam descolados no 12º dia); 3) surgimento de pelos (5º a 8º dia); 4) abertura palpebral ocular bilateral (quando ambos estavam completamente abertos no 12º a 15º dia).

4.2.8 Protocolo de eutanásia

O procedimento de eutanásia adotado foi guiado pelos princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo uma abordagem humanitária que envolveu práticas controladas e assistidas, para alívio da dor ou sofrimento. Essa abordagem visou também a minimização do estresse e a eliminação da possibilidade de causar desconforto no animal (CONCEA, 2015).

Após o desmame dos filhotes, aproximadamente no tempo T80, as fêmeas foram eutanasiadas com solução contendo os anestésicos Cetamina (cloridrato de cetamina 10%, 0,6 mL/animal) e Xilazina (Cloridrato de xilazina 2%, 0,3 mL/animal), via intraperitoneal. Todas as fêmeas foram observadas conforme a presença ou a ausência de determinados sinais, como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e as alterações das frequências cardíaca e respiratória, para determinar a ausência de vida (Neves, *et al.*, 2013). Durante a necropsia os seguintes órgãos foram retirados para posterior análise histopatológica: coração, cérebro, fígado, baço, rins, bexiga, pulmão, útero, ovário e trompas. As secções teciduais dos órgãos excisados foram fixados em formalina tamponada 10% (V/V) e encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG.

4.3 Processamento do tecido e análise histopatológica

4.3.1 Processamento dos tecidos e montagem das lâminas

Após 24 horas de fixação, os tecidos foram resseccionadas, alocados em cassetes individuais e encaminhados para o histotécnico Leica® TP 1020 (Leica, Wetzlar, Germany), para processamento *overnight*. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Na sequência, as amostras foram diafanizadas em dois banhos de xilol e incluídas na parafina. Após a obtenção dos blocos, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de aproximadamente 3 µm e colocados em lâminas, a secagem foi feita em estufa a 75°

overnight. Em seguida, as lâminas foram diafanizadas e hidratadas para posterior coloração pelo método de hematoxilina-eosina (H&E). As referidas lâminas foram submetidas à digitalização por meio do equipamento 3DHISTECH/Pannoramic MIDI® utilizando o programa CaseViewer. Os materiais utilizados no processamento de tecidos e montagem das lâminas podem ser consultados no **Apêndice 1**.

4.4 Análise da imunogenicidade: ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)

Foram conduzidos ensaios imunológicos para quantificar os níveis de anticorpos IgG anticocaína no soro sanguíneo, tanto das mães quanto dos filhotes, seguindo o protocolo descrito por Fetissov (2011) e adaptado por Pereira (2019). O protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsorptiva e amostras diluídas em 1:200, foi definido anteriormente como protocolo padrão ouro para quantificação de anticorpos anticocaína induzidos pela imunização com UFMG-VACV4N2, em camundongos (Assis *et al.*, 2023) e ratos (Caligiorne *et al.*, 2019, no prelo). Paralelamente, um conjunto de amostras de referência foi submetido a este protocolo, juntamente com as amostras das fêmeas imunizadas com UFMG-VACV4N2 e placebo. Além disso, diferentes diluições das amostras foram testadas. Os materiais utilizados em todas as etapas estão disponíveis para consulta no **Apêndice 1**.

4.4.1 Etapa de fixação

Para dosagem dos anticorpos IgG anticocaína maternos, amostras de soro que correspondem aos tempos das doses de reforço da imunização (T7, T14, T21, T28, T35 e T42) e dos filhotes (T7, T14) foram selecionadas.

O método de ensaio de imunoabsorção enzimática utilizou placas Maxisorp (Thermo Fisher Scientific®, MA, EUA) revestidas com 100 µL/poço de uma solução 2 mg/mL de cloridrato de cocaína diluída em tampão de fixação, seguindo o protocolo de padronização descrito por Pereira (2019). Com auxílio de pipeta multicanal (Research plus, Eppendorf®, Alemanha), foram adicionados 100 µL de cada uma dessas soluções em placas individuais de 96 poços. As placas foram revestidas com papel alumínio e incubadas em um refrigerador a 4°C durante a noite.

4.4.2 Etapa de incubação das amostras maternas

Após a etapa de fixação, as placas foram lavadas três vezes com 100 µL de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL das amostras de soro materno e dos filhotes em triplicata à microplaca, nas seguintes diluições: 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800 e 1:1600. Como controle o tampão de amostra puro foi utilizado como branco da amostra. A placa foi novamente coberta com papel alumínio e incubada em refrigerador a 4°C durante a noite.

4.4.3 Etapa de revelação

Após a incubação das amostras, as placas foram lavadas três vezes com 100 µL de tampão de lavagem por poço. Em seguida, o anticorpo secundário (Anti-rat IgG - Sigma-Aldrich®, EUA) foi diluído em 1:2000 e 100 µL foram adicionados em cada poço da microplaca, que foi posteriormente submetida à incubação a 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 e em seguida, 100 µL da solução substrato foi adicionado por poço. A microplaca foi, então, coberta com papel alumínio e mantida em repouso por 40 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as placas preparadas foram lidas no leitor de microplacas Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, MA) com filtro de 405 nm.

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 9.5.1 (San Diego, Estados Unidos). O teste de Shapiro-Wilk analisou a normalidade das amostras. O teste *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey comparou as médias de anticorpos IgG anticocaína no soro das mães e dos filhotes em diferentes tempos e diluições da amostra. O teste t de Student não pareado foi aplicado para avaliar o ganho de peso materno e diferenças na ingestão hídrica e alimentar materna. O teste de Mann Whitney foi aplicado nas análises dos parâmetros bioquímicos e hematológicos das mães. Para as demais análises dos filhotes foi aplicado o teste Exato de Fisher. Para todas as análises, o nível α foi fixado em 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da produção de anticorpos anticocaína:

5.1.1 Títulos de anticorpos IgG anticocaína de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2: protocolo 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Os títulos de anticorpos IgG anticocaína de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Os valores encontrados foram: Vacina vs. Placebo ($p = 0,8916$); Vacina vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$); Placebo vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$). Os títulos de anticorpos das amostras V4N2 positivo (amostras de referência) foram significativamente maiores em relação ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 42, conforme ilustrado na **Figura 4 e Tabela 1**.

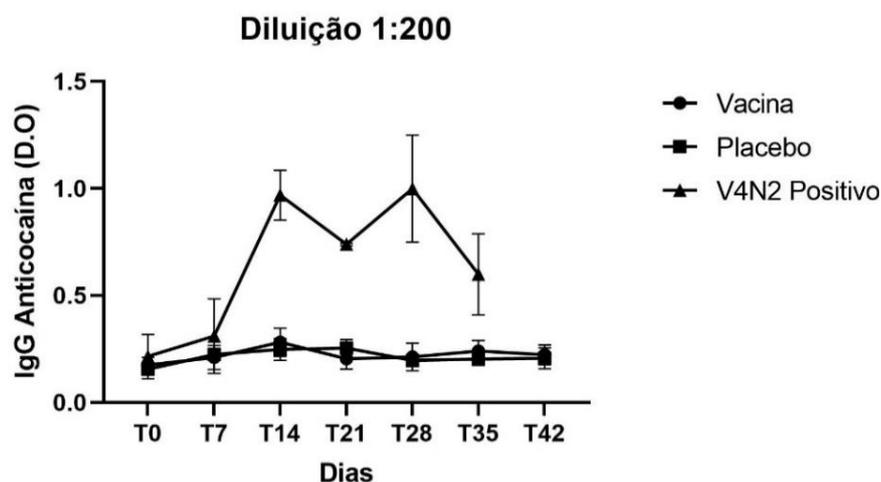


Figura 4 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de fêmeas diluídas 1:200. Amostras de soro de sangue maternas expressos em densidade óptica (D.O) (eixo Y) por tempo, em dias (eixo X), no protocolo com 2 mg/mL cocaína fixados. *Two-way ANOVA* com pós teste de Tukey.

Tabela 1 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas

Tempos	UFMG-VAC-V4N2	Controle	V4N2 positivo
T0	0,175 ± 0,037	0,156 ± 0,003	0,215 ± 0,103
T7	0,211 ± 0,056	0,224 ± 0,024	0,31 ± 0,174
T14	0,281 ± 0,065	0,248 ± 0,051	0,969 ± 0,116
T21	0,204 ± 0,048	0,255 ± 0,04	0,739 ± 0,006
T28	0,213 ± 0,064	0,196 ± 0,02	0,999 ± 0,25
T35	0,240 ± 0,049	0,203 ± 0,029	0,599 ± 0,189
T42	0,223 ± 0,046	0,207 ± 0,049	-

O protocolo empregado para obtenção deste 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 estão disponíveis para consulta no **Apêndice 2**.

5.1.2 Títulos de anticorpos IgG anticocaína nos filhotes

Não houve diferença estatisticamente significativa nos títulos médios de anticorpos IgG anti cocaína, no desmame, em amostras de filhotes diluídas em 1:200 no (protocolo com 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva), entre os filhotes de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e filhotes de mães pertencentes ao grupo placebo (Vacina $p = 0,136$ vs. Placebo $p = 0,139$) no T7 ($0,135 \pm 0,012$ vs. $0,141 \pm 0,013$) e no T14 ($0,135 \pm 0,011$ vs. $0,133 \pm 0,009$) conforme ilustrado na **Figura 5**.

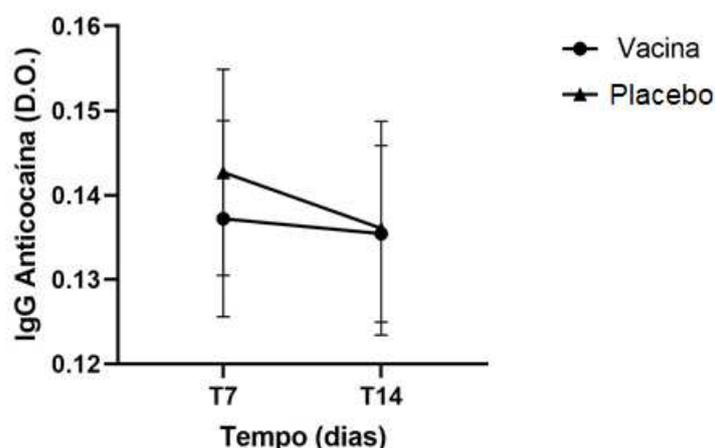


Figura 5 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de filhotes diluídas 1:200. Amostras de soro sanguíneo de filhotes no desmame de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e filhotes de mães pertencentes ao grupo placebo, expressos em densidade óptica (D.O) (eixo Y) por tempo, em dias (eixo X). Two-way ANOVA com pós teste de Tukey.

5.2 Avaliação de segurança da vacinação UFMG-VAC-V4N2: Parâmetros maternos e gestacionais

5.2.1 Ganho de massa corporal materno

As figuras abaixo ilustram a evolução da massa corporal das fêmeas, no período pré-gestacional (**Figura 6**) e período gestacional (**Figura 7**). Como esperado, tanto

fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo apresentaram um aumento gradativo do peso ao longo dos períodos. Não houve diferença estatisticamente significativa na evolução da massa corporal entre os grupos, tanto no período pré-gestacional (**Tabela 2**) quanto no período gestacional (**Tabela 3**).

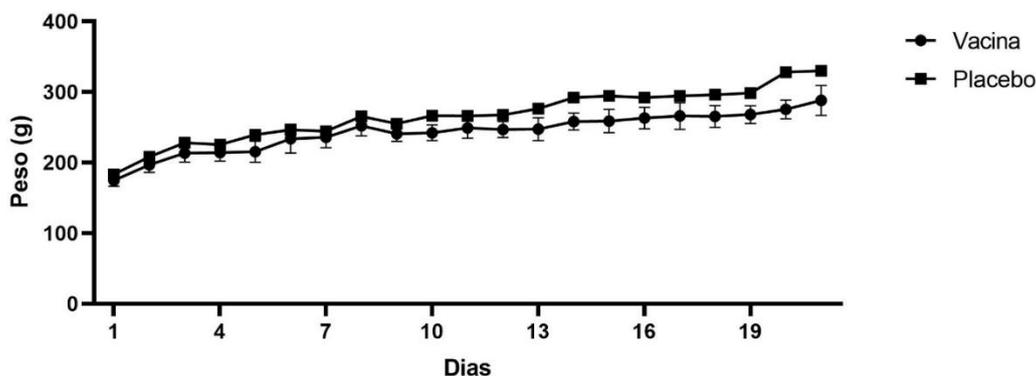


Figura 6 - Evolução da massa corporal absoluta média no período pré-gestacional. Expressa em gramas (g) (eixo Y), no período pré-gestacional (eixo X) de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. Teste T não pareado com correção de Welsh.

Tabela 2 - Evolução da massa corporal média no período pré-gestacional

Dias	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Valor P
D1	174,8 ± 8,87	194,2 ± 31,16	p = 0,560
D4	214,1 ± 227,25	227,2 ± 11,73	p = 0,560
D7	235,7 ± 14,45	242 ± 10,96	p = 0,824
D10	242,2 ± 11,18	265,2 ± 13,45	p = 0,178
D13	247,3 ± 16,11	279,5 ± 20,00	p = 0,191
D16	263 ± 15,08	294,75 ± 28,60	p = 0,403
D19	268 ± 12,61	301,75 ± 24,25	p = 0,365

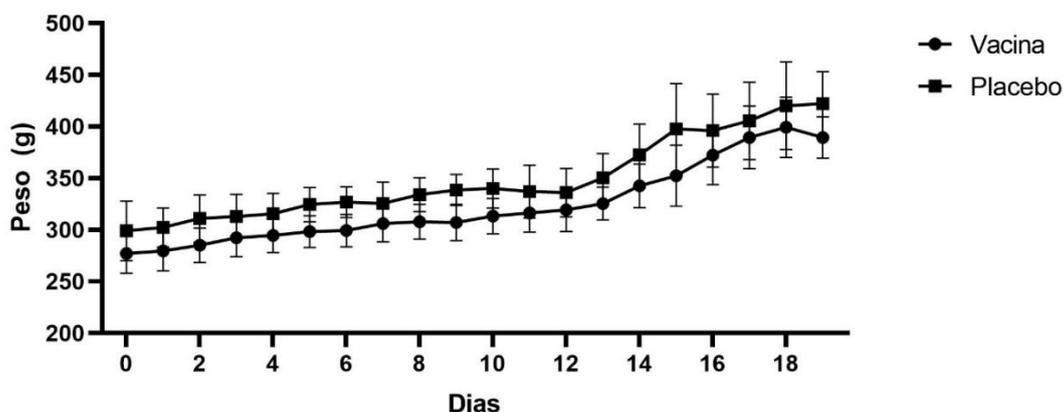


Figura 7- Evolução da massa corporal absoluta média no período gestacional. No eixo Y mostrado o peso em gramas (g), no período gestacional (eixo X) de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. Teste T não pareado com correção de Welsh.

Tabela 3 - Evolução da massa corporal média no período gestacional

Dias	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Valor p
D0	277,1 ± 19,08	299 ± 28,94	p = 0,787
D2	285 ± 16,613	311 ± 22,87	p = 0,787
D4	294,6 ± 16,40	315,5 ± 19,80	p = 0,821
D6	299,2 ± 15,70	326,7 ± 14,97	p = 0,387
D8	307,8 ± 16,69	334 ± 16,43	p = 0,518
D10	313,2 ± 17,04	340 ± 18,92	p = 0,614
D12	319,3 ± 21,09	336 ± 23,33	p = 0,873
D14	342,5 ± 21,10	372,6 ± 29,68	p = 0,873
D16	372,4 ± 28,60	396 ± 35,35	p = 0,882
D18	399,4 ± 29,2	420 ± 42,42	p = 0,882
D20	389,3 ± 20,0	422 ± 31,11	p = 0,873

Não houve diferença estatística significativa na evolução da massa corporal entre os grupos, no durante o período pós-gestacional (**Figura 8 e Tabela 4**).

