



Universidade Presbiteriana Mackenzie
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Curso de Ciências Biológicas



Victor Hugo Rosa Romanato

**ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR À TOXINA
BOTULÍNICA “A” DURANTE A GESTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO E
ATIVIDADE MOTORA DA PROLE**

São Paulo
2023

VICTOR HUGO ROSA ROMANATO

ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE RATAS WISTAR À TOXINA
BOTULÍNICA “A” DURANTE A GESTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO E
ATIVIDADE MOTORA DA PROLE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
da Universidade Presbiteriana Mackenzie,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Esther Lopes Ricci

São Paulo
2023

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Destino, que sempre me guiaram e me orientaram a trilhar os melhores caminhos, além de me permitirem tantas experiências e aprendizados que me levaram ao amadurecimento que consegui conquistar hoje. Entrei na graduação com 17 anos e, neste momento, saio com 21, e apenas Eles sabem o quão complexa foi essa jornada.

A todas as pessoas negras que me antecederam e que, através de sua incessante luta, possibilitaram que eu, hoje, tenha o direito e a oportunidade de estudar e, sobretudo, viva com dignidade e liberdade. Espero, através dos meus trabalhos, representar a potência negra, que sempre foi – e, lamentavelmente, ainda é – classificada como subalterna pela sociedade racista. Se hoje escrevo este e outros trabalhos, é porque me sustento na força daqueles que antes de mim vieram. Quero que saibam que minhas grandes e pequenas conquistas não são apenas por vocês, mas também *de* vocês. Por essa razão, digo e repito que, em meio a toda a invisibilização e silenciamento que o povo negro sofreu e ainda sofre diariamente, seremos resistência!

Às etnias indígenas, que dignificam a natureza das terras pindorâmicas tão ameaçadas e desvalorizadas atualmente. Espero que, um dia, as pessoas aprendam a valorizar as culturas indígenas como criadoras de conhecimento válido e indispensável e que elas não mais tenham suas sabedorias furtadas. Protegê-las significa proteger Pindorama.

À minha mãe, Priscilla, que sempre me incentivou em todos os projetos em que eu me dispunha a ingressar, que sempre acreditou em mim e vibrou comigo a cada pequena e grande conquista. Ela foi a pessoa que me ensinou a enxergar a vida com otimismo e sempre de cabeça erguida, a viver e conviver, a ter empatia e paciência com aqueles ao meu redor. Mãe, você é a pessoa mais forte que já conheci na vida e a que mais admiro, pois, desde o primeiro dia em que te conheci você tem sido meu espelho e minha maior inspiração. Te amo *infinito*!

Agradeço a toda a minha família, e especialmente às minhas queridas avós, pelo apoio incrível. Vocês moram no meu coração.

Ao meu pai, Douglas, por todo o suporte durante a minha formação acadêmica. Sou eternamente grato por seus feitos que me possibilitaram chegar aonde estou hoje.

À Universidade Presbiteriana Mackenzie e seu corpo docente, por tornarem possível este trabalho e por tanto aprendizado.

À Prof.^a Dr.^a Esther Lopes Ricci, minha querida orientadora que tanto me apoiou em minhas decisões acadêmicas e me ofereceu tantos bons conselhos que carregarei para sempre em meu coração. Agradeço imensamente pela oportunidade de ser monitor na disciplina por ti ministrada, de participar dessa pesquisa gigante que tem um propósito tão admirável, e por todos os frutos que dela vêm. Quando eu estava no Ensino Médio, toda essa experiência da graduação parecia um sonho distante, e, no primeiro dia de recepção aos calouros, disseram: “Não apenas façam a graduação. Agarrem todas as oportunidades que o Mackenzie der para vocês!”, porém eu não entendi o que isso significava. Hoje eu entendo e sinto que aproveitei todas ao máximo. Muito obrigado pela realização desses sonhos.

Aos membros da banca, por dedicarem seu tempo à leitura e avaliação do presente trabalho. Vocês me inspiram muito.

Ao Fundo Mackenzie de Pesquisa e Inovação (MackPesquisa), pelo financiamento da pesquisa e pelo auxílio financeiro (Bolsa MackPesquisa – Projeto nº 221025).

Ao Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) por viabilizar a realização deste e dos demais estudos do nosso grupo de pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Helenice de Souza Spinosa, pela orientação do nosso grupo de pesquisa em seus projetos e por todo o apoio.

À Lorena Pantaleon, Guilherme Ribeiro e Leonardo de Paula, por todo o aprendizado durante a Iniciação Científica e todos os conselhos de vida no biotério. Obrigado por tornarem possível todo o trabalho incrível e árduo que realizamos.

Às minhas parceiras de Iniciação Científica, Mayara Rosseti e Maria Luiza, por todos os bons momentos que tivemos juntos e por serem tão indispensáveis para a realização dos experimentos envolvidos neste trabalho.

Ao Samuel Batista e à Beatriz Coviello, por toda a ajuda durante o período experimental, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório e pelas boas risadas que demos juntos.

A todos os demais alunos que realizaram estágio voluntário e/ou obrigatório durante o período experimental do nosso grupo de pesquisa. Sua ajuda foi bastante significativa.

A todos os meus queridos amigos que fizeram parte dessa jornada de graduação. Obrigado por todas as risadas, conselhos, reflexões, entre tantos outros bons momentos. Vocês tornaram essa etapa da minha vida muito mais alegre e emocionante.

Um agradecimento infindável a todos os animais que tornaram uma realidade a presente pesquisa. Este trabalho é uma prova de que suas vidas não foram em vão e de que serão para sempre lembrados.

“A lógica do *penso, logo existo* se assenta na perspectiva de que *outros não pensam* e, por conseguinte, *não existem*, fundando uma divisão radical entre aqueles que são capazes de produzir conhecimento universalizável e aqueles que são incapazes, aqueles que existem e os outros que inexistem. Isso converte a invisibilização de cosmovisões não-hegemônicas em instrumento de política de desaparecimento, violência e morte das populações racialmente minoritárias.”