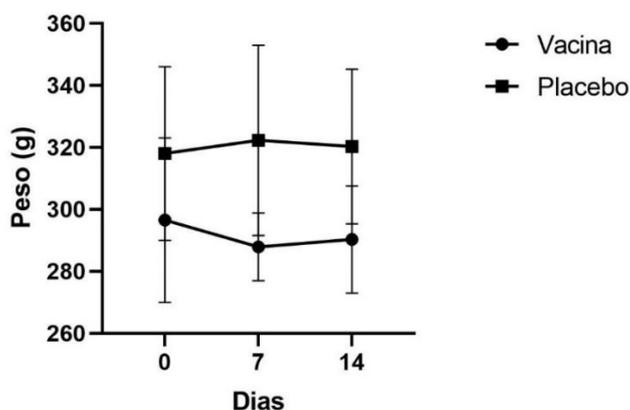


Figura 8 - Evolução da massa corporal absoluta média no período pós gestacional. Peso em gramas (g) (eixo Y), no período pós- gestacional (eixo X) de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. Teste T não pareado com correção de Welsh.

Tabela 4 - Evolução da massa corporal média no período pós-gestacional

Dias	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Valor p
D0	296,5 ± 26,52	318 ± 28,05	p = 0,251
D7	287,8 ± 10,88	322 ± 30,70	p = 0,244
D14	290,2 ± 17,31	320,2 ± 24,95	p = 0,244

5.2.2 Consumo alimentar e ingestão hídrica materna

O consumo alimentar e hídrico foi acompanhado diariamente, no período pré gestacional, durante a gestação e na lactação. O consumo se mostrou uniforme durante o período pré-gestacional e gestacional para o consumo alimentar (**Figura 9**) e hídrico (**Figura 10**).

Não houve diferença estatística significativa entre o grupo de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e placebo no consumo alimentar ($56,50 \pm 13,73$ vs. $55,54 \pm 10,2$) e ingestão hídrica ($107,2 \pm 29,29$ vs. $108,1 \pm 26,82$) no período pré-gestacional. E, também, durante o período gestacional, no consumo alimentar ($53,19 \pm 13,05$ vs. $54,28 \pm 10,78$) (**Figura 9**) e ingestão hídrica ($117,2 \pm 44,97$ vs. $134,9 \pm 35,31$) (**Figura 10**).

No período de lactação foi registrado um aumento do consumo de ração e água. Porém, da mesma forma, não foi constatada diferença estatística entre o grupo de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e placebo, tanto para o consumo alimentar ($147,4 \pm 39,98$ vs. $135,0 \pm 33,59$) como para a ingestão hídrica ($239,5 \pm 70,74$ vs. $237,3 \pm 68,73$) (**Figuras 9 e 10**).

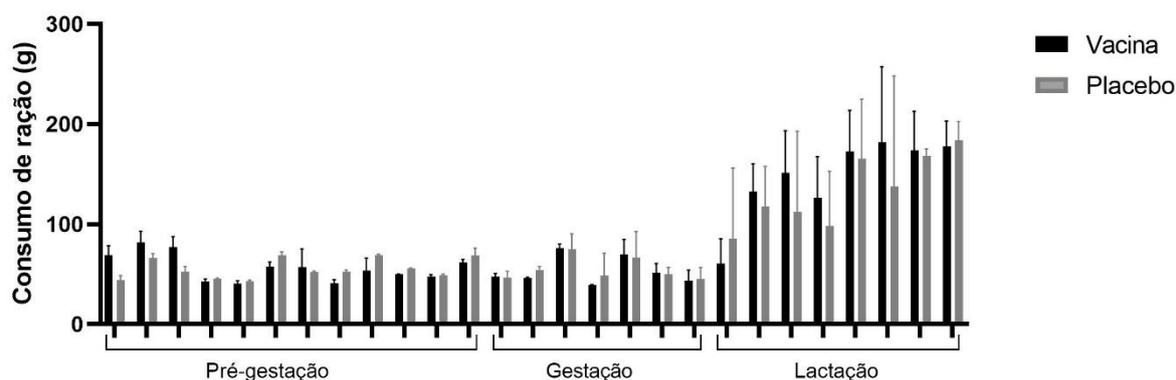


Figura 9 - Média de consumo alimentar materno nos períodos pré-gestação, gestação e lactação. Consumo alimentar materno, expressos em gramas (g) (eixo Y) nos períodos pré-gestacional, gestacional e lactação (eixo X) entre os grupos de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. Teste de Mann Whitney.

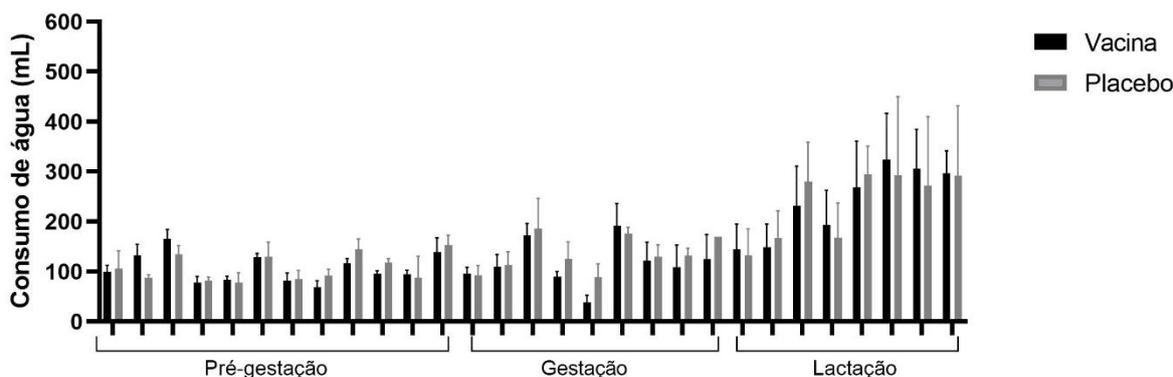


Figura 10 - Média de ingestão hídrica materna nos períodos pré-gestação, gestação e lactação. Consumo hídrico materno, expressos em mililitros (mL) (eixo Y) nos períodos pré-gestacional, gestacional e lactação (eixo X) entre os grupos de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. Teste de Mann Whitney.

5.2.3 Índice de fertilidade

A **Figura 11** ilustra o número de fêmeas prenhas em relação a fêmeas não prenhas. Do total de 8 fêmeas acasaladas e imunizadas com UFMG-VAC-V4N2, 7 ficaram prenhas (87,50%); e do total de 4 fêmeas acasaladas do grupo placebo, 3 ficaram prenhas (75,00%). Já porcentagem de ratas acasaladas que não se tornaram prenhas, foi menor, sendo em ambos os grupos em torno de 8%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = >0,999$; $\alpha = 0,05$).

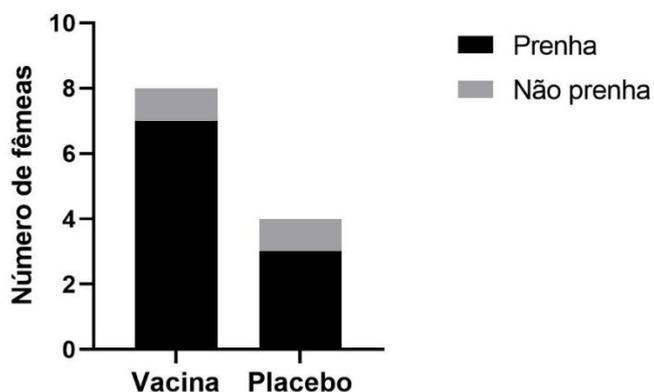


Figura 11 – Índice de Fertilidade. Número de fêmeas prenhas e não prenhas expressas em porcentagem (eixo X) entre fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo (eixo Y). Teste Exato de Fisher.

5.3 Avaliação de segurança da vacinação UFMG-VAC-V4N2: Parâmetros pós-natais e desenvolvimento dos filhotes

5.3.1 Índice de viabilidade

Os filhotes foram acompanhados diariamente, duas vezes ao dia, quanto a sobrevivência até o 4º dia pós-natal. No grupo de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2, 82 filhotes nasceram vivos (91,11%) e 8 filhotes morreram (8,89%) até o 4º dia após o nascimento. Já no grupo placebo, 37 filhotes nasceram vivos (94,87%) e 2 filhotes morreram (5,13%) até o 4º dia após nascimento (**Figura 12**). Ao término do quarto dia de avaliação, apenas 1 filhote do grupo placebo veio ao óbito no 8º dia pós-natal, cuja análise não mostrou nenhuma alteração macroscópica. Não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade de filhotes nascidos de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo ($p = 0,722$; $\alpha = 0,05$).

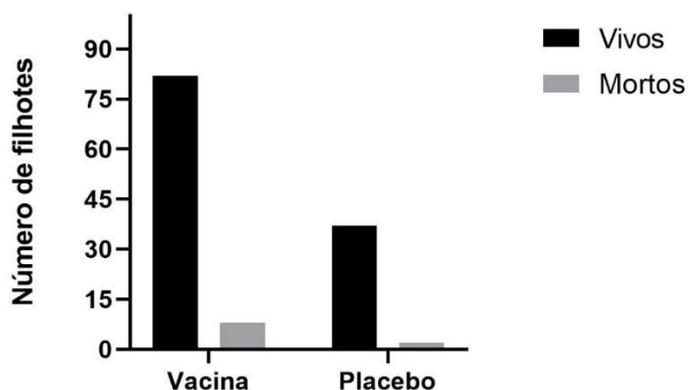


Figura 12 – Índice de Viabilidade. Número de filhotes vivos até o 4º dia de vida (eixo Y) entre grupo de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo (eixo X). Teste exato de Fisher.

5.3.2 Tamanho da ninhada

A **Figura 13** ilustra o número de filhotes por ninhada. No grupo de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2, a média foi de 13 filhotes por ninhada ($13 \pm 1,528$). No grupo placebo a média de filhotes por ninhada também foi de 13 filhotes ($13 \pm 2,082$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,818$; $\alpha = 0,05$).

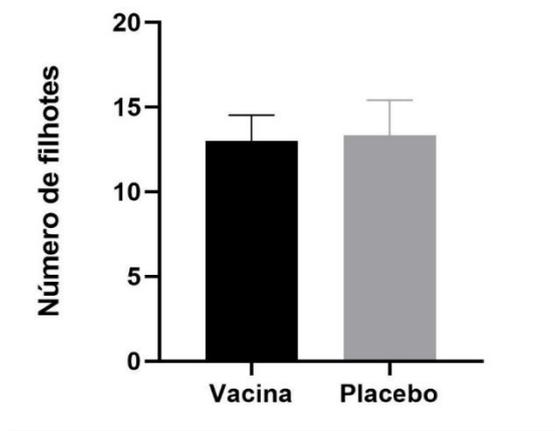


Figura 13 – Tamanho da Ninhada. Número médio de filhotes (eixo Y) em cada ninhada nos grupos de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo (eixo X). Teste T com correção de Welsh.

5.3.3 Ganho de massa corporal da ninhada

Os filhotes foram acompanhados diariamente para verificar o ganho de peso. Conforme esperado, o aumento do peso corporal foi gradativo e de forma proporcional durante o crescimento dos filhotes de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. Não houve diferença estatística significativa na evolução da massa corporal média (**Figura 14**), após o desmame entre as ninhadas de ambos os grupos (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. $43,20 \pm 14,617$ $p = 0,483$).

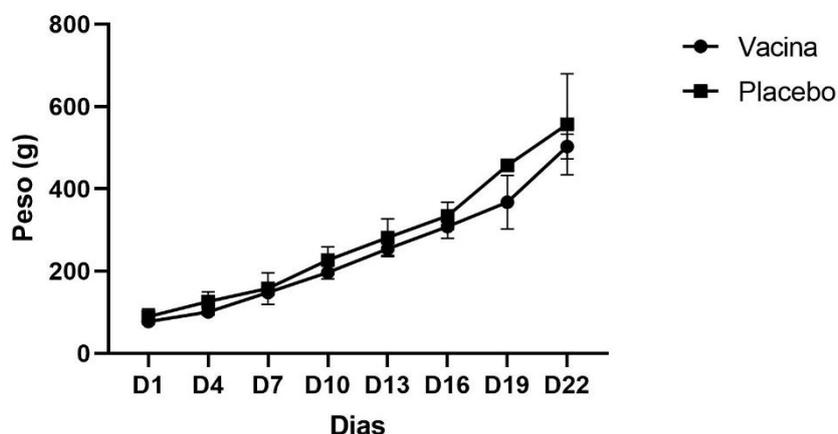


Figura 14 – Evolução da massa corporal média da ninhada. Expressa em gramas (g) (eixo Y), após o desmame (eixo X), em ninhadas de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo, Teste T com correção de Welsh.

5.3.4 Razão sexual

A proporção entre filhotes machos e fêmeas de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e do grupo placebo é apresentada na **Figura 15**. Notavelmente, no grupo das mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2, observou-se uma predominância de filhotes machos, totalizando 46 filhotes (56,10%), em contraste com 36 filhotes fêmeas (43,90%). Já no grupo placebo, houve uma maior proporção de filhotes fêmeas, compreendendo um total de 22 filhotes (59,46%), enquanto os filhotes machos totalizaram 15 (40,54%). Não houve diferença estatisticamente significativa na razão sexual entre os grupos ($p = 0,164$; $\alpha = 0,05$).

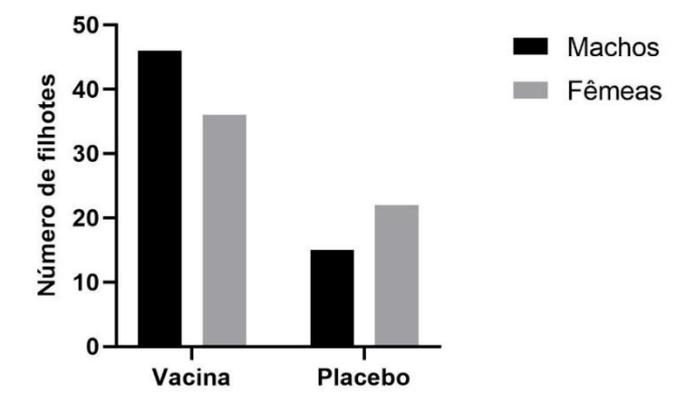


Figura 15 – Razão Sexual dos Filhotes. Proporção do número de filhotes (eixo Y) machos em relação ao número de fêmeas, em ninhadas de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo (eixo X). Teste Exato de Fisher.

5.4 Análise do perfil bioquímico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo

Os valores de referência para os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram consultados através do manual *Clinical Laboratory Parameters for Clr: CD (SD) Rats* do Laboratório Charles River (Giknis, 2006).

5.4.1 Ureia e Creatinina

As principais análises bioquímicas usadas para avaliar a função renal envolvem a medição dos níveis séricos de ureia e creatinina. Esses analitos desempenham um papel fundamental como indicadores de possíveis variações na taxa de filtração glomerular, sendo utilizados como parâmetros para monitorar a progressão de doenças renais (Miller, 1999).

Conforme ilustrado na **Figura 16A**, em ambos os grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo, foram observados níveis de ureia acima da normalidade nos três tempos de coleta. No tempo (T3) não houve uniformização dos níveis, sendo o grupo vacinado com níveis superiores ao grupo placebo.