Victor Hugo Neves de Oliveira

RESUMO

A toxina botulínica tipo A (BoNtA) possui notável eficiência no tratamento crônico de distúrbios neuromusculares, como bruxismo, espasticidade muscular e estrabismo. No entanto, seu uso é contraindicado durante a gestação, pois estudos farmacocinéticos apontam para a possibilidade de tal substância cruzar a barreira placentária e não são bem esclarecidos os danos que podem ser causados ao concepto. Visto isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento físico e reflexológico e a atividade motora, na infância e na idade adulta, da prole de ratas Wistar expostas à BoNtA durante o período gestacional. Para tal, 32 ratas prenhes adultas receberam dose única de BoNtA (4, 8 ou 16 U/kg – unidades por quilograma) ou solução salina (0,1 mL/kg – NaCl 0,9%) por via intramuscular no Dia Gestacional (DG) 5. Suas proles foram analisadas quanto ao desenvolvimento físico e reflexológico e o ganho de peso foi acompanhado. Para a avaliação da atividade motora geral, os filhotes foram submetidos aos testes da marcha e do campo aberto. Os resultados apresentaram que a exposição de ratas Wistar à BoNtA durante o período gestacional provocou redução da massa corporal na prole masculina das fêmeas tratadas com a dose intermediária (8 U/kg) em relação aos animais do grupo controle, na terceira semana de vida. Já em relação ao desenvolvimento físico e reflexológico e à atividade motora da prole, a exposição não provocou alterações entre os grupos experimentais e o grupo controle, tanto na prole masculina quanto feminina. Assim, o uso de BoNtA durante a gestação parece não interferir no desenvolvimento e na atividade motora geral dos filhotes na infância e na idade adulta.

Palavras-chave: Toxina Botulínica A; acetilcolina; comportamento animal; desenvolvimento da prole; desenvolvimento locomotor.

ABSTRACT

Botulinum toxin type A (BoNtA) shows a noticeable efficacy on the chronic treatment of neuromuscular disorders, such as bruxism, muscle spasticity and strabismus. However, its usage is contraindicated during pregnancy, because pharmacokinetic studies suggest that this substance may cross the placental barrier and the potential risks to the fetus are not fully known. Therefore, this study aimed to evaluate the physical and reflexological development as well as the motor activity, in infancy and adulthood, in the offspring of female Wistar rats exposed to BoNtA during their gestational period. Thus, 32 pregnant adult rats received a single BoNtA dose (4, 8 or 16 U/kg – units per kilogram) or saline solution (0,1 mL/kg – NaCl 0,9%) by intramuscular injection on Gestation Day (DG) 5. The pups' physical and reflexological development was evaluated and the weight gain was noted. In order to evaluate the general motor activity, the pups performed the gait test and the open field test. The results showed that the exposure of Wistar rats to BoNtA during gestation led to a reduction on weight gain in the male offspring of the moms treated with the intermediary dose (8 U/kg), on the third week of age, when compared to the control group. Regarding physical and reflexological development and motor activity, the exposure did not cause any alterations between the control and experimental groups, neither in male nor female offspring. Therefore, the usage of BoNtA during gestation does not seem to interfere on development, neither on general motor activity of pups in infancy and adulthood.

Keywords: Botulinum Toxin type A; acetylcholine; animal behavior; offspring development; locomotor development.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	A ESPÉCIE BACTERIANA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	9
1.2	ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA	10
1.3	APLICAÇÃO CLÍNICA DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A	13
1.4	A TOXINA BOTULÍNICA TIPO A E A GESTAÇÃO	13
1.5	JUSTIFICATIVA	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	ANIMAIS	18
3.2	FÁRMACO	18
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
3.4	PROCEDIMENTOS	20
3.4.1	Acasalamento e diagnóstico de prenhez	20
3.4.2	Nascimento e padronização das ninhadas	21
3.4.3	Desenvolvimento físico da prole	21
3.4.4	Desenvolvimento reflexológico da prole	22
3.4.5	Teste da marcha	24
3.4.7	Teste do campo aberto	26
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REFLEXOLÓGICO DA PROLE	29
4.2	TESTE DA MARCHA	34
4.3	TESTE DO CAMPO ABERTO	41
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA UPM	59
	ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA FMVZ-USP	60

1 INTRODUÇÃO

1.1A ESPÉCIE BACTERIANA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

A bactéria da espécie *Clostridium botulinum* é um bacilo anaeróbio, Gram-positivo e produtor de esporos que tem a capacidade de produzir as Neurotoxinas Botulínicas (NTB), que são consideradas as toxinas mais potentes de que se tem conhecimento (Sposito, 2009; Nigam; Nigam, 2010). Esse patógeno pode ser encontrado no solo e em sedimentos aquáticos, bem como em legumes, frutas e verduras e habita o trato intestinal de bovinos, aves e equinos, sendo excretado em suas fezes (Cereser et al., 2008).

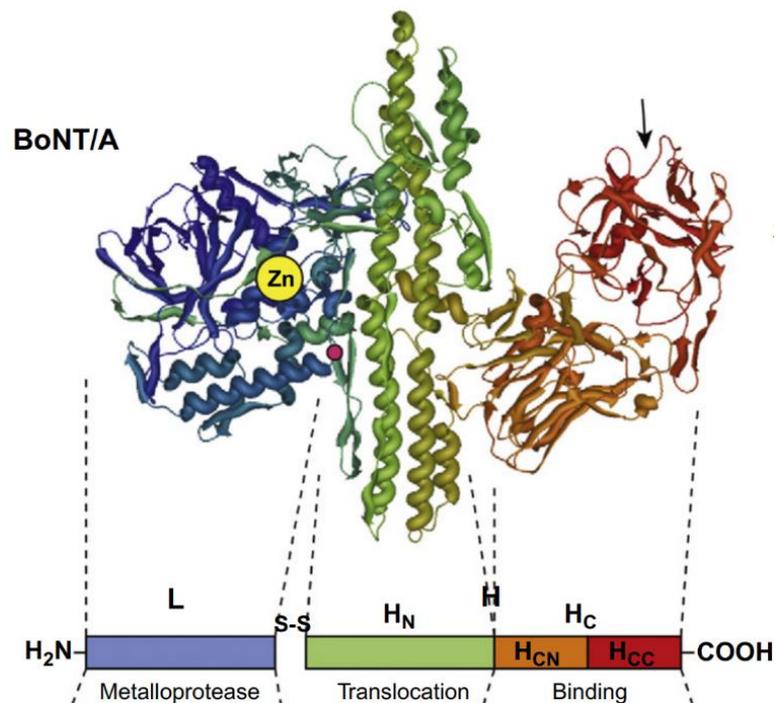
As toxinas produzidas podem causar botulismo nos seres humanos e a forma mais comum de contaminação pela bactéria é a ingestão de alimentos contaminados que foram armazenados e mantidos em condições que favoreceram a germinação de seus esporos. Embutidos e conservas caseiras são notáveis exemplos, pois alimentos embalados ou lacrados permanecem em condições anaeróbias até a abertura da embalagem, o que promove a germinação dos esporos e a produção de toxinas (Cereser et al., 2008; Scarcelli; Piatti, 2002; Forsythe, 2013). Para a eliminação dos esporos bacterianos, um método eficaz é a realização do tratamento térmico de 3 minutos a 121°C (Forsythe, 2013).

Seus sintomas incluem náusea, fadiga, tonturas, falhas respiratórias e visão dupla, que têm início de 12 a 36 horas após o contato com as toxinas (Forsythe, 2013). Devido à barreira hematoencefálica, as toxinas botulínicas não afetam o sistema nervoso central, porém podem causar a paralisia de músculos respiratórios e levar o enfermo a óbito (Scarcelli; Piatti, 2002; Cereser et al., 2008). Esse evento ocorre porque a acetilcolina é o principal neurotransmissor nas junções neuromusculares, que são sinapses químicas especializadas na transmissão de impulsos nervosos do terminal do axônio pré-sináptico para as fibras musculares, e, à medida que essas toxinas bloqueiam a exocitose desse neurotransmissor nas junções, inviabilizam a contração da musculatura corporal (Hughes; Kusner; Kaminski, 2006; Münchau; Bhatia, 2000; Colhado; Boeing; Ortega, 2009).

1.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

A toxina botulínica é uma exotoxina proteica, ou seja, uma proteína excretada pela espécie bacteriana supracitada. Assim, difere das endotoxinas que são estruturas lipopolissacarídicas componentes da membrana externa das bactérias Gram-negativas (Forsythe, 2013). Ela é composta por uma cadeia pesada (H), que apresenta peso molecular de 100 kDa e uma cadeia leve (L) de 50 kDa, unidas por uma ponte dissulfeto, formando, desse modo, uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de 150 kDa (Nepal; Jeong, 2020; Forsythe, 2013). A cadeia leve abriga o domínio enzimático, enquanto a pesada engloba o domínio de translocação (H_N) e o domínio H_C, que contém os subdomínios de ligação acessório (H_{C-N}) e de ligação a proteínas sinápticas e a gangliosídeos (H_{C-C}) (Pellett; Yaksh; Ramachandran, 2015; Sposito, 2009).

Figura 1 – Representação da estrutura da Toxina Botulínica tipo A.



Fonte: Schmiege (2015).

Na Figura 1, observa-se a cadeia leve (L) em azul associada a um átomo de zinco, uma vez que é uma metaloprotease zinco-dependente (Schmiege; Bercsenyi; Schiavo, 2015) e a cadeia pesada (H) à sua direita, sendo unidas pela ponte dissulfeto,

ressaltada pelo círculo rosa. Em verde, está o domínio Hn, de translocação, enquanto em laranja e em vermelho encontram-se os domínios Hc-C e Hc-N, de ligação.

Há sete sorotipos dessa toxina, que vão de A a G, e todos possuem o efeito de bloquear a exocitose de acetilcolina, que é o principal neurotransmissor envolvido na contração muscular (Nigam; Nigam, 2010; Münchau; Bhatia, 2000). O sorotipo A é o mais utilizado na terapia humana atualmente, devido à sua alta potência e ação de longa duração, uma vez que seu efeito é capaz de durar meses após uma única administração (Sposito, 2004; Pirazzini et al., 2017; Aoki, 2004; Aoki, 2001).

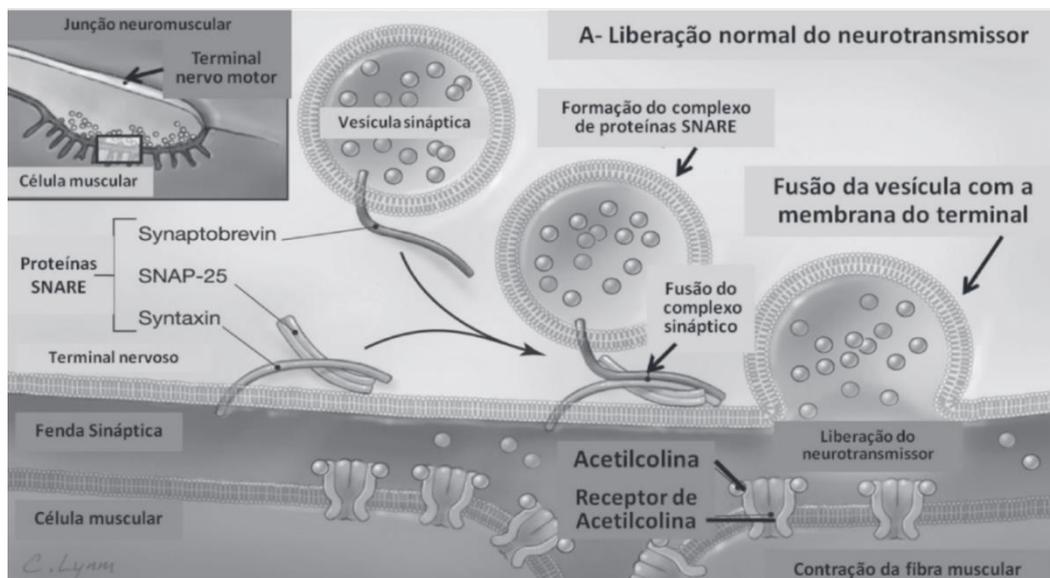
A cadeia pesada (H) é responsável por se ligar de maneira específica e irreversível a receptores presentes na superfície de neurônios colinérgicos pré-sinápticos, através de seus domínios de ligação (Hc-C e Hc-N), sendo transportado para o interior da célula nervosa por endocitose (Münchau; Bhatia, 2000; Pellett; Yaksh; Ramachandran, 2015). Em seguida, o domínio de translocação (Hn) é utilizado para transportar a cadeia leve do endossoma para o citosol celular e a ponte dissulfeto é clivada (Pellett; Yaksh; Ramachandran, 2015). A cadeia leve (L) cliva uma proteína do complexo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-receptor*) específica para cada sorotipo da toxina. Tal complexo é formado pelas proteínas sinaptobrevina, syntaxina e SNAP-25 e, no caso do sorotipo A, a cadeia leve cliva a proteína SNAP-25 (*Synaptosome-associated protein of 25 kDa*), que é fundamental para a liberação plena da acetilcolina nos terminais nervosos (Blasi et al., 1993; Münchau; Bhatia, 2000). Assim, impede que ocorra a fusão das vesículas contendo esse neurotransmissor à membrana plasmática do neurônio pré-sináptico e sua consequente exocitose nos terminais nervosos (Allergan, Inc., 2022; Sposito, 2004).

A Figura 2 elucida o processo normal de exocitose da acetilcolina, apresentando a formação do complexo proteico SNARE e a importância da proteína SNAP-25 para a fusão da vesícula sináptica com a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico, resultando na contração muscular. Já a Figura 3 exhibe que, sob exposição à toxina botulínica tipo A, a membrana não se funde, devido à clivagem da proteína SNAP-25, não ocorrendo a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.