Os resultados dos níveis de creatinina variaram entre os grupos experimentais. Antes da primeira imunização (T-10), todos os animais apresentaram níveis de creatinina acima do limite normal. No entanto, após a primeira imunização, no tempo (T3) e durante a gestação no tempo (T48), o grupo vacinado apresentou uma uniformização dos valores, com apenas dois animais apresentando níveis acima da normalidade durante o período gestacional, enquanto no grupo placebo foram observados valores abaixo da normalidade (**Figura 16B**). Não houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado. Os valores podem ser consultados no **Apêndice 3**.

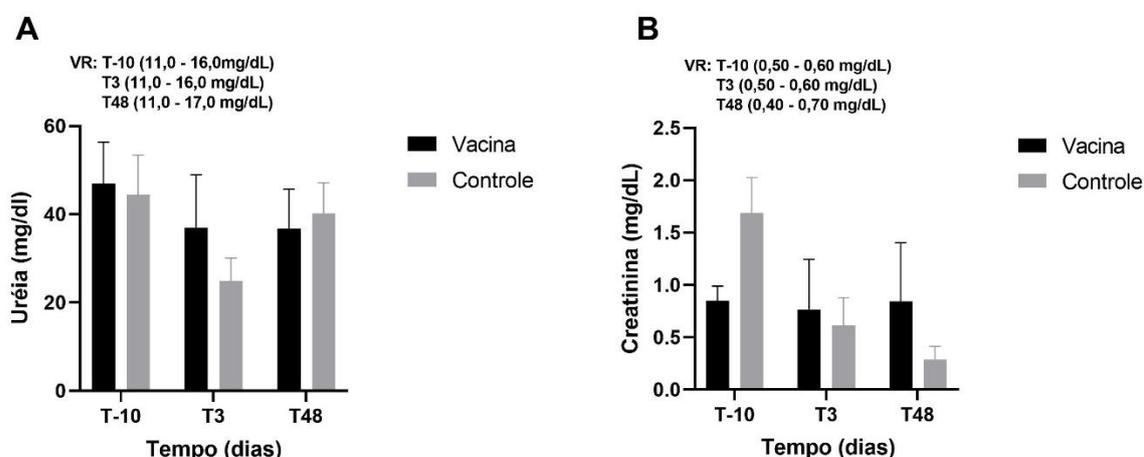


Figura 16 – Níveis séricos de ureia e creatinina. Dosagem de parâmetros de função renal expressos em mg/dL (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. A. Dosagem de ureia B. Dosagem de creatinina. VR: valor de referência.

5.4.2 ALT, AST e Fosfatase Alcalina

Lesões nas células do parênquima hepático podem ser identificadas por meio da medição de enzimas que indicam vazamento hepatocelular, como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (ALP). O aumento da atividade dessas enzimas no sangue pode estar associado ao vazamento através das membranas celulares. A quantificação dessas enzimas é útil para o diagnóstico e monitoramento de lesão hepática (Green; Al-Humadi 2017).

Em ambos os grupos, os animais apresentaram níveis de ALT, AST e ALP acima dos valores da normalidade na pré-imunização (-10) e após a primeira imunização (T3).

Durante a gestação, após a quinta dose (T48), sete animais do grupo vacinado e dois animais do grupo placebo apresentaram valores de ALT (**Figura 17A**) e AST (**Figura 17B**) acima da normalidade. Nesse tempo, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na dosagem de ALT ($p=0,081$).

Ainda no T48, os resultados de fosfatase alcalina (ALP) apresentaram-se normais, em ambos os grupos (**Figura 17C**). Para os demais parâmetros e tempos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Os valores podem ser consultados no **Apêndice 3**.

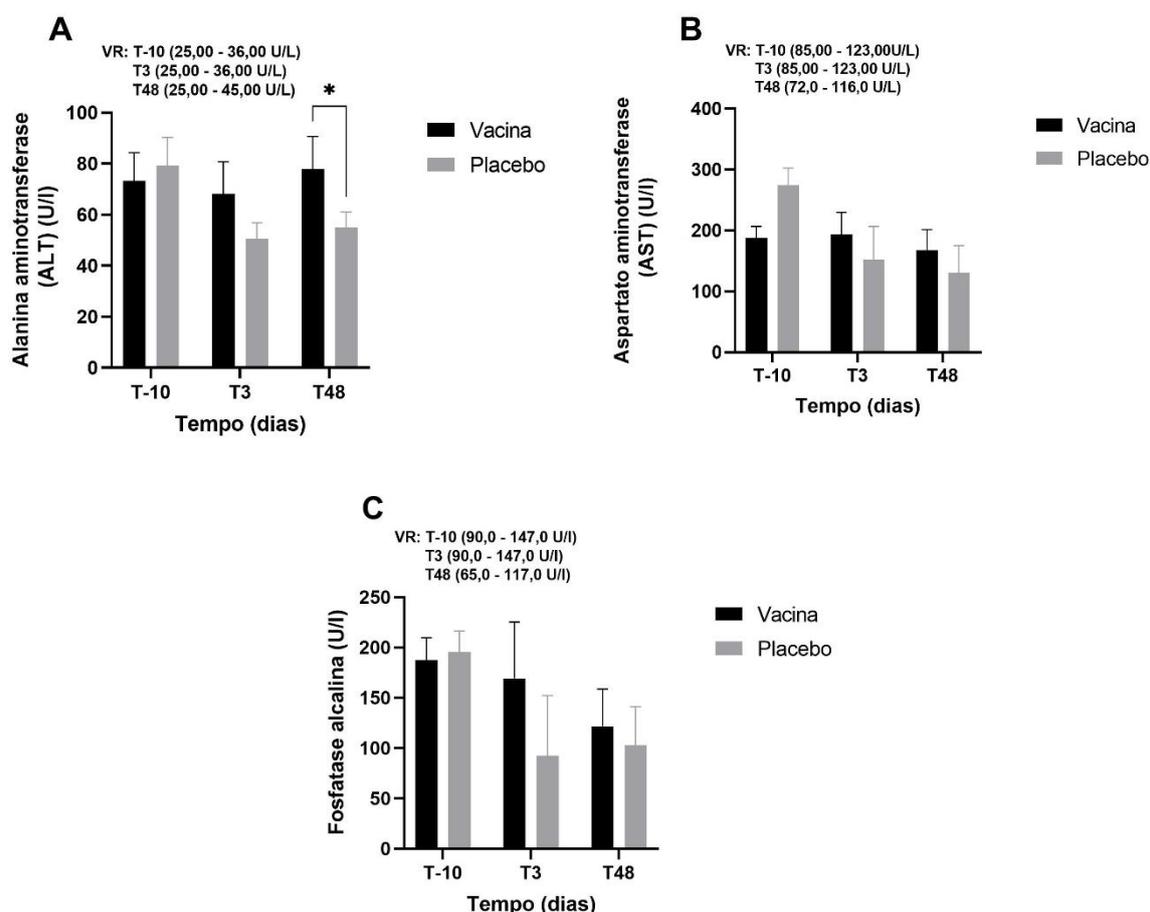


Figura 17– Níveis séricos de enzimas hepáticas. Dosagem de enzimas expressos em U/L (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. **A.** Dosagem de ALT **B.** Dosagem de AST. **C.** Dosagem de ALP. VR: valor de referência. * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.4.3 Glicose

Diversos hormônios, incluindo a insulina, o glucagon, as catecolaminas, hormônio do crescimento e os corticosteroides, têm a capacidade de influenciar os níveis de glicose no sangue, regulando sua entrada ou remoção da corrente sanguínea. Flutuações no funcionamento do sistema hormonal são altamente sensíveis, o que torna a medição da glicose sanguínea um marcador importante para detecção de possíveis efeitos adversos (Green; Al-Humadi 2017).

Os níveis de glicose permaneceram dentro dos parâmetros normais, tanto no período pré-imunização (T-10) quanto após a primeira dose (T3). No entanto, durante a gestação, após a administração da quinta dose (T48), as fêmeas grávidas em ambos os grupos apresentaram níveis de glicose abaixo do limite considerado normal (120,0 a 186,0 mg/dL). Por outro lado, as fêmeas não grávidas, tanto no grupo UFMG-VAC-V4N2 quanto no placebo, mantiveram valores de glicose dentro da faixa normal (**Figura 18**). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e os intervalos de tempo ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 3**.

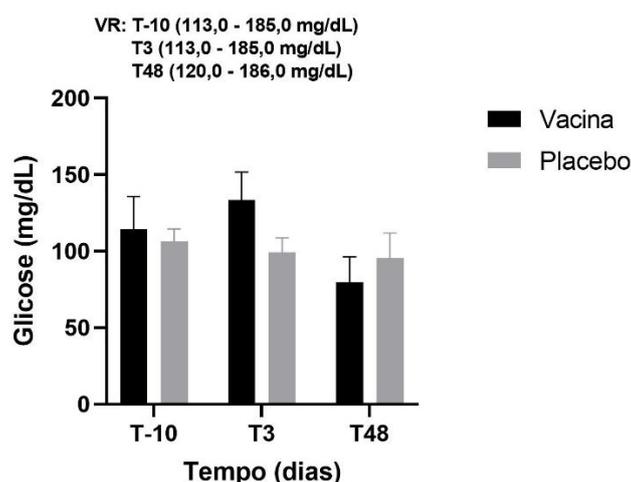


Figura 18 – Níveis séricos de glicose. Dosagem de glicose expressos em mg/dL (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. VR: valor de referência.

5.4.4 Proteína total e albumina

As proteínas totais presentes no plasma e suas diferentes frações são essenciais na manutenção da pressão osmótica. A quantificação dessas proteínas fornece dados importantes acerca de condições clínicas, como o estado de hidratação, existência

de doenças inflamatórias e metabolismo proteico. A redução das concentrações de proteínas totais em animais saudáveis pode indicar restrição na ingestão de aminoácidos devido a dietas com baixo teor de proteína (Campello *et al.*, 2009).

O resultado dos parâmetros de proteínas totais (**Figura 19A**) e albumina (**Figura 19B**) se apresentaram uniformes em relação aos tempos nos dois grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo, e não apresentaram diferenças em relação aos valores considerados dentro do limite da normalidade. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e os intervalos de tempo ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 3**.

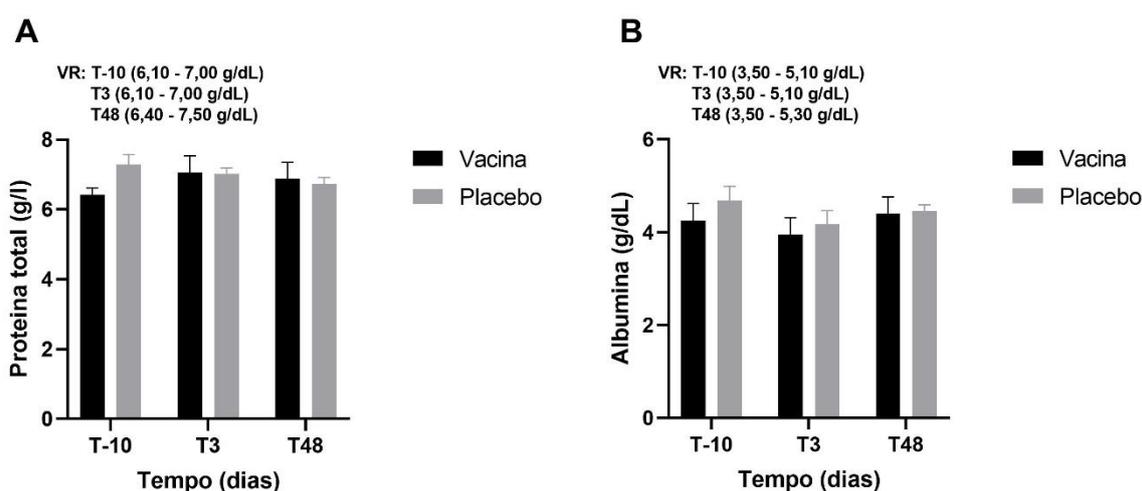


Figura 19 – Níveis séricos de proteínas. Dosagem de proteínas expressos em g/dl (eixo X) em três tempos distintos (eixo Y) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. A. Dosagem de proteínas totais B. Dosagem de albumina. VR: valor de referência.

5.4.5 Colesterol total e Triglicérides

A dosagem dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides é empregada como uma abordagem de triagem para identificar a presença de hiperlipidemia. O colesterol é derivado de fontes dietéticas e sintetizado a partir de acetil-CoA principalmente no fígado e outros tecidos como intestinos, glândulas supra-renais e órgãos reprodutores (Campello *et al.*, 2009).

Os resultados dos níveis de colesterol nos dois grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo estavam dentro dos valores normais antes da imunização (T-10). Após a primeira imunização (T3), foi observado um aumento nos níveis de colesterol em três animais imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e dois do grupo placebo. No

entanto, no período gestacional e após a administração da quinta dose (T48), os níveis de colesterol retornaram aos níveis da normalidade (**Figura 20A**).

A **Figura 20B** ilustra os valores de triglicérides, que se mantiveram dentro dos parâmetros normais, tanto na pré-imunização (T-10) quanto após a primeira imunização (T3). Após a quinta dose (T48), as fêmeas grávidas de ambos os grupos apresentaram níveis elevados de triglicérides. No grupo de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2, houve uma maior variabilidade, como indicado pelo desvio-padrão mais alto (Vacina 71% vs. Placebo 57%), devido ao fato de duas fêmeas deste grupo estarem em estágios mais avançado de gestação, o que resultou em valores superiores em comparação com o restante do grupo. Além disso, duas fêmeas que não estavam grávidas, pertencentes a ambos os grupos, mantiveram os níveis de triglicérides dentro dos limites normais. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e nos intervalos de tempo ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 3**.

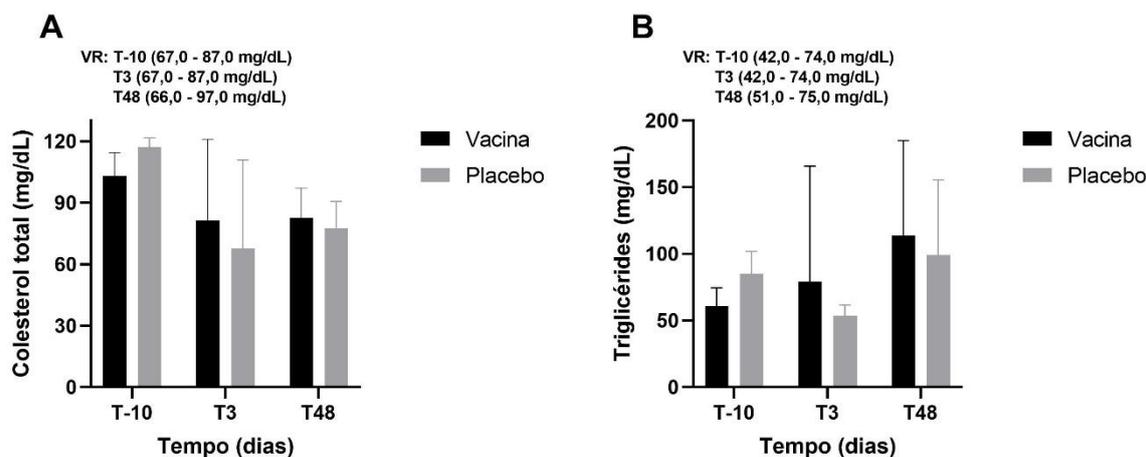


Figura 20 – Níveis de colesterol total e triglicérides. Dosagem expressos em mg/dl (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. **A.** Dosagem de colesterol **B.** Dosagem de triglicerídes. VR: valor de referência.

5.5 Análise do perfil hematológico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo

5.5.1 Hemácias totais, hematócrito e hemoglobina

A hematologia clínica é uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos animais, tendo o hemograma como um dos métodos de avaliação de diagnóstico e

prognóstico de enfermidades. A diminuição do número de hemácias no sangue circulante, e a diminuição do teor de hemoglobina nas hemácias, ou ambos, estão associados e caracterizam um quadro de anemia (Jain, 1993). O valor do hematócrito ou volume globular reflete a massa total de células sanguíneas na unidade de volume e este parâmetro apresenta-se baixo em todas as anemias (Miller, 1999).

O resultado do eritrograma se apresentou acima dos limites da normalidade em todos os tempos em relação aos dois grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo (**Figuras 21A, 21B e 21C**). A exceção, foi após a primeira imunização (T3) para o grupo placebo, que apresentou níveis de hemoglobina dentro da normalidade. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e nos intervalos de tempo ($p > 0,05$). Os valores podem ser consultados no **Apêndice 4**.

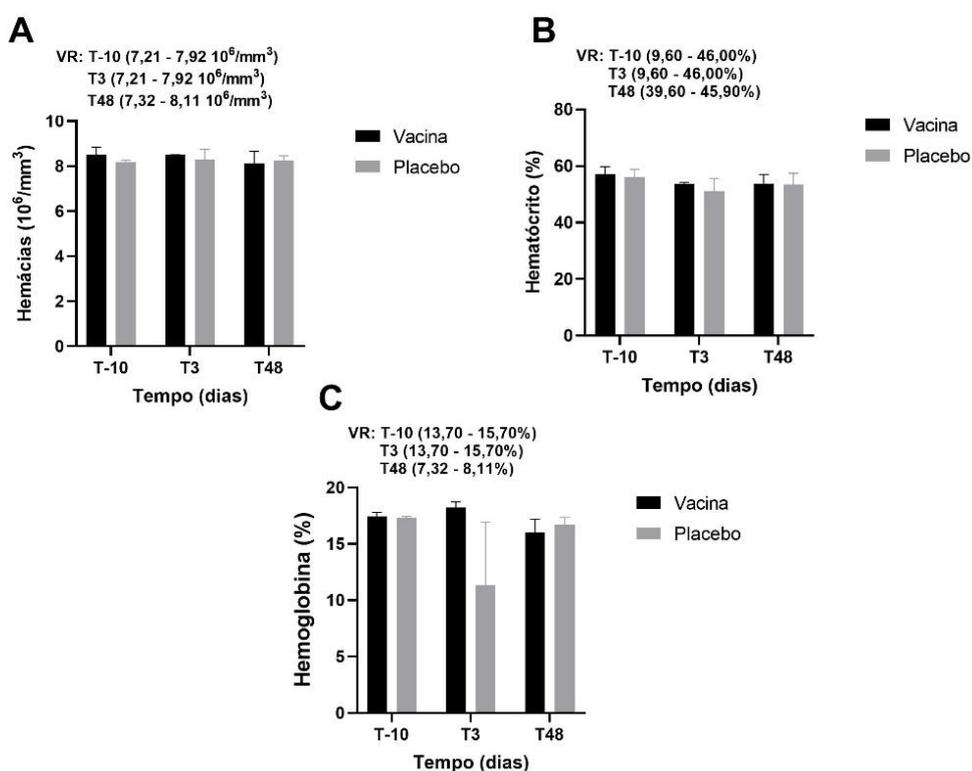


Figura 21 - Eritrograma. Dosagem de hemácias em expressos em mm^3 e demais parâmetros expressos em % (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo A. Hemácias totais B. Hematócrito. C. Hemoglobina total. VR: valor de referência.

5.5.2 Volume corpuscular Médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Os índices hematimétricos desempenham um papel fundamental na avaliação e classificação morfológica das anemias. O VCM (Volume Corpuscular Médio) informa sobre o tamanho das hemácias, o HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) reflete a cor das hemácias, e o CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média) fornece informações sobre a concentração de hemoglobina nas hemácias (Miller, 1999).

O resultado dos parâmetros hematimétricos se apresentou uniforme em relação aos tempos nos dois grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo. O valor de VCM estava acima dos limites da normalidade em todos os tempos (**Figura 22A**); o valor de HCM estava dentro do limite da normalidade, em ambos os grupos (**Figura 22B**); e o valor de CHCM apresentou valores abaixo dos valores da normalidade, em ambos os grupos (**Figura 22C**). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e os intervalos de tempo ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 4**.

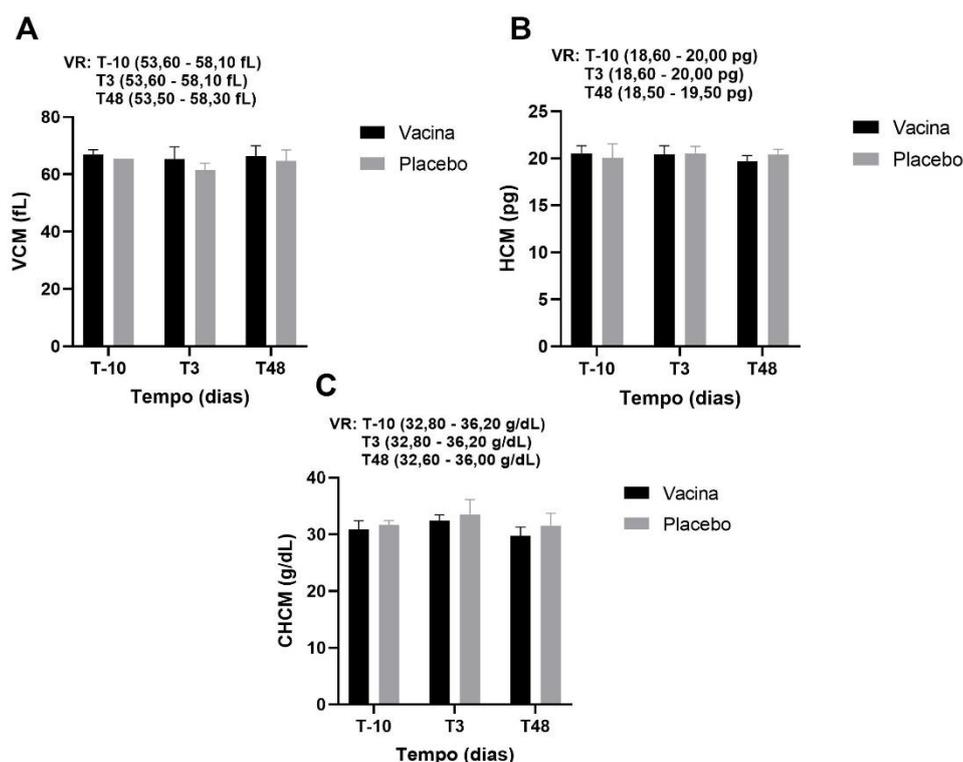


Figura 22 - Parâmetros hematimétricos. Dosagem do VCM expressos em fL, dosagem do HCM expressos em pg e dosagem do CHCM expressos em g/dl (eixo y) em três tempos distintos (eixo X)

entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. **A.** Volume corpuscular Médio (MCV). **B.** Hemoglobina corpuscular média (MCH) **C.** Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). VR: valor de referência.

5.5.2 Leucócitos totais e linfócitos

Os linfócitos constituem a maior proporção de leucócitos encontrados no sangue periférico de roedores, representando aproximadamente 60% a 75%; já os leucócitos representam 70% a 80% da população total (Kerr, 2003). Através do leucograma, é possível avaliar as células responsáveis pela defesa do organismo e a capacidade de resposta destas células em processos infecciosos, inflamatórios agudos e crônicos (Miller, 1999).

Os resultados dos valores da série branca se mostraram uniforme em ambos os grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo. Conforme ilustrado na **Figura 23A** os níveis de leucócitos totais permaneceram dentro dos limites da normalidade em todos os tempos, exceto por um animal do grupo placebo que apresentou valores acima do padrão. A **Figura 23B** ilustra os valores de linfócitos, destacando que apenas durante o período gestacional, após a quinta dose (T48), três animais no grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 e dois no grupo placebo apresentaram níveis de linfócitos abaixo do intervalo normal. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e os intervalos de tempo para todos os parâmetros analisados ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 4**.

Tanto no grupo de animais imunizados com UFMG-VAC-V4N2 quanto no grupo placebo, todos mantiveram níveis de eosinófilos (**Figura 23C**) e neutrófilos (**Figura 23D**) dentro da faixa da normalidade antes da imunização (T-10) e após a primeira imunização (T3).

Durante a gestação, após a administração da quinta dose (T48), observou-se uma diminuição nos valores de neutrófilos abaixo da faixa normal em seis animais do grupo UFMG-VAC-V4N2 e quatro animais placebos (**Figura 23C**). Em relação aos níveis de eosinófilos, ambos os grupos apresentaram aumento dos valores em relação a normalidade, com destaque para um animal do grupo placebo que apresentou valores acima do normal (**Figura 23D**). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e os intervalos de tempo ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 2**.

5.5.3 Contagem de plaquetas

As plaquetas são consideradas essenciais na manutenção da hemostasia, que é o mecanismo de controle e prevenção de sangramento excessivo no organismo. A avaliação da contagem de plaquetas representa um parâmetro de grande relevância em estudos pré-clínicos de toxicidade. Isso se deve à possibilidade de diversos agentes químicos, incluindo medicamentos, causarem a redução do número de plaquetas no sangue, condição conhecida como plaquetopenia (Green; Al-Humadi 2017).

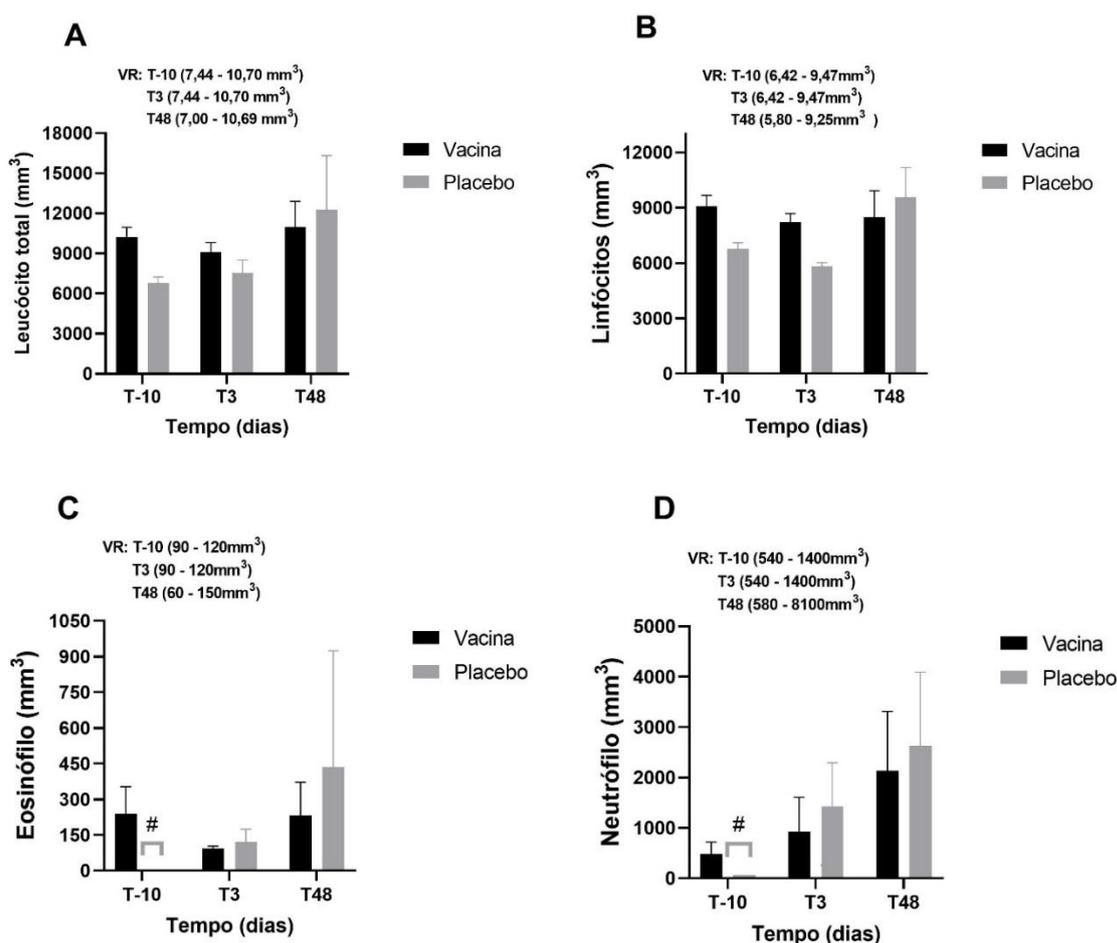


Figura 23 – Leucograma. Dosagem de células sanguíneas expressas em mm³ (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. A. Leucócitos totais B. Linfócitos C. Eosinófilos D. Neutrófilos VR: valor de referência; símbolo #: significa insuficiência da amostra.

Os níveis de plaquetas (**Figura 24**) nos dois grupos experimentais, UFMG-VAC-V4N2 e placebo, apresentaram-se abaixo dos níveis normais no período pré-imunização (T-10). Após a primeira imunização (T3), apenas um animal de cada grupo apresentou

valores abaixo da faixa normal. No decorrer do período de gestação, após a quinta dose (T48), observou-se que quatro animais no grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 e dois animais no grupo placebo exibiram níveis de plaquetas abaixo do normal. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos intervalos de tempo ($p > 0,05$), os valores podem ser consultados no **Apêndice 4**.

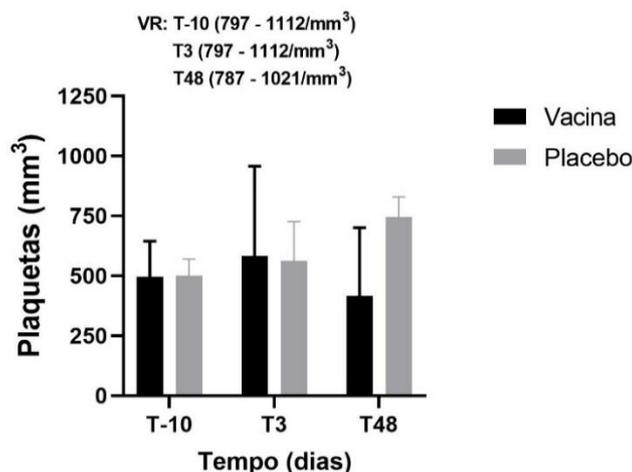


Figura 24 – Plaquetograma. Contagem de plaquetas expressos em mm³ (eixo Y) em três tempos distintos (eixo X) entre os grupos de fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo. VR: valor de referência.

5.6 Resultado Histopatológico

O exame histopatológico do coração, cérebro, fígado, baço, bexiga, útero e ovários de todas as fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 ou placebo apresentaram integridade tecidual.

Os animais dos dois grupos experimentais não apresentaram nenhum tipo de lesão histológica no parênquima dos órgãos sexuais. A **(Figura 25)** apresenta corte da região cortical do endométrio de uma rata pertencente ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2. A **(Figura 26)** apresenta corte da região cortical do útero e ovários de uma fêmea do grupo placebo, evidenciando folículos em diversos estágios de amadurecimento. Ambos os tecidos apresentaram estruturas integras.