Dessa maneira, considerando que a liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares é imprescindível para que ocorra a contração muscular, seu

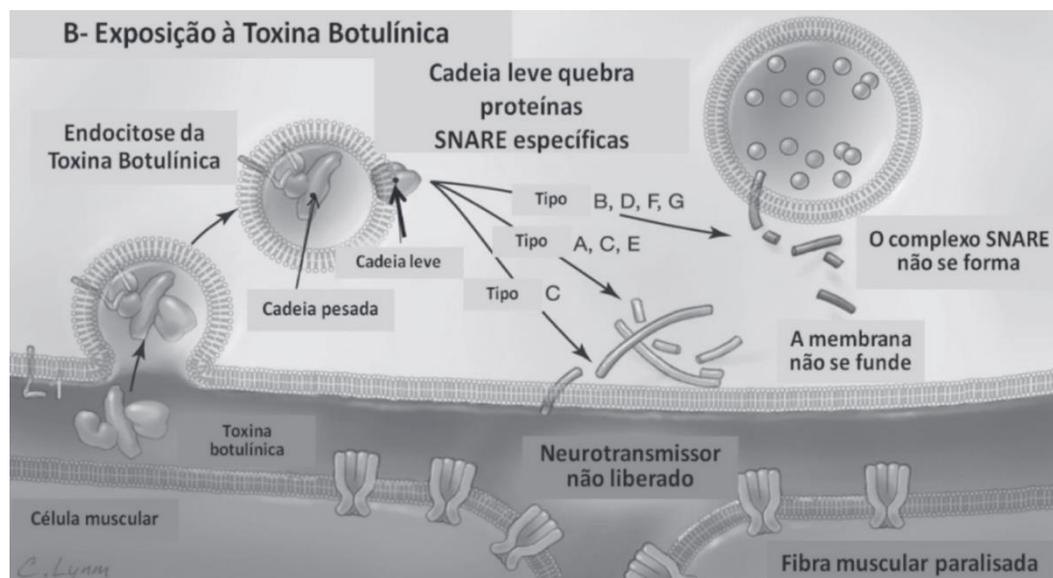
bloqueio gera uma denervação parcial do músculo, reduzindo a sua atividade e podendo, ainda, levar à sua atrofia (Aoki, 2001; Allergan, Inc., 2022). O bloqueio da exocitose desse neurotransmissor é irreversível, mesmo que as junções afetadas não sejam degeneradas, porém, após cerca de dois a três meses, novos brotamentos axonais ocorrem, auxiliando na recuperação do tônus e na reinervação muscular (Nigam; Nigam, 2010; Münchau; Bhatia, 2000; Allergan, Inc., 2022).

Figura 2 – Exocitose normal da acetilcolina.



Fonte: Sposito (2009).

Figura 3 – Exocitose da acetilcolina sob efeito da toxina botulínica em seus diferentes sorotipos.



Fonte: Sposito (2009).

1.3 APLICAÇÃO CLÍNICA DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A

A toxina botulínica recebe um abundante reconhecimento entre cirurgiões plásticos e dermatologistas por sua aplicação estética, pois é capaz de tratar linhas de expressão facial e rugas, uma vez que paralisa temporariamente a musculatura local, impedindo que essas apareçam (Nepal; Jeong, 2020; Sposito, 2004). No entanto, também possui uma importante aplicação clínica sobre distúrbios motores e do movimento.

No ano de 1989, uma formulação de BoNtA foi o primeiro produto a base dessa neurotoxina a ser aprovado pelo órgão regulador norte-americano *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para utilização terapêutica, sendo comercializada pela empresa estadunidense Allergan, sob o nome de Botox® (Azam et al., 2015; Aoki, 2001; Aoki, 2004). Em doses apropriadas, a BoNtA pode ser utilizada para tratar diversas condições relacionadas à hiperfunção de terminais colinérgicos, tais como estrabismo, espasticidade muscular, hiperidrose, blefaroespasma, bruxismo e bexiga urinária hiperativa (Nepal; Jeong, 2020; Sposito, 2004; Pirazzini et al., 2017).

As toxinas botulínicas possuem alta afinidade por neurônios colinérgicos e sua aplicação pode ser realizada por via intramuscular, quando em um músculo, e intradérmica, quando em uma glândula (Sposito, 2004; Allergan, Inc., 2022). Nesse último caso, atuam sobre a hiperatividade dos músculos lisos, podendo controlar a sudorese, a salivação e até o lacrimejamento (Sposito, 2009).

Estudos farmacocinéticos realizados com ratos apresentaram que ocorre uma lenta difusão da toxina no músculo que recebe a aplicação, porém, em seguida, há uma metabolização sistêmica rápida pelas enzimas proteases (Sposito, 2004). Dessa forma, o tempo de meia-vida da BoNtA nos músculos é de aproximadamente 10 horas e, durante as primeiras 24 horas após a injeção, 60% da substância é excretada na urina (Sposito, 2004; Apostolidis et al., 2009).

1.4 A TOXINA BOTULÍNICA TIPO A E A GESTAÇÃO

Durante a gestação, é fundamental que seja garantida ao conceito a suplementação adequada de oxigênio e nutrientes, assim como a remoção de subprodutos metabólicos, e, inicialmente, essas trocas são realizadas por difusão

através de líquidos uterinos (Robinson, 2014). Posteriormente, à medida que ocorre o desenvolvimento do embrião, forma-se um órgão especializado nos vertebrados vivíparos: a placenta (Brolio et al., 2010). Ela exerce as funções essenciais de adesão do feto à parede uterina, transferência de oxigênio e nutrientes da mãe para o conceito, bem como a excreção de dióxido de carbono e outros produtos metabólicos fetais na circulação sanguínea materna (Robinson, 2014; Gudmundsson; Dubiel; Sladkevicius, 2009). Essa troca de materiais através da placenta ocorre por meio dos mecanismos de difusão simples, difusão facilitada, pinocitose, endocitose, ultrafiltração ou transporte ativo, a depender da natureza da substância em questão (Saunders, 2009; Barros et al., 1988).

Esse anexo embrionário é formado pela justaposição ou fusão das células fetais às células da mucosa uterina, correspondendo ao único meio de intercâmbio de substâncias materno-fetais nesse período (Saunders, 2009; Brolio et al., 2010). Nesse sentido, o número de camadas celulares que delimitam ambas as circulações sanguíneas, ou seja, a espessura da membrana placentária, é utilizado como caráter de diferenciação dos diversos tipos placentários: a placentação epiteliocorial – observada em cavalos, porcos, ovelhas e vacas – é caracterizada pela superposição do córion fetal em relação ao epitélio uterino, enquanto na endoteliocorial o córion se superpõe ao endotélio dos vasos sanguíneos maternos, como é o caso de cães e gatos. A placentação hemocorial, por sua vez, é observada em roedores e diversos primatas e caracteriza-se pela invasão da mucosa uterina pelo córion, que causa o rompimento dos capilares maternos e o contato direto desse sangue com o córion (Robinson, 2014; Desesso et al., 2012).