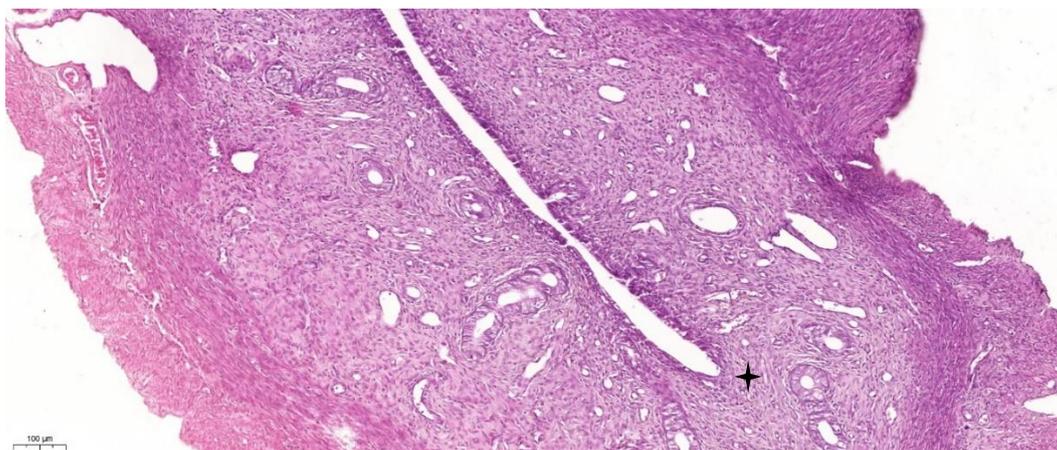


Figura 25 – Fotomicrografia do endométrio de rata pertencente ao grupo imunizado com a UFMG-VAC-V4N2. Aspecto microscópico do endométrio. Observa-se cavidade do endométrio em fase proliferativa com a presença de glândulas (HE, 100x).

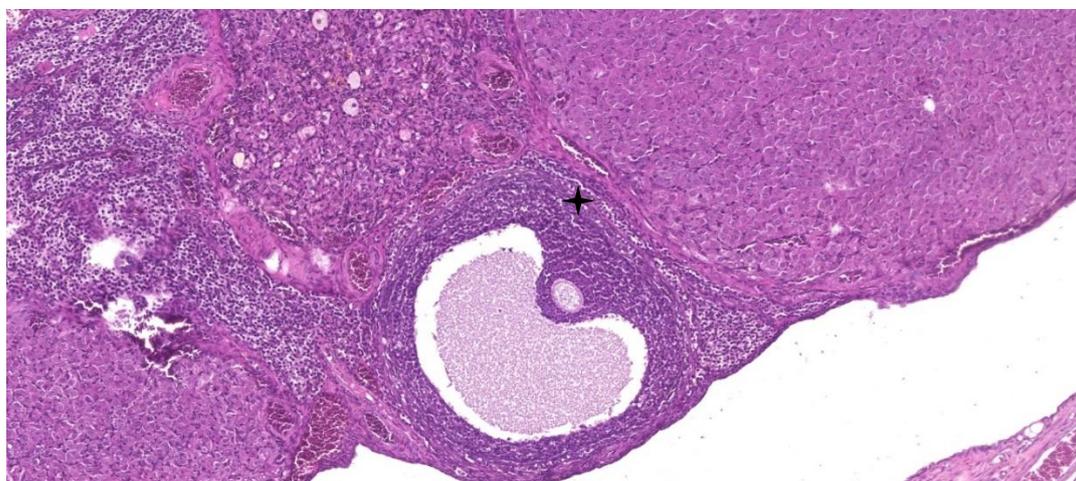


Figura 26 – Fotomicrografia do Folículo ovariano de rata pertencente ao grupo placebo. Aspecto microscópico da cortical ovariana. Observa-se, folículo de Graaf, com camadas de células foliculares em torno do antro e grupo de células foliculares circundando o ovócito (HE, 100x).

A análise do corte histológico dos rins, de oito fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 (**Figura 27**) e duas fêmeas do grupo placebo (**Figura 28**), apresentaram acúmulo de material proteico na luz dos túbulos renais.

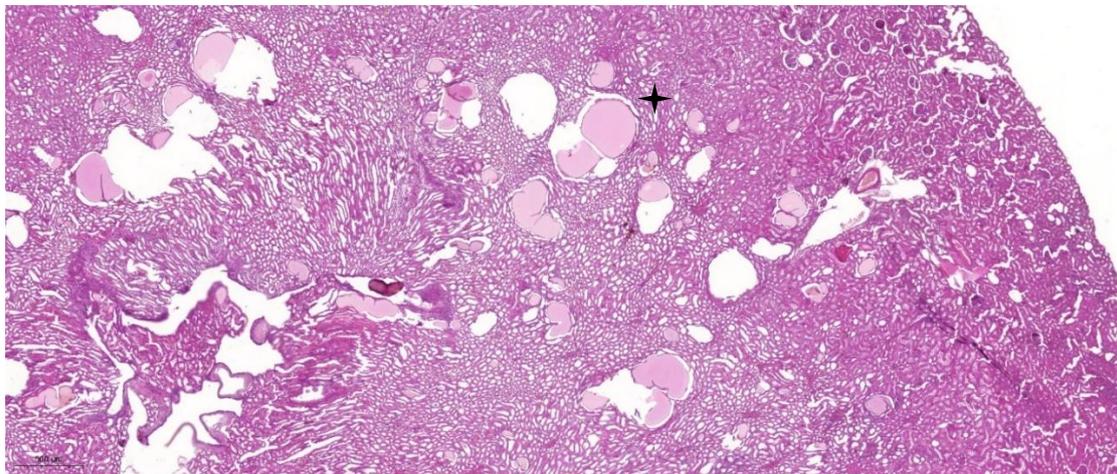


Figura 27 – Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo imunizado com a UFMG-VAC-V4N2. Aspecto microscópico de corte de renal de uma fêmea pertencente ao grupo imunizada com UFMG-VAC-V4N2. Observa-se algumas dilatações sobretudo em região medular, com material eosinofílico internamente, sugestivo de cilindros hialinos (HE, 400x).

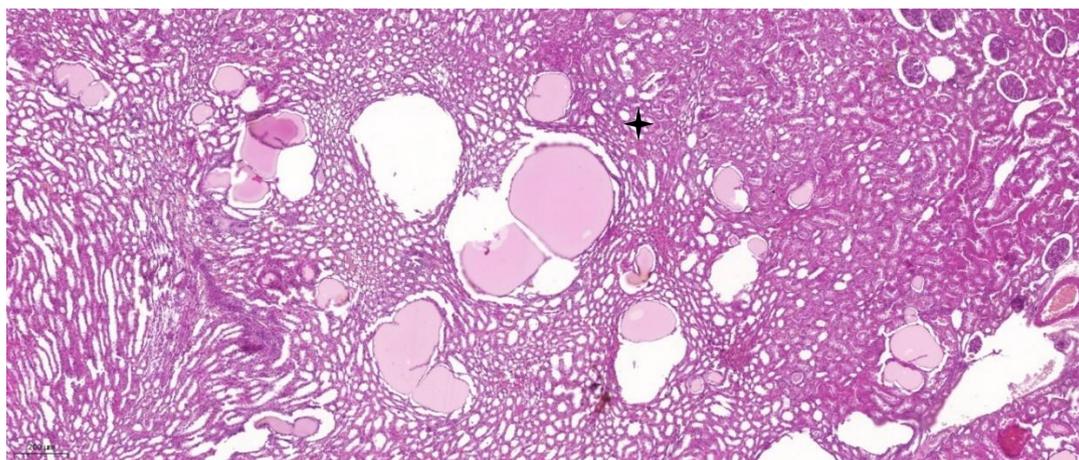


Figura 28 – Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo imunizado com a UFMG-VAC-V4N2. Aspecto microscópico de corte renal, evidenciando dilatações em medula renal e material eosinofílico (HE, 1000x).

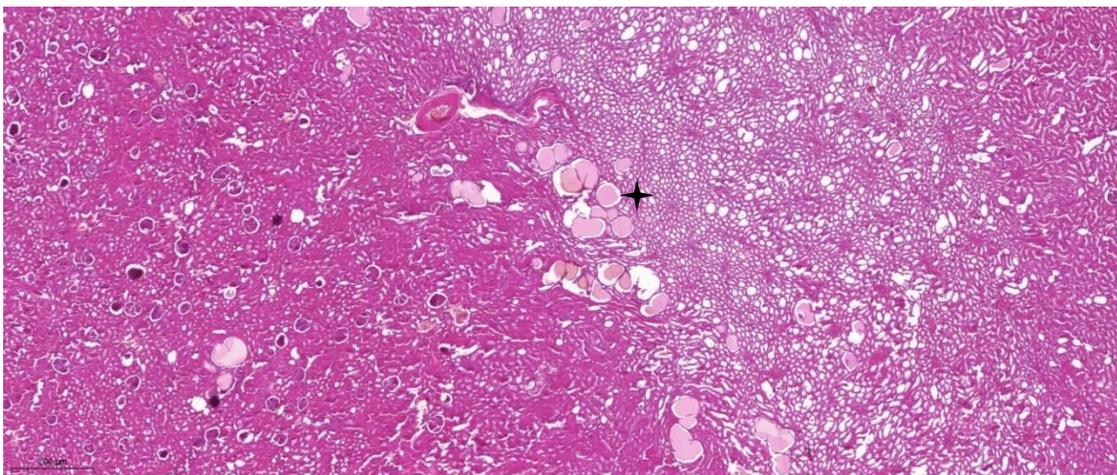


Figura 29 - Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo placebo. Aspecto microscópico de corte renal. Observa-se tanto cortical quanto medula renal, com presença de estruturas sugestivas de cilindros hialinos (HE, 400x).



Figura 30 - Fotomicrografia de Rim de rata pertencente ao grupo placebo. Aspecto microscópico de corte renal. Evidencia-se as formações proteicas na região de transição entre cortical e medular renal (HE, 1000x).

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

A análise do lote da molécula UFMG-V4N2 utilizado na formulação vacinal foi realizada por meio de ressonância magnética nuclear (RMN). O relatório técnico indica que a molécula exibe sinais de degradação que sugerem possível hidrólise do grupo benzoato presente na estrutura da cocaína, afetando ao menos 20,54% dos haptenos que constituem a molécula. Os detalhes dessa análise estão disponíveis para consulta no **Apêndice 5**.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo não permitiram confirmar as hipóteses formuladas, uma vez que não foram detectados níveis mensuráveis de anticorpos IgG anticocaína nas amostras de soro sanguíneo de ratas submetidas a imunização com a UFMG-VAC-V4N2, bem como em seus filhotes. Diante desses resultados negativos, procedeu-se a uma investigação das possíveis justificativas e descobriu-se que a formulação de UFMG-VAC-V4N2 testada teve seu IFA degradado em alguma fase do processo de produção. Desta forma, os resultados do presente estudo devem ser vistos à luz desta importante limitação.

Nos capítulos seguintes serão discutidos os outros resultados obtidos, contudo, eles também são inconclusivos, visto a degradação do IFA na formulação testada.

6.1 Produção de anticorpos IgG anticocaína nas mães e aquisição imunológica passiva pela prole

As ratas fêmeas imunizadas com a vacina UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado, não apresentaram quantificação com diferenças estatísticas significativas para anticorpos IgG anticocaína em nenhum dos tempos correspondentes às imunizações e aos reforços, conforme apresentado na **Figura 4**. De acordo com o protocolo de imunização, as ratas receberam quatro doses da formulação vacinal no período pré-gestacional. Estes resultados sugerem que a ausência na produção de anticorpos não está unicamente relacionada à gravidez, mas como está mais relacionado à degradação do IFA da formulação testada. Embora a gravidez seja um período marcado por uma importante imunossupressão a antígenos e às modificações nas respostas imunológicas inatas e adaptativas, é conhecido que as gestantes são capazes de reagir de maneira eficaz à resposta imunológica humoral induzida por vacinas (Chu; Englund, 2017; Munoz, 2007). Inclusive quando imunizadas com uma formulação anticocaína como nos estudos pré-clínicos conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório NaVes (De Almeida Augusto *et al.*, 2021), foi observada a produção de anticorpos e a transmissão da imunidade passiva em ratas grávidas previamente imunizadas com a vacina GNE-KLH.

O método analítico utilizado para a quantificação de anticorpos IgG anticocaína foi aplicado seguindo o protocolo descrito por Fetissov (2011), que foi posteriormente

adaptado por Pereira (2019). O protocolo consiste na fixação de 2 mg/mL de cocaína em fase adsorviva, e amostras de soro diluídas em uma proporção de 1:200. Esse método foi estabelecido como o padrão-ouro para as futuras pesquisas destinadas a dosagem de anticorpos anticocaína em animais no laboratório NaVes. Portanto, no presente estudo foi definido como a condição ideal para quantificar anticorpos IgG anticocaína em amostras sorológicas de modelos murinos imunizados com a vacina UFMG-VAC-V4N2.

Em estudos anteriores, este protocolo demonstrou resultados satisfatórios na quantificação de anticorpos IgG anticocaína em camundongos (Assis *et al.*, 2023; Da Silva Neto *et al.*, 2022) e em ratos (Caligiorne *et al.*, 2019, no prelo).

A partir dos resultados negativos, ou seja, a ausência de quantificação de anticorpos IgG anticocaína nas amostras sorológicas das fêmeas imunizadas e de seus filhotes, em todas as diluições testadas, foi necessário verificar se haveria novas condições de quantificação para este trabalho. Foram testadas variações no método quanto à diluição das amostras. No entanto, a ausência de respostas permaneceu. Os resultados podem ser consultados no **(Apêndice 2)**. A vacina UFMG-VAC-V4N2, que apresentou, em outros estudos, indução da produção de anticorpos IgG anticocaína, foi submetida ao ensaio de ELISA em paralelo com as amostras sorológicas dos animais do presente estudo, a fim de verificar a reprodutibilidade do método padrão-ouro, sendo observada diferença estatisticamente significativa **(Figura 4)**. Esses resultados sugerem que não houve falhas metodológicas implicadas durante a execução do ensaio de ELISA.

O processo de padronização do método analítico de quantificação de anticorpos é determinado por condições específicas de cada estudo, levando em consideração a espécie animal, a via de administração do imunizante, perfil da resposta imunológica e estabilidade da formulação. Ademais, não foi observado nenhum viés relacionado ao método de quantificação de anticorpos, previamente referenciado na literatura (Assis *et al.*, 2023; Caligiorne *et al.*, 2019, no prelo; Da Silva Neto *et al.*, 2022; Pereira, 2019), que justificassem os resultados negativos.

A vacina anticocaína testada é um produto da inovação que ainda não possui parâmetros externos de comparação. Por isso, é importante ressaltar que o processo

de padronização permite estabelecer as melhores condições de quantificação em cada protocolo experimental, especialmente no que se refere à dosagem de anticorpos nas amostras das ratas grávidas e de sua prole. Novos estudos com o modelo utilizado devem ser priorizados.

6.2 Desfechos gestacionais e pós-natais

Em relação aos desfechos gestacionais, o objetivo do presente trabalho foi verificar sinais clínicos de toxicidade por meio de observações do ganho de peso, consumo alimentar e hídrico. Os resultados seguintes devem ser analisados a partir da informação de que a formulação de UFMG-VAC-V4N2, não apresentou imunogenicidade por estar com o IFA degradado. Conforme apresentado nas **Figuras 6, 7, 8, 9 e 10**, o ganho de peso médio das fêmeas, em ambos os grupos, foi, ao final da gestação, de $116,2 \text{ g} \pm 16,3 \text{ g}$ por animal, o que está de acordo com dados da literatura referente ao aumento de ganho de peso materno devido ao período de crescimento fetal, a partir do 18º dia de gestação (Barr Jr, 1973; Corvino *et al.*, 2015; Knox; Lister-Rosenoer, 1978).

De forma semelhante o consumo hídrico e alimentar apresentado nas **Figuras 9 e 10** mostrou valores que não foram diferentes nos grupos experimentais, imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e placebo. É bem descrito na literatura que durante a gestação, os níveis de progesterona sérica aumentam, o que influencia no consumo alimentar e energético do animal. Além disso, durante a amamentação, o consumo pode ser duas a três vezes maior em comparação com fêmeas que não estão grávidas e amamentando (Cornivo *et al.*, 2015; Baird, 2000.)

O índice de fertilidade é um indicativo da capacidade das fêmeas para conceber (Delclos *et al.*, 2001). Conforme evidenciado na **Figura 11**, o grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado e placebo demonstraram semelhança nesse índice. Sabe-se que uma das causas mais comuns de esterilidade feminina reside na ausência de ovulação, que pode ser atribuída à hipossecreção dos hormônios hipofisários ou a anormalidades ovarianas (Lequin, 1964; Moges, 2017). Os resultados sugerem que a formulação vacinal, possivelmente, não interferiu significativamente nos processos hormonais relacionados à ovulação; e também não evidenciou ter causado alterações funcionais nos ovários. Essas conclusões são

reforçadas pelo fato de que a média de filhotes por fêmea não apresentou alterações significativas em relação ao grupo placebo. Isso indica não apenas que as fêmeas mantiveram sua capacidade de conceber, mas também que o número de filhotes produzidos permaneceu dentro da faixa normal, conforme descrito por Harkness (1993) e Neves *et al.* (2013), que reportaram uma variação de 6 a 12 filhotes por ninhada.

Em relação aos desfechos pós-natais, as médias das massas corporais dos filhotes no 1º dia e no 28º dia dos grupos imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado e placebo, conforme apresenta a **Figura 14**, também não foram estatisticamente diferentes, indicando que a formulação vacinal não leva ao nascimento de filhotes com baixo peso. Algumas malformações induzem a morte nos primeiros dias de vida, outras provocam o óbito logo após o nascimento, por comprometer o funcionamento do organismo, e outras levam um período maior (Henck *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2009). Esses tipos de malformações são observados pela porcentagem de filhotes que sobrevivem até o 21º dia em relação ao número de filhotes nascidos, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, supondo que a vacinação não interferiu no desenvolvimento da prole até a fase de desmame.

Adicionalmente, não houve diferenças estatisticamente significativas no índice de viabilidade e razão sexual entre os grupos. Não houve distinções entre as ninhadas dos grupos em relação aos parâmetros de desenvolvimento físico. O ganho de massa corporal, foi uniforme entre as ninhadas do grupo de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado e grupo placebo. Portanto, pode-se supor que a imunização de fêmeas grávidas com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado não interferiu nos desfechos gestacionais e no desenvolvimento dos filhotes.

6.3 Análise bioquímica e hematológica

Em relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos, o objetivo do presente trabalho também foi verificar sinais clínicos de toxicidade por meio dos resultados dos exames.

Conforme apresentado na **Figura 16A** nos animais imunizados com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado houve aumento nos níveis séricos de ureia. Isso pode estar relacionado ao conteúdo nutricional da dieta dos animais, que possui alta concentração de proteína. De acordo com Ori *et al.* (1990), a insuficiência renal em ratos geralmente é diagnosticada quando os níveis séricos de ureia atingem aproximadamente 300 mg/dL⁻¹, o que não foi observado nos grupos do presente estudo, que apresentaram níveis na média de 38,3 mg/dL ± 7,744.

As atividades séricas das transaminases aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), conforme apresentado nas **Figuras 16B e 16C** estavam acima dos valores considerados normais, antes da primeira imunização (Giknis, 2006). Durante o período de gestação, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação aos níveis de ALT (p= 0,081).

Em roedores, a ALT encontra-se em atividade nos intestinos, rins, coração, músculo esquelético, cérebro e pâncreas (Keer, 2003; Kobayashi *et al.*, 2010). A ALT, é predominantemente encontrada no citoplasma dos hepatócitos, e está em maiores concentrações no plasma. Já, 80% da AST encontra-se presente nas mitocôndrias. Em danos hepatocelulares leves a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (Messias *et al.*, 2010). Importante ressaltar que, durante a gestação, houve um aumento de 30% dos níveis de ambas as enzimas, ALT (66 µL ± 16,122) e AST (149 µL ± 25,3) em relação ao valor considerado normal ALT (25,0 a 45,0 µL) e AST (72,0 a 116,0 µL) nos animais de ambos os grupos.

Essa diferença possivelmente não possui relevância clínica no contexto de avaliação toxicológica, uma vez que em ambos os grupos, UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado e placebo, foi observado aumento da atividade das enzimas ALT e AST. Conforme descrito por Corvino *et al.*, (2015), os parâmetros fisiológicos e bioquímicos são alterados durante os períodos de pré-gestação, gestação e pós-gestação em ratas, o que dificulta o processo de interpretação desses valores, uma vez que dados de valores de referência em animais murinos saudáveis relacionados à gestação e pós-parto são escassos na literatura (Corvino *et al.*, 2015; Henny, 2004).

Os níveis de glicose, conforme apresentado na **Figura 17**, permaneceram estáveis durante o período pré-gestacional. Entretanto, durante a gestação, em ambos os grupos, os níveis de glicose estavam abaixo dos valores da normalidade. Esse resultado pode ser indicativo da transferência de nutrientes da mãe para o feto, como fonte de energia (Corvino, *et al.*, 2015; Giknis, 2006). Em comparação, na última coleta sanguínea no T48, as fêmeas que não progrediram com o sucesso da gravidez, apresentaram valores normais de glicemia. Adicionalmente, não houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

Os resultados dos níveis de colesterol, conforme apresentado na **Figura 20A**, apresentaram-se estáveis durante o período gestacional, em ambos os grupos experimentais. Já os valores de triglicérides estavam aumentados, que pode estar relacionado à preparação para a lactogênese e para a produção de leite ou alimentação da prole (Herrera *et al.*, 1988). Em comparação, na última coleta sanguínea, as fêmeas que não progrediram com o sucesso da gravidez, apresentaram valores normais de triglicérides (**Figura 20B**). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Em relação aos resultados dos parâmetros hematológicos (**Figuras 21, 22, 23 e 24**), os valores de hematologia sanguínea em murinos pode ser influenciado por fatores que incluem o local, horário da coleta da amostra, a idade, gênero, linhagem, métodos de contenção, temperatura e o estresse (Kerr, 2003; Neves *et al.*, 2013). Os valores apresentaram diferenças em relação a normalidade, apenas no período gestacional. Como discutido anteriormente, é de difícil interpretação acerca dos níveis considerados dentro da faixa da normalidade, uma vez que parâmetros fisiológicos maternos são alterados durante o período gestacional (Kerr, 2003). Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros hematológicos entre os grupos experimentais.

6.4 Análise histopatológica

O exame histopatológico dos órgãos das fêmeas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado e grupo placebo não evidenciaram alterações de natureza clínica ou toxicológica. A fotomicrografia dos ovários evidenciou folículos em vários estágios de amadurecimento com estruturas normais, conforme apresentado nas

Figuras 25 e 26. Nenhum achado evidenciou alterações sugestivas que pudessem comprometer a fertilidade das fêmeas.

Os demais resultados revelaram que sete ratas (87,5%) imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado e duas ratas (50%) do grupo placebo apresentam cavidades císticas com conteúdo proteico nas áreas cortical e medular dos rins (**Figuras 27 e 28**). Esses achados, embora não específicos, não demonstram relevância clínica significativa, uma vez que não comprometeram a estrutura dos túbulos renais nem prejudicaram a função renal. É possível que esses achados não estejam necessariamente relacionados à formulação da vacina, mas sim de natureza inespecífica.

Dawn *et al.*, (2019) proveram evidências da baixa citotoxicidade dos calixarenos, qualificando para serem utilizados como plataforma de transporte e entrega de compostos bioativos (De Fátima *et al.*, 2009; Neeser, 2016; Schühle *et al.*, 2011). Em relação à molécula UFMG-V4N2, o imunógeno V4N2 foi obtido pela reação de acoplamento entre o calixareno 4NH e o hapteno de cocaína modificada (GNE). Ao modificar a conformação do esqueleto calixareno alterando seus grupos funcionais, podem ser obtidas moléculas com propriedades biológicas diferentes, e citotoxicidade (Schühle *et al.*, 2011; Dawn *et al.*, 2019).

Embora os estudos de toxicidade *in vivo* dos calixarenos sejam limitados na literatura, o estudo conduzido por Coleman *et al.* (2008) demonstrou a biodistribuição dessas moléculas em modelo murino. Os resultados indicaram que não houve captação significativa nos órgãos e que a molécula foi rapidamente eliminada pela urina, não havendo quaisquer alterações que envolvessem o comprometimento renal. Esse estudo também mostrou que animais injetados com dose única, equivalente a 5g em humanos, não apresentam sinais de toxicidade aguda.

Adicionalmente, os resultados do estudo de citotoxicidade conduzidos com a molécula UFMG-V4N2 (Souza, 2018) e os estudos toxicológicos com a formulação UFMG-VAC-V4N2 (Caligiorne *et al.*, 2019 no prelo; Sabato *et al.*, 2023) não evidenciaram toxicidade. Os resultados anatomopatológicos dos animais obtiveram resultados satisfatórios.

Por se tratar de uma molécula totalmente inédita, estudos de toxicodinâmica e toxicocinética *in vivo* com a molécula UFMG-V4N2 ainda devem ser conduzidos. Conhecer melhor a farmacodinâmica desse produto em desenvolvimento aumenta a confiabilidade dos dados toxicológicos. Isso é fundamental para a posterior comparação com dados clínicos, como parte da avaliação de risco e segurança em humanos, além de fornecer informações relevantes para a orientação da condução desses ensaios.

6.5 Análise da UFMG-VAC-V4N2

A ausência de produção de anticorpos anticocaína em ratas imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 foi considerada um desafio a ser interpretado. Nesse processo, uma hipótese levantada foi a presença de produtos de degradação da molécula. Após submeter a UFMG-V4N2 à análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN), o relatório técnico indicou que a molécula apresentava evidências de degradação, incluindo a provável hidrólise do grupo benzoato na estrutura da cocaína, que resultou na conversão de parte dos haptenos cocainérgicos em haptenos ecgoninérgicos.

A hipótese é que tal alteração no hapteno da molécula possa ter comprometido o seu reconhecimento pelo sistema imunológico e, por consequência, na ausência da produção de anticorpos específicos contra o hapteno de interesse. Isso, possivelmente, levou à produção de anticorpos com especificidade e avides diferentes. É relevante ressaltar que a eficácia de uma vacina está diretamente relacionada à apresentação efetiva do antígeno, de forma a induzir produção de anticorpos de maneira específica (Do Espírito Santo, 2023 no prelo).

Além disso, os produtos de degradação da molécula podem ter induzido a produção de outros anticorpos que afetaram a produção de anticorpos contra a molécula íntegra, e até mesmo desencadeado uma resposta imunológica celular, que não promove a produção de anticorpos. Estes mecanismos ainda são de natureza desconhecida e carecem de investigações mais detalhadas.

Por se tratar de um produto de inovação, nunca aplicado em humanos e sem fins de comparação de métodos analíticos, alguns parâmetros ainda não foram totalmente compreendidos. Vários fatores são críticos no desenvolvimento de uma vacina, desde

a invenção da molécula através da química orgânica até sua caracterização, purificação, ensaios de estabilidade e conjugação do hapteno GNE à plataforma sintética.

A molécula ainda carece de estudos mais específicos a respeito da sua estabilidade a curto e longo prazo, bem como o conhecimento e caracterização dos possíveis produtos de degradação e seus efeitos na imunogenicidade, eficácia e segurança da formulação.

7 CONCLUSÃO

A proposta de utilizar uma vacina terapêutica para prevenir desfechos negativos associados ao uso e abuso de cocaína durante a gestação, representa uma abordagem inovadora. Entretanto, os resultados apresentados neste trabalho com a vacina UFMG-VAC-V4N2 com o IFA degradado, testada em ratas grávidas e seus filhotes, não foram suficientes para demonstrar seu efeito imunizante. Nesse contexto, a investigação da causa desses resultados negativos revelou que a molécula UFMG-V4N2 usado na formulação vacinal sofreu degradação. A avaliação da metodologia, com base em amostras previamente testadas com resultados positivos, corroborou para a comprovação da validade e eficiência da abordagem metodológica adotada.

Embora a hipótese inicial tenha sido parcialmente refutada, visto que não se testou a formulação padronizada da UFMG-VAC-V4N2 e os resultados tenham sido negativos, é fundamental compreender que os desfechos deste estudo são inerentes aos desafios da pesquisa científica, especialmente no que se refere à inovação da vacina UFMG-VAC-V4N2 e a proposta de uma aplicação inédita. A rejeição de uma hipótese ou a obtenção de resultados negativos é um estímulo para que os pesquisadores explorem a literatura em busca de mais estudos relacionados ao tema. Nesse sentido, este estudo contribui para direcionar novas investigações e estudos de estabilidade da formulação vacinal.

Portanto, este trabalho representa um avanço significativo na pesquisa científica, evidenciando a importância dos resultados negativos para o avanço e desenvolvimento dessa pesquisa. No entanto, devido aos problemas identificados e

discutidos no presente estudo, não foi possível concluir sobre a segurança da vacina UFMG-VAC-V4N2 em ratas grávidas. Novos testes serão conduzidos para contornar essas limitações e obtermos um resultado conclusivo.

REFERÊNCIAS

AAMIR, K. *et al.* Non-toxic nature of chebulinic acid on biochemical, hematological and histopathological analysis in normal Sprague Dawley rats. **Toxicological research**, v. 38, n. 2, p. 159-174, 2022.

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, p. 1282, 2020.

ANDER, Stephanie E.; DIAMOND, Michael S.; COYNE, Carolyn B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Science immunology**, v. 4, n. 31, p. eaat6114, 2019.

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. **JCIS Open**, v. 9, p. 100078, 2023.

BAIRD, D.T. Clinical uses of antiprogestogens. **The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI**, v. 7, p. S49-S52, 2000.

BARR JR, M. Prenatal growth of Wistar rats: circadian periodicity of fetal growth late in gestation. **Teratology**, v. 7, n. 3, p. 283-287, 1973.

BARROW, P.C.; ALLAIS, Linda. Developmental toxicity testing of vaccines. **Teratogenicity Testing: Methods and Protocols**, p. 81-89, 2013.

BARROW, P. Developmental and reproductive toxicity testing of vaccines. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 65, n. 2, p. 58-63, 2012.

BEHNKE, M. *et al.* Prenatal substance abuse: short-and long-term effects on the exposed fetus. **Pediatrics**, v. 131, n. 3, p. e1009-e1024, 2013.

BEHNKE, M. *et al.* The search for congenital malformations in newborns with fetal cocaine exposure. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. e74-e74, 2001.

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

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

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

CALIGIORNE, M.S. *et al.* **Safety and immunogenicity of the anticocaine vaccine UFMG-VAC-V4N2 in Wistar rat.** 2019. No prelo.

CAMPELLO, C.C.I *et al.* Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.

CHU, H.Y.; ENGLUND, J.A. Maternal immunization. **Birth defects research**, v. 109, n. 5, p. 379-386, 2017.

CRESSMAN, Alex M. *et al.* Cocaine abuse during pregnancy. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 36, n. 7, p. 628-631, 2014.

COLEMAN, A.W. *et al.* Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix [4] arene in mice. **New Journal of Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 780-782, 2008.