Geralmente, moléculas que pesam mais de 500 Da não realizam uma passagem completa pela barreira placentária, e aquelas acima de 1000 Da enfrentam uma situação de quase impermeabilidade (Stanislaw; Artur; Marcin, 2009; Syme; Paxton; Keelan, 2004). Dessa forma, uma vez que a molécula da BoNtA tem um peso molecular de 150 kDa, é improvável que ela seja capaz de cruzar a barreira placentária pelo transporte passivo de difusão, entretanto, não se pode descartar a possibilidade de travessia por transporte ativo (Nigam; Nigam, 2010; Pearce, 2014; Dayan et al., 2018; Wong; Khalil; Ahmed, 2020).

Por essa razão, a administração da BoNtA é contraindicada durante a gestação e a amamentação, tal como em crianças menores de 12 anos de idade, sob a

justificativa de que pode afetar o crescimento axonal desses últimos (Newman et al., 2004; Münchau; Bhatia, 2000). Em relação ao uso da BoNtA durante a gestação, a FDA (2016, 2021) atesta que não se tem conhecimento se tanto a formulação terapêutica quanto a estética são capazes de causar quaisquer danos ao feto. A fabricante recomenda, portanto, que sejam administradas somente se o potencial benefício ao usuário justificar o potencial risco ao feto, classificando-a como uma substância de categoria C de risco na gestação (Allergan, Inc., 2004; Morgan et al., 2006; Pirazzini et al., 2017). Atualmente, há um número crescente de relatos de gravidez após administração terapêutica de BoNtA, ou até mesmo após casos de botulismo, sem danos causados ao feto, entretanto, não costuma ocorrer um acompanhamento a longo prazo dos descendentes (Pearce, 2014; Pirazzini et al., 2017).

Em um estudo experimental, observou-se que a administração intramuscular de BoNtA em ratas gestantes uma única vez em três períodos diferentes do desenvolvimento do concepto – anterior à implantação, durante a implantação ou durante a organogênese –, nas doses de 1, 4 ou 16 U/kg (unidades por quilograma), não provocou efeitos adversos no desenvolvimento fetal (Allergan, Inc., 2022). No entanto, foi apresentado que a administração intramuscular de BoNtA em ratas ou fêmeas de camundongo prenhes duas vezes durante o período de organogênese (nos dias gestacionais 5 e 13), nas doses de 4, 8 ou 16 U/kg, provocou reduções no peso corporal e na ossificação esquelética da prole nas duas doses mais altas (Allergan, Inc., 2022).

A administração intramuscular de BoNtA em ratas gestantes – nas doses de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 4 ou 8 U/kg – ou coelhas gestantes – nas doses de 0,063; 0,125; 0,25 ou 0,5 U/kg – diariamente durante o período de organogênese (totalizando 12 doses nas ratas e 13 nas coelhas), resultou na diminuição do peso corporal e da ossificação esquelética da prole nas duas doses mais altas para as ratas e na dose mais alta para as coelhas. Além disso, essas altas doses foram relacionadas a uma toxicidade materna significativa, provocando partos prematuros, abortos e falecimento das mães (Allergan, Inc., 2022). Apesar de tais estudos, ainda não há provas conclusivas quanto aos riscos que podem resultar da administração dessa droga durante o período gestacional (Pirazzini et al., 2017).

1.5 JUSTIFICATIVA

A toxina botulínica tipo A (BoNtA) tem seu uso bastante difundido na estética humana, atenuando as rugas e linhas de expressão facial, porém também tem uma importante aplicação clínica, pois, uma vez que é capaz de paralisar a musculatura local temporariamente, é muito útil no tratamento de diversos distúrbios motores e do movimento, como espasticidade muscular, bexiga urinária hiperativa e bruxismo.

Inúmeras pessoas necessitam da BoNtA para obter uma melhor qualidade de vida quanto às suas condições motoras e, dentre essas, estão pessoas em período gestacional. Contudo, a *U.S. Food and Drug Administration* declara que não se sabe se a toxina é capaz de gerar danos ao concepto, enquadrando o fármaco na categoria C de risco gestacional. Ou seja, essa substância pode ser administrada apenas se seu potencial benefício justificar o potencial risco ao feto.

Além disso, a passagem de substâncias entre mãe e filho através da placenta ocorre pelos mecanismos de difusão simples, difusão facilitada, endocitose, pinocitose, ultrafiltração e transporte ativo, e moléculas com peso acima de 1000 Da atravessam a barreira placentária escassamente. Dessa forma, considerando que a BoNtA possui um peso molecular de 150 kDa, é improvável que sua travessia seja realizada através do transporte passivo, porém o transporte ativo deve ser equitativamente considerado.

Hodiernamente, não há certezas quanto à possibilidade de essa toxina ser transferida da mãe a seus conceptos através da barreira placentária, devido à escassez de estudos farmacocinéticos envolvendo esse fenômeno e seus potenciais efeitos a curto e longo prazo na prole quando administrada durante a gestação. Por essa razão, é de eminente relevância que sejam realizadas mais pesquisas elucidando os possíveis efeitos desse evento para que não seja mais necessário interromper tratamentos terapêuticos crônicos de gestantes devido à falta de conhecimento científico. De tal modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da exposição de ratas Wistar a uma formulação comercial de BoNtA durante a gestação na atividade motora e no desenvolvimento físico e reflexológico da prole.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da exposição de ratas Wistar a uma formulação comercial de toxina botulínica tipo A durante o período de gestação sobre o desenvolvimento físico e reflexológico e a atividade motora geral da prole, na infância e na idade adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os efeitos da toxina botulínica tipo A na prole de ratas Wistar expostas a tal substância durante o período de gestação:

- Em seu desenvolvimento físico;
- Em seu desenvolvimento reflexológico;
- Em sua coordenação motora na infância e na idade adulta, por meio da avaliação da marcha fisiológica;
- Em sua atividade motora e exploratória na infância e na idade adulta, por meio do teste do campo aberto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 32 ratas Wistar, com aproximadamente 65 dias de vida. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Eles permaneceram alojados em gaiolas de polipropileno (43 x 23 x 16 cm) mantidas em uma sala com a temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e com o ciclo de doze horas de claro e escuro (a luz acende às 7h e se apaga às 19h). Além disso, água e comida *ad libitum* foram fornecidas durante todo o período experimental.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), sob o protocolo de número 016-12-2021, e pela CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sob o protocolo de número 8186301121 (Anexos A e B, respectivamente).