CORVINO, S.B. *et al.* Physiological and biochemical measurements before, during and after pregnancy of healthy rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 30, p. 668-674, 2015.

DAWN, A. *et al.* Assessment of the in vitro toxicity of calixarenes and a metal-seamed calixarene: A chemical pathway for clinical application. **Supramolecular chemistry**, v. 31, n. 7, p. 425-431, 2019.

DA SILVA NETO, Leonardo *et al.* Calix [n] arene-based immunogens: A new non-proteic strategy for anti-cocaine vaccine. **Journal of Advanced Research**, v. 38, p. 285-298, 2022.

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, Â.; FERNANDES, S.A.; SABINO, A.A. Calixarenes as new platforms for drug design. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 6, n. 2, p. 151-170, 2009.

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

DELCLOS, K.B. *et al.* Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. **Reproductive toxicology**, v. 15, n. 6, p. 647-663, 2001.

DENNY, K.H.; FAQI, A.S. Nonclinical safety assessment of developmental and reproductive toxicology: considerations for conducting fertility, embryo–fetal development, and prenatal and postnatal developmental toxicology studies. **Developmental and Reproductive Toxicology**, p. 43-115, 2017.

DESTEFANO, F.; OFFIT, P.A.; FISHER, A. Vaccine safety. **Plotkin's Vaccines**, p. 1584, 2018.

Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals Guidance for Industry S5(R3). 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/148475/download>>. Acesso em 21 de março de 2023.

DOS SANTOS, J.F, De M.B.C., C., Barbosa, FT *et al*. Consequências maternas, fetais e neonatais associadas ao uso de crack durante o período gestacional: revisão sistemática e metanálise. *Arch Gynecol Obstet* 298 487–503 (2018).

DO ESPÍRITO SANTO, Larissa Pires. Avaliação da eficácia da vacina UFMG-VAC-V4N2 na proteção materno-fetal à exposição à cocaína no período gestacional e perinatal. Dissertação (Mestrado em Neurociências) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

FAQI, A.S. *et al*. Developmental and Reproductive Toxicology. **A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development; Faqi, AS, Ed**, p. 335-364, 2013.

FAUCETTE, A.N. *et al*. Maternal vaccination: moving the science forward. **Human reproduction update**, v. 21, n. 1, p. 119-135, 2015.

FDA. **S5(R3) Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s5r3-detection-reproductive-and-developmental-toxicity-human-pharmaceuticals>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

FETISSOV, S.O. Neuropeptide autoantibodies assay. **Neuropeptides: Methods and protocols**, p. 295-302, 2011.

GARG, R.C. *et al*. Reproductive and developmental safety evaluation of new pharmaceutical compounds. In: **Reproductive and developmental toxicology**. Academic Press, 2017. p. 101-127.

GIKNIS, M.L.A.; CLIFFORD. B Clinical Laboratory Parameters for CrI:CD(SD) Rats March 2006 CHARLES RIVER LABORATORIES

GOUIN, K. *et al*. Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 204, n. 4, p. 340. e1-340. e12, 2011.

GREEN, M.D.; AL-HUMADI, N.H. Preclinical toxicology of vaccines. In: **A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development**. Academic Press, 2017. p. 709-735.

GRIFFITH JR, J.Q.; FARRIS, E.J. The rat in laboratory investigation. 1942.

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

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

HENCK, J.W. *et al.* Reproductive toxicity testing of therapeutic biotechnology agents. **Teratology**, v. 53, n. 3, p. 185-195, 1996.

HENNY, Joseph; PETERSEN, Per Hyltoft. Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 42, n. 7, p. 686-691, 2004.

HERRERA, E. *et al.* Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 158, n. 6, p. 1575-1583, 1988.

HUSSAIN, T. *et al.* Understanding the immune system in fetal protection and maternal infections during pregnancy. **Journal of Immunology Research**, v. 2022, 2022.

International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use Ich Harmonised Guideline Detection Of Reproductive And Developmental Toxicity For Human Pharmaceuticals S5(R3), 2020. Disponível Em: https://Database.Ich.Org/Sites/Default/Files/S5_R3_Step4_Guideline_2020_0218_1.Pdf Acesso em 21 de março de 2023.

International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use Preclinical Safety Evaluation Of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1), 2011. Disponível Em: https://Database.Ich.Org/Sites/Default/Files/S6_R1_Guideline_0.Pdf . Acesso em 21 de março de 2023.

JAIN, N.C Essentials of veterinary hematology. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 407p.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. Roca, 2003.

KINSEY, B.M.; KOSTEN, T.R.; ORSON, F.M. Active immunotherapy for the Treatment of Cocaine Dependence. **Drugs of the Future**, v. 35, n. 4, p. 301, 2010.

KLEIN, S.L. *et al.* COVID-19 vaccine testing in pregnant females is necessary. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 5, 2021.

KNOX, W.E.; LISTER-ROSENOER, L.M. Timing of gestation in rats by fetal and maternal weights. **Growth**, v. 42, n. 1, p. 43-53, 1978.

KOBAYASHI, A. *et al.* Relationships between plasma and tissue transaminase activities in rats maintained under different feeding conditions. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 5, p. 639-652, 2010.

KRISHNA, R.B.; LEVITZ, M.; DANCIS, J. Transfer of cocaine by the perfused human placenta: the effect of binding to serum proteins. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 169, n. 6, p. 1418-1423, 1993.

LANNING, L.L. *et al.* Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 4, p. 507-520, 2002.

LEQUIN, R.M. HORMONAL INHIBITION OF OVULATION. II. **Pharmaceutisch weekblad**, v. 99, p. 209-223, 1964.

LOCKNER, J.W. *et al.* Flagellin as carrier and adjuvant in cocaine vaccine development. **Molecular pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 653-662, 2015.

MACKIN, D.W.; WALKER, S.P. The historical aspects of vaccination in pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 76, p. 13-22, 2021.

MAIA, A.F.S. **Novas Plataformas na Síntese de Imunógenos Direcionados ao Tratamento da Dependência Química à Cocaína.** Tese (Doutorado em Química – Química Orgânica) – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MARTIN, P.L. *et al.* Considerations in assessing the developmental and reproductive toxicity potential of biopharmaceuticals. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 176-203, 2009.

MBAH, A.K. *et al.* Association between cocaine abuse in pregnancy and placenta-associated syndromes using propensity score matching approach. **Early human development**, v. 88, n. 6, p. 333-337, 2012.

MESSIAS, J.B. *et al.* Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC., Cactaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 478-483, 2010.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. Laboratório para o clínico. 8. ed. São Paulo: **Atheneu**, 1999.

MUNOZ, F.M. Vaccination during pregnancy. **Women's Health**, v. 3, n. 2, p. 227-241, 2007.

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.

ORSON, F.M. *et al.* Vaccines for cocaine abuse. **Human vaccines**, v. 5, n. 4, p. 194-199, 2009.

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

SABATO, B. *et al.* **Safety and immunogenicity of the anti-cocaine vaccine** SABATO, Brian *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.

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

SASO, A.; KAMPMANN, B. Maternal immunization: nature meets nurture. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1499, 2020.

SCHÜHLE, D.T.; PETERS, J.A.; SCHATZ, J. Metal binding calixarenes with potential biomimetic and biomedical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 23-24, p. 2727-2745, 2011.

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.

SWAMY, G.K.; HEINE, R.P. Vaccinations for pregnant women. **Obstetrics and gynecology**, v. 125, n. 1, p. 212, 2015.

NEVES, S.M.P.; MANCINI-FILHO, J.; MENEZES, E.W.de. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação** da FCF-IQ/USP. 2013.

VERDIER, F.; BARROW, P.C.; BURGE, J. Reproductive toxicity testing of vaccines. **Toxicology**, v. 185, n. 3, p. 213-219, 2003.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 520, 2014.

VOLPE, J.J. Effect of cocaine use on the fetus. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 6, p. 399-407, 1992.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines**, 2005.

WOLDEMESKEL, M. Toxicologic pathology of the reproductive system. In: **Reproductive and developmental toxicology**. Academic Press, 2022. p. 1289-1321.

YAMAGUCHI, E.T. et al. Drogas de abuso e gravidez. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 35, p. 44-47, 2008.

APÊNDICE

1 Materiais

1.1 Drogas, fármacos e reagentes

- GNE (sintetizada pelo GEQOB – UFMG) – Hapteno derivado da cocaína;
- Adjuvophos[®]: adjuvante fosfato de alumínio (Brenntag Biosector[®], Alemanha) - Adjuvante utilizado na formulação da UFMG-VAC-V4N2.
- Cloridrato de xilazina (União Química[®], Brasil) – Coadjuvante de anestesia;
- Cloridrato de cetamina (União Química[®], Brasil) – Anestésico;
- Albumina sérica bovina (BSA - Sigma-Aldrich[®], EUA) – Proteína de soro bovino utilizada como carreador de hapteno e componente do tampão de amostras o ensaio de ELISA;
- Anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina, dirigido contra a Imunoglobulina G (IgG - Sigma-Aldrich[®], EUA) – Ligante do anticorpo primário (anticocaína) para o ELISA;
- Substrato SIGMAFAST TM p-Nitrophenyl (Sigma-Aldrich[®], EUA) - Reagente de coloração para o ensaio de ELISA;
- Tampão de conjugação – Tampão utilizado para dissolução do hapteno (0,083M fosfato trissódico; 0,1M EDTA; 0,9M cloreto de sódio; 0,1M sorbitol e 0,02% azida sódica; pH 7,2);
- Tampão de purificação – Tampão utilizado para purificação dos imunoconjugados produzidos (0,083M fosfato trissódico; 0,9M cloreto de sódio; 0,1M sorbitol; pH 7,2).

1.2 Soluções do ELISA e materiais da análise histopatológica

- Tampão de fixação – Solução utilizada para a fixação da cocaína à placa no ensaio de ELISA, composta por carbonato (1,5g), bicarbonato de sódio (3,0 g) e azida sódica (0,2 g) dissolvidos em água destilada (1,0 L) e ajustado o pH para 9,6;
- Tampão PBS (Phosphate-buffered saline) – Solução utilizada para o preparo de outros tampões de uso no ELISA, composto por cloreto de sódio (1,37 M), cloreto de potássio (27 mM), fosfato de sódio (81 mM) e fosfato de potássio (15 mM) dissolvidos em água destilada (1,0 L) e ajustado o pH para 7,4;
- Tampão de lavagem – Solução utilizada para a lavagem das placas no ensaio de ELISA, composta por Tween 20 (0,5 mL) diluído em tampão PBS (1,0 L) e ajustado o pH para 7,4;

- Tampão de amostras – Solução utilizada para diluição de amostras no ensaio de ELISA, composta por azida sódica (0,2 g) dissolvida em tampão PBS (1,0 L) acrescido de 1% de BSA e ajustado o pH para 7,4;
- 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 SIGMAFASTTM p- nitrofenol (1 comprimido dourado e 1 comprimido prateado) 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;
- Álcool etílico absoluto 99,5% – Solução utilizada no processo de desidratação do tecido para análise histológica.
- Formol Tamponado 10% v/v (Indalabor, Brasil) – Solução utilizada para conservação de tecido biológico.
- Xilol (Sciavicco, Brasil) – Solução utilizada no processo de desparafinização do tecido para análise histológica.
- Parafina (Êxodo Científica, Brasil) – Utilizada para no processamento histológico e na inclusão do tecido para microtomia.
- Entellan™(Sigma-Aldrich®, EUA) – meio de montagem rápida de lâminas para microscopia.
- Hematoxilina de Haris (ACS Científica, Brasil) – meio de coloração.
- Eosina (ACS Científica, Brasil) – meio de coloração.

2 Títulos de anticorpos IgG anticocaína nas mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2: protocolo 2 mg/mL de cocaína fixados em fase adsortiva

Os títulos de anticorpos IgG anticocaína de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Vacina vs. Placebo ($p = 0,669$) Vacina vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$) Controle vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$), *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Os títulos de anticorpos das amostras de referência foram significativamente maiores em relação ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 42, conforme **Figura 31** e **Tabela 5**.

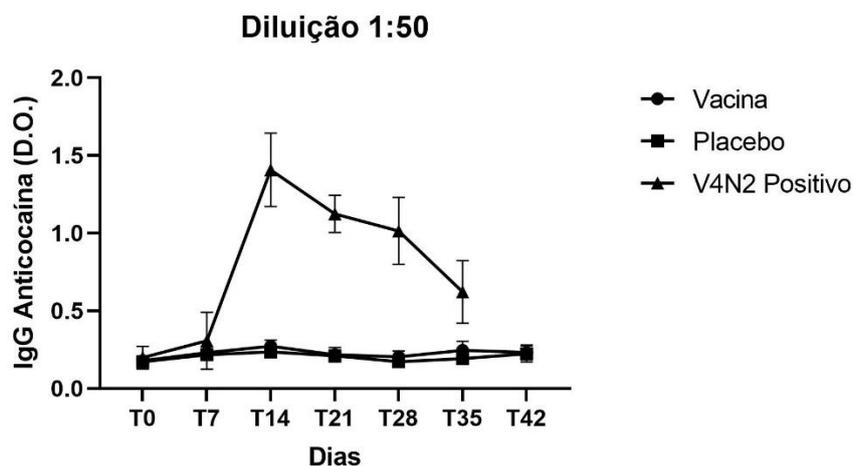


Figura 31 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaina em amostras diluídas 1:50. Amostras de soro de mães vacinadas, diluídas em 1:50, expressos em densidade óptica (DO) (eixo Y), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 5 -Títulos médios de anticorpos IgG anti cocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:50, expressos em densidade óptica (D.O)

Tempos	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Amostra referência
T0	0,178 ± 0,033	0,173 ± 0,011	0,199 ± 0,073
T7	0,230 ± 0,037	0,217 ± 0,022	0,307 ± 0,184
T14	0,272 ± 0,041	0,236 ± 0,036	1,408 ± 0,236
T21	0,218 ± 0,047	0,211 ± 0,011	1,124 ± 0,120
T28	0,205 ± 0,037	0,173 ± 0,014	1,015 ± 0,215
T35	0,246 ± 0,058	0,203 ± 0,029	0,622 ± 0,20
T42	0,233 ± 0,048	0,224 ± 0,053	-

Os títulos de anticorpos IgG anticocaina de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Vacina vs. Placebo ($p = 0,709$) Vacina vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$) Controle vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$), *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Os títulos de anticorpos das amostras de referência foram significativamente maiores em relação ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28 e 35, conforme a **Figura 32** e **Tabela 6**.

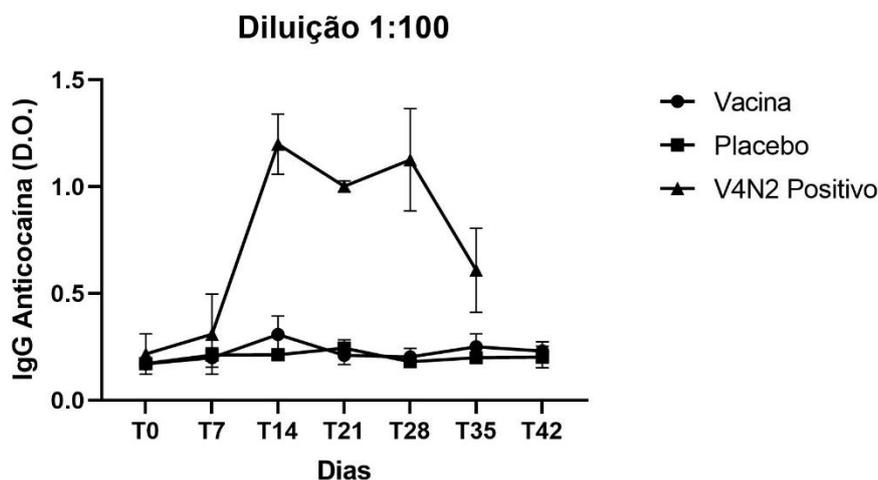


Figura 32 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras diluídas 1:100. Amostras de soro de mães vacinadas, diluídas em 1:100, expressos em densidade óptica (DO), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 6 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:100, expressos em densidade óptica (D.O)

Tempos	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Amostra referência
T0	0,17 ± 0,022	0,172 ± 0,012	0,216 ± 0,095
T7	0,2 ± 0,045	0,212 ± 0,017	0,309 ± 0,187
T14	0,309 ± 0,085	0,213 ± 0,027	1,199 ± 0,14
T21	0,211 ± 0,043	0,244 ± 0,04	1,002 ± 0,025
T28	0,203 ± 0,04	0,18 ± 0,011	1,126 ± 0,239
T35	0,25 ± 0,062	0,199 ± 0,02	0,609 ± 0,197
T42	0,231 ± 0,044	0,202 ± 0,051	-

Os títulos de anticorpos IgG anticocaína de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Vacina vs. Placebo ($p = 0,889$) Vacina vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$) Placebo vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$), *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Os títulos de anticorpos das amostras de referência foram significativamente maiores em relação ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 42, conforme a **Figura 33** e **Tabela 7**.

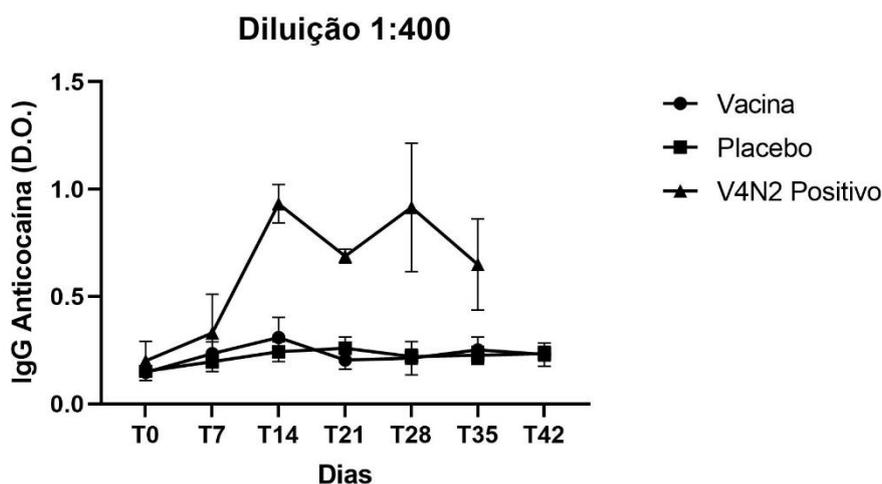


Figura 33 Títulos médios de anticorpos IgG anticocaina em amostras diluídas 1:400. Amostras de soro de mães vacinadas, diluídas em 1:400, expressos em densidade óptica (DO), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 7 -Títulos médios de anticorpos IgG anticocaina em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:400, expressos em densidade óptica (D.O)

Tempos	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Amostra referência
T0	0,147 ± 0,018	0,151 ± 0,002	0,201 ± 0,091
T7	0,234 ± 0,055	0,196 ± 0,028	0,33 ± 0,18
T14	0,309 ± 0,094	0,243 ± 0,046	0,932 ± 0,089
T21	0,205 ± 0,043	0,26 ± 0,052	0,688 ± 0,032
T28	0,213 ± 0,078	0,22 ± 0,035	0,915 ± 0,3
T35	0,252 ± 0,06	0,226 ± 0,042	0,649 ± 0,212
T42	0,23 ± 0,054	0,234 ± 0,034	-

Os títulos de anticorpos IgG anticocaina de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Vacina vs. Placebo ($p = 0,999$) Vacina vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$) Placebo vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$), *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Os títulos de anticorpos das amostras de referência foram significativamente maiores em relação ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 42, conforme a **Figura 34** e **Tabela 8**.

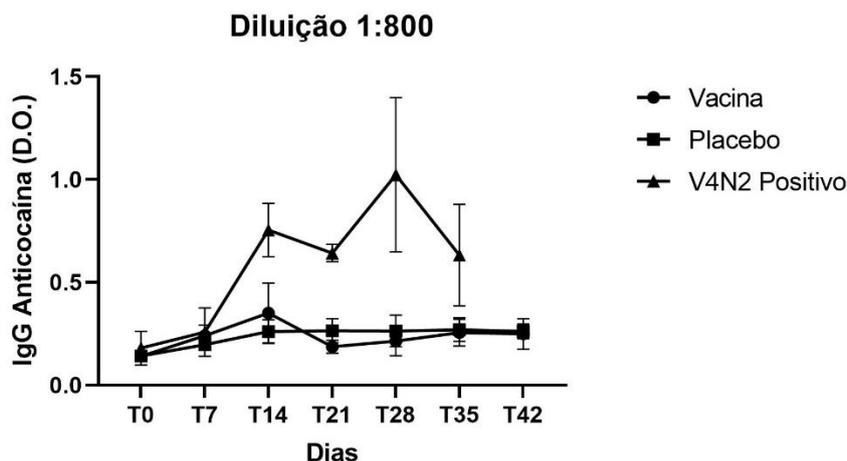


Figura 34 Títulos médios de anticorpos IgG anticocaina em amostras diluídas 1:800. Amostras de soro de mães vacinadas, diluídas em 1:800, expressos em densidade óptica (DO), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 8 - Títulos médios de anticorpos IgG anticocaina em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:800, expressos em densidade óptica (D.O)

Tempos	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Amostra referência
T0	0,14 ± 0,022	0,142 ± 0,013	0,18 ± 0,082
T7	0,241 ± 0,051	0,196 ± 0,024	0,258 ± 0,118
T14	0,351 ± 0,146	0,261 ± 0,058	0,754 ± 0,13
T21	0,187 ± 0,032	0,265 ± 0,058	0,642 ± 0,042
T28	0,214 ± 0,071	0,263 ± 0,077	1,023 ± 0,375
T35	0,256 ± 0,065	0,27 ± 0,057	0,632 ± 0,247
T42	0,249 ± 0,074	0,262 ± 0,035	-

Os títulos de anticorpos IgG anticocaina de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 não diferiram estatisticamente em relação ao grupo placebo em nenhum dos tempos de imunização. Vacina vs. Placebo ($p = 0,932$) Vacina vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$) Placebo vs. V4N2 positivo ($p = <0,0001$), *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Os títulos de anticorpos das amostras de referência foram significativamente maiores em relação ao grupo imunizado com UFMG-VAC-V4N2 nos tempos 7, 14, 21, 28, 35 e 42, conforme a **Figura 35** e **Tabela 9**.

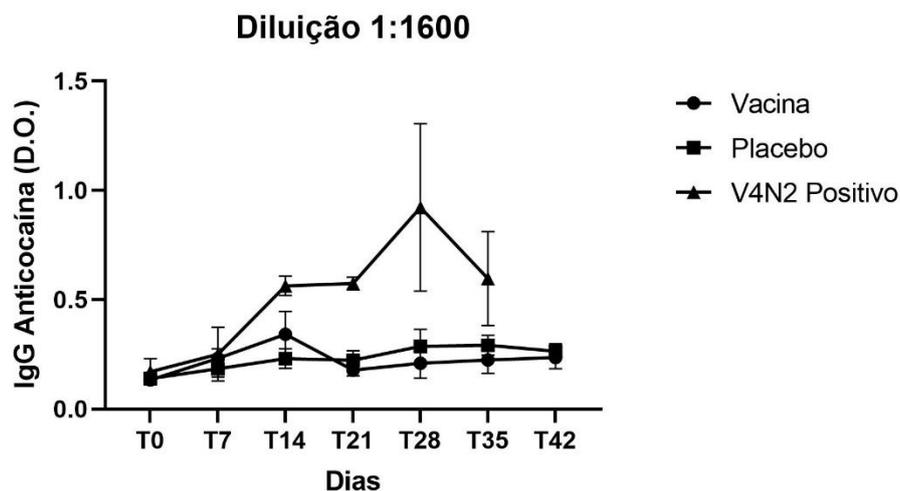


Figura 35 Títulos médios de anticorpos IgG anticocaina em amostras diluídas 1:1600. Amostras de soro de mães vacinadas, diluídas em 1:1600, expressos em densidade óptica (DO), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42, *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 9 - Títulos médios de anticorpos IgG anti cocaína em amostras de soro de sangue maternas, diluídas em 1:1600, expressos em densidade óptica (D.O)

Tempos	UFMG-VAC-V4N2	Controle	Amostra referência
T0	0,133 ± 0,024	0,139 ± 0,02	0,171 ± 0,06
T7	0,232 ± 0,044	0,184 ± 0,039	0,251 ± 0,123
T14	0,342 ± 0,105	0,231 ± 0,045	0,563 ± 0,044
T21	0,179 ± 0,026	0,224 ± 0,043	0,574 ± 0,029
T28	0,209 ± 0,069	0,287 ± 0,077	0,922 ± 0,382
T35	0,224 ± 0,061	0,292 ± 0,045	0,597 ± 0,215
T42	0,235 ± 0,051	0,265 ± 0,034	-

3 Análise do perfil bioquímico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo

Quadro 1

	média ± desvio padrão				
Tempo (dias)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)
-10	46,8 ± 9,46 vs. 44,4 ± 9,03 p=0,735	0,85 ± 0,14 vs. 44,4 ± 9,03 p= 0,079	73,2 ± 11,06 vs. 79,2 ± 11,04 p=0,485	187,7 ± 19,24 vs. 274,37 ± 28,21 p= 0,083	187,6 ± 21,9 vs. 195,2 ± 21,129 p= 0,750
3	36,9 ± 11,9 vs. 24,8 ± 5,23 p= 0,121	0,76 ± 0,47 vs. 24,86 ± 5,23 p= 0,576	68,14 ± 12,64 vs. vs. 50,5 ± 6,36 p=0,094	194,2 ± 35,5 vs. 152,5 ± 54,24 p= 0,407	169,2 ± 55,8 vs. 92,3 ± 59,8 p= 0,255
48	36,7 ± 8,94 vs. 40,22 ± 6,92 p= 0,735	0,84 ± 0,56 vs. 40,22 ± 6,92 p= 0,079	77,85 ± 12,81 vs. vs. 55 ± 6,01 p= 0,081*	167 ± 34,47 vs. 131,12 ± 44,11 p= 0,407	121,85 ± 36,71 vs. 102,7 ± 38,42 p= 0,750

	Glicose (mg/dL)	Proteínas Totais (g/l)	Albumina	Colesterol total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)
-10	1114,2 ± 21,53 vs. vs. 106,2 ± 8,38 p= 0,855	8,08 ± 0,335 vs. 7,95 ± 0,23 p= 0,909	4,25 ± 0,36 vs. 4,67 ± 0,31 p=0,488	103,2 ± 11,29 vs. 116,91 ± 4,74 p= 0,305	61,05 ± 13,48 vs. 84,95 ± 17,04 p= 0,305
3	133,42 ± 18,32 vs. vs. 99,25 ± 9,56 p=0,070	7,96 ± 1,22 vs. 8,77 ± 1,49 p=0,771	3,95 ± 0,36 vs. 4,17 ± 0,29 p=0,488	81,39 ± 39,58 vs. 67,65 ± 43,219 p=0,743	79,02 ± 86,85 vs. 53,52 ± 8,20 p=0,876
48	79,71 ± 16,62 vs. 95,37 ± 16,60 p=0,156	8,33 ± 1,52 vs. 8,66 ± 1,66 p= >0,999	4,4 ± 0,35 vs. 4,45 ± 0,13 p= 0,757	82,64 ± 14,46 vs. 77,4 ± 13,21 p= 0,743	113,55 ± 71,53 vs. 99,03 ± 56,49 p=0,927

* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

4 Análise do perfil hematológico de mães imunizadas com UFMG-VAC-V4N2 e grupo placebo

Quadro 2

Tempo (dias)	média ± desvio padrão					
	Hemácias (mm ³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (g/dl)	VCM (g/dl)	HCM (g/dl)	CHCM (g/dl)
-10	8,49 ± 0,34 vs. 8,18 ± 0,07 p=0,762	17,42 ± 0,38 vs. 17,30 ± 0,14 p= 0,857	66,8 ± 1,68 vs. 65,53 ± 0 p= 0,986	66,8 ± 1,68 vs. 65,53 ± 0 p= 0,986	20,54 ± 0,806 vs. 20,06 ± 1,49 p=0,960	30,82 ± 1,57 vs. 31,69 ± 0,74 p=0,960
3	8,49 ± 0,007 vs. 8,29 ± 0,44 p=0,800	18,2 ± 0,49 vs. 11,31 ± 5,62 p=0,271	53,6 ± 0,54 vs. 51 ± 4,58 p=0,856	65,33 ± 4,22 vs. 61,33 ± 2,48 p=0,986	65,33 ± 4,22 vs. 61,33 ± 2,48 p=0,986	32,42 ± 1,02 vs. 33,53 ± 2,60 p=0,960
48	8,13 ± 0,52 vs. 8,26 ± 0,19 p=0,762	16,01 ± 1,192 vs. 16,7 ± 0,63 p=0,622	53,83 ± 3,18 vs. 53,52 ± 3,99 p=0,980	66,34 ± 3,62 vs. 64,72 ± 3,77 p=0,986	19,69 ± 0,61 vs. 20,37 ± 0,58 p=0,305	29,76 ± 1,55 vs. 31,57 ± 2,17 p=0,628
	Leucócitos totais	Linfócitos (mm ³)	Eosinófilos (mm ³)	Neutrófilos (mm ³)	Plaquetas (mm ³)	-
-10	10240 ± 724,91 vs. 6775 ± 459,61 p=0,259	88,8 ± 2,95 vs. 90,5 ± 2,12 p=0,761	238,16 ± 115,05 p= n.d	478,5 ± 240,3 p = nd	496,8 ± 148,3 vs. 500 ± 70,7 p=0,990	-
3	9075 ± 742,46 vs. 7550 ± 964,36 p=0,360	90,5 ± 2,12 vs. 78 ± 10,14 p=0,657	120,75 ± 54,094 p= n.d	933 ± 675,4 vs. 1421,6 ± 873,6 p= 0,400	583,5 ± 374,0 vs. 562,3 ± 164,6 p=>0,099	-
48	10983,3 ± 1906,2 vs. 12262,5 ± 4043,7 p = 0,914	77,5 ± 8,84 vs. 74,25 ± 6,65 p=0,750	231,5 ± 139,68 vs. 512,5 ± 623,46 p= 0,628	2133,5 ± 1176,5 vs. 2133,5 ± 1176,5 p= 0,609	416,5 ± 285,0 vs. 747,5 ± 81,9 p=0,431	-

* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

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



1/2 Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química

CERTIFICADO DE ANÁLISE

DATA	27/04/2023
EMITIDO POR	HENRIQUE ESTEVES
ANALITO	V4N2
APRESENTAÇÃO	Sólido branco com cristalinidade aparente.
DATA DE ANÁLISE	21/10/2022
ARMAZENAMENTO	- 20 °C
TÉCNICA DE ANÁLISE	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
EQUIPAMENTO	BRUKER AVANCE NEO 600 MHz
MÉTODO DE ANÁLISE	Polarização de spin com relaxação prolongada (zgilg)
PARÂMETROS	(vide spectra)
PARECER TÉCNICO	
<p>Deslocamentos químicos e multiplicidade de sinais de acordo com o descrito na literatura.¹ 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.</p>	