3.2 FÁRMACO

Foi utilizado o produto comercial Botulim®, cujo frasco-ampola contém 100 Unidades de BoNtA (produto fabricado por Hugel, Inc., na Coreia do Sul, e importado e embalado por Blau Farmacêutica S.A.). Esta formulação comercial de BoNtA é enquadrada na categoria C de risco na gestação, sendo contraindicado em gestantes, lactantes e pessoas em período fértil e afirma-se que não foi estabelecida segurança para o fármaco durante a gestação e a amamentação (Botulim®, 2023).

Sendo assim, foram preparadas soluções contendo 4, 8 ou 16 U/kg (unidades por quilograma) de BoNtA diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8 gestantes/grupo), sendo três grupos experimentais, expostos às doses únicas de 4, 8 ou 16 U/Kg de BoNtA no Dia Gestacional (DG) 5, e um grupo controle, exposto à dose única de 0,1 mL/kg de solução salina (NaCl 0,9%). Todas as administrações foram realizadas por via intramuscular no membro pélvico direito.

As doses (4, 8 ou 16 U/kg) e a via de administração (intramuscular) empregadas basearam-se naquelas utilizadas no estudo realizado pelo laboratório Allergan, Inc. (2022) para avaliar os efeitos do Botox® administrado durante a gestação. Ademais, a administração da toxina foi efetuada no DG 5, visto que, em ratos, a implantação do embrião no endométrio uterino ocorre por volta desse período (Magalhães et al., 2015; Górnaiak; Gotardo, 2020), visando, desse modo, minguar a chance de ocorrerem abortos espontâneos, que culminariam em embriofetalidade.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 32 ratas Wistar e suas respectivas proles que foram padronizadas, sempre que possível, em oito filhotes, sendo eles quatro machos e quatro fêmeas por genitora. As ratas gestantes foram separadas em quatro grupos de oito animais cada (n=8 ratas por grupo), sendo um grupo controle e três experimentais.

Os animais do grupo controle receberam, por via intramuscular, 0,1 mL/kg de solução salina (NaCl 0,9%) no DG 5, enquanto os animais dos grupos experimentais receberam 4, 8 ou 16 U/kg de toxina botulínica tipo A (Botulim®, Blau Farmacêutica S.A.) pela mesma via, também no DG 5. A aplicação foi realizada no membro pélvico direito em todos os animais. Tais informações estão sintetizadas no Quadro 1, bem como os nomes dados a cada grupo.

Quadro 1 – Descrição dos grupos experimentais.

Grupo	Descrição	Via de administração
Cont	0,1 mL/kg de solução salina (NaCl 0,9%)	Via intramuscular; Local de aplicação: membro pélvico direito
BoNtA-4U	4 U/kg de toxina botulínica tipo A	
BoNtA-8U	8 U/kg de toxina botulínica tipo A	
BoNtA-16U	16 U/kg de toxina botulínica tipo A	

Fonte: Autoral.

Após o desmame, realizado no Dia Pós-Natal (DPN) 21, as proles dessas fêmeas foram alojadas em número de até quatro filhotes por gaiolas de polipropileno

(43 x 23 x 16 cm), e mantidos em uma sala com a temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com o ciclo de doze horas de claro e escuro. Eles também obtiveram água e comida *ad libitum* durante todo o período experimental. Além disso, foram separados nos mesmos grupos experimentais que suas respectivas genitoras, em questão de nomenclatura.

A análise do desenvolvimento físico ocorreu do DPN 2 ao 45 e a análise do desenvolvimento reflexológico, do DPN 2 ao 21. Já os testes da marcha e do campo aberto foram realizados no DPN 22, na infância, e repetidos no DPN 60, na idade adulta, com os mesmos animais. Estas informações estão reunidas no Quadro 2.

Quadro 2 – Delineamento experimental. DPN: Dia Pós-Natal.

Avaliação	Teste ou parâmetro	Dia do teste
Desenvolvimento	Físico	DPN 2 ao 45
	Reflexológico	DPN 2 ao 21
Atividade motora	Teste da marcha	DPN 22 e DPN 60
	Teste do campo aberto	

Fonte: Autoral.

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Para o acasalamento, as fêmeas foram inseridas nas gaiolas dos machos, ao fim da tarde, na razão de três fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte, foi efetuado o esfregaço vaginal das fêmeas para o diagnóstico de prenhez. Esse procedimento consiste na introdução de um *swab* umedecido com solução salina no orifício vaginal da fêmea para coleta de material.

O diagnóstico de prenhez é considerado positivo quando se observa, através de microscopia óptica, presença de espermatozoides e células queratinizadas no material coletado. Após isso, as fêmeas cujo diagnóstico resultou positivo foram mantidas em gaiolas separadas durante toda a sua gestação.

3.4.2 Nascimento e padronização das ninhadas

Após o resultado positivo do diagnóstico de prenhez, a ratas gestantes foram observadas todos os dias para a verificação do nascimento dos filhotes. O dia do nascimento foi considerado o Dia Pós-Natal (DPN) 1. No DPN 2, foi realizada a sexagem e padronização do número de filhotes para oito e, sempre que possível, permaneceram quatro machos e quatro fêmeas. Para isso, foi efetuada a contagem do número total de filhotes nascidos, bem como do número de machos e de fêmeas.

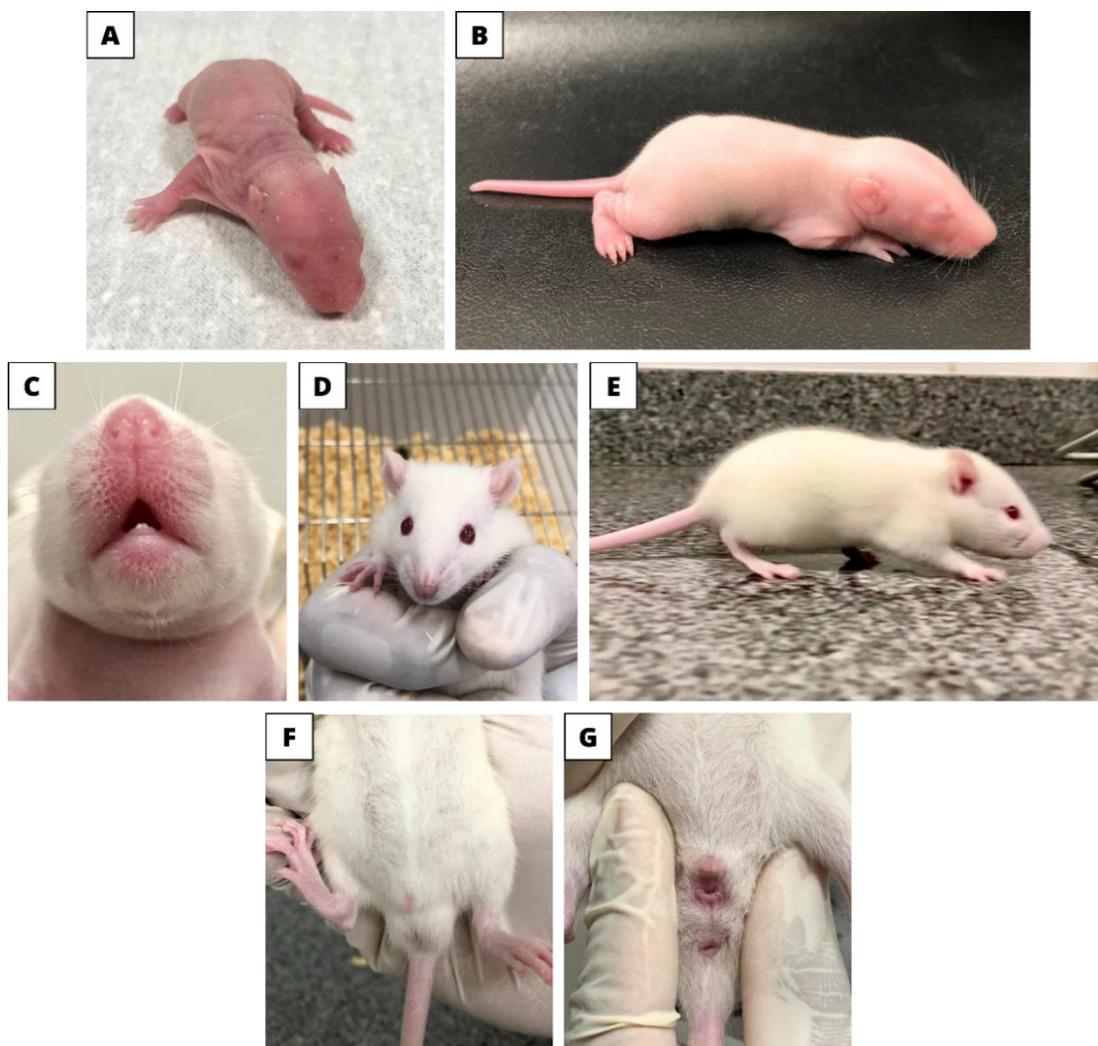
3.4.3 Desenvolvimento físico da prole

Para o cálculo do ganho de peso, cada animal da prole foi pesado diariamente do DPN 2 ao 21. Além disso, do DPN 2 ao 45, foi analisado diariamente o desenvolvimento físico de toda a prole conforme descrito por Udo e colaboradores (2014) e Zaccarelli-Magalhães e colaboradores (2020).

Nesse sentido, foi anotado o dia de aparecimento dos parâmetros elencados a seguir e ilustrados pela Figura 4.

- 1) Descolamento das orelhas: quando se desprende, da cabeça do animal, a pele que forma sua orelha externa;
- 2) Aparecimento de pelos: quando se observa o aparecimento de pelos que cobrem todo o corpo do animal;
- 3) Erupção dos dentes incisivos: quando ocorre o aparecimento da coroa dos dentes incisivos inferiores;
- 4) Abertura dos olhos: quando há abertura da fissura palpebral;
- 5) Andar adulto: quando o filhote anda sem encostar o ventre no chão, se sustentando sobre as quatro patas;
- 6) Descida dos testículos dos machos e abertura vaginal das fêmeas.

Figura 4 – Parâmetros avaliados quanto ao desenvolvimento físico da prole: A) Descolamento das orelhas; B) Aparecimento de pelos; C) Erupção dos dentes incisivos; D) Abertura dos olhos; E) Andar adulto; F) Descida dos testículos dos machos; G) Abertura vaginal das fêmeas.



Fonte: Autoral.

3.4.4 Desenvolvimento reflexológico da prole

Foi avaliado diariamente, do DPN 2 ao 21, o desenvolvimento reflexológico de toda a prole, conforme descrito por Udo e colaboradores (2014) e Zaccarelli-Magalhães e colaboradores (2020).

Nesse sentido, foi anotado o dia de aparecimento dos parâmetros elencados a seguir e ilustrados pela Figura 5.

1) Endireitamento postural: o animal foi colocado em decúbito dorsal para observação da ocorrência de virada do corpo para a posição de decúbito ventral;

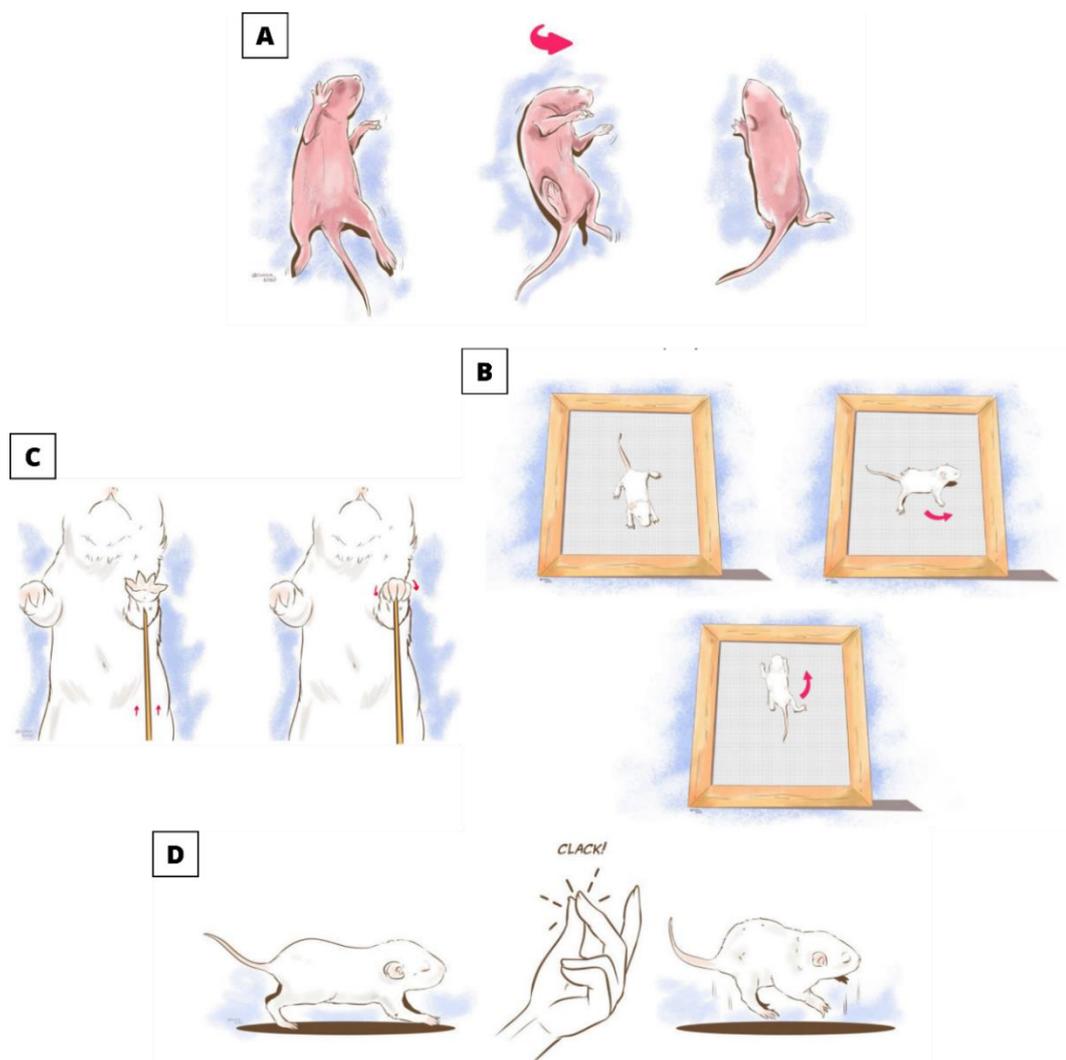
2) Geotaxia negativa: o animal foi posicionado em uma rampa com inclinação de 45° com a cabeça direcionada para baixo e observou-se se o animal voltava para a posição ascendente, ou seja, com a cabeça direcionada para cima;

3) Preensão palmar: o coxim plantar das patas anteriores foi tocado com a ponta de um clipe metálico e o animal respondeu fechando a pata;

4) Sobressalto: foi observado se o animal apresentou tremor generalizado ao ser exposto ao som de um estalo, o que indica a abertura do canal auditivo.

Vale ressaltar que a preensão palmar é o único parâmetro perdido pelo animal durante seu desenvolvimento, portanto foi anotado o dia de seu desaparecimento.

Figura 5 – Parâmetros avaliados quanto ao desenvolvimento reflexológico da prole: A) Endireitamento postural; B) Geotaxia negativa; C) Preensão palmar; D) Sobressalto.



Fonte: Ilustração de Chairim Arrais (2020), adaptado de Abreu (2020).

3.4.5 Teste da marcha

Para a avaliação da coordenação motora e do equilíbrio da prole, foi utilizada uma plataforma horizontal plana com 30 cm de comprimento, 10 cm de largura, paredes de 15 cm e sem elevação. No DPN 22 e no DPN 60, foram realizados registros diretos da marcha dos animais, através da marcação das patas traseiras com tinta, conforme descrito por Pantaleon e colaboradores (2023) e Pinto, Souza e Ko (2015).

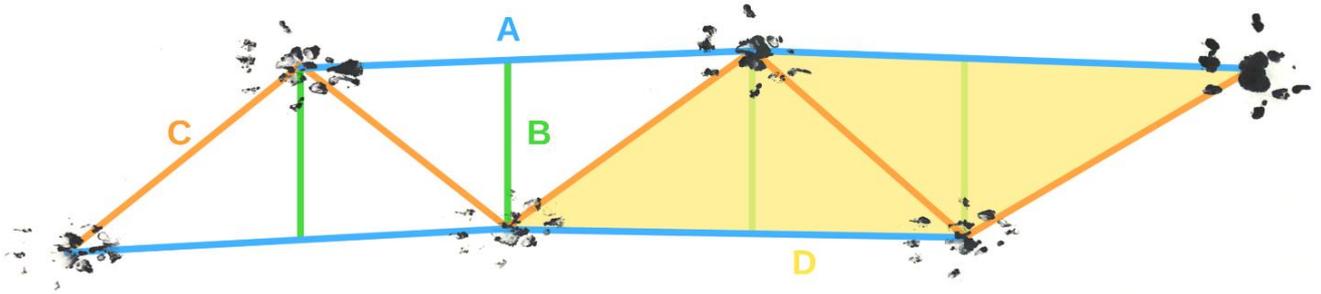
Abaixo do aparato foi colocado papel filtro (Figura 6) e, com as patas traseiras pintadas, os animais foram colocados para caminhar sobre ele, deixando os registros de suas marchas. Portanto, os parâmetros exibidos nas Figuras 7 e 8 e descritos no Quadro 3 foram avaliados de acordo com Jacobs e colaboradores (2014) e Yamamoto e colaboradores (2019) em um macho e uma fêmea de cada ninhada (que foram previamente selecionados ao acaso e identificados) para representar a prole de cada grupo.

Figura 6 – Aparato utilizado no teste da marcha.



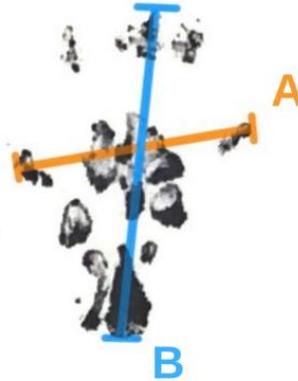
Fonte: Autoral.

Figura 7 – Parâmetros do teste da marcha avaliados no presente estudo.



Fonte: Autoral.

Figura 8 – Parâmetros do teste da marcha avaliados no presente estudo.



Fonte: Autoral.

Quadro 3 – Descrição dos parâmetros avaliados no teste da marcha (continua).

Parâmetro	Descrição
Comprimento da passada	Distância entre duas pegadas da mesma pata (Figura 7-A; em azul).
Comprimento do passo	Largura entre os membros posteriores direito e esquerdo (Figura 7-B; em verde).
Simetria	Comprimento do passo (Figura 7-B) dividido pelo comprimento da passada (Figura 7-A). Um passo simétrico deve ser igual a 0,5.

Quadro 3 – Descrição dos parâmetros avaliados no teste da marcha (continuação).

Parâmetro	Descrição
Distância entre os pés	Distância entre os pés direito e esquerdo em um mesmo passo (Figura 7-C; em laranja).
Área da passada	Área do quadrilátero formado a cada dois passos (Figura 7-D; em amarelo; delimitado pelas linhas azuis e laranjas).
Extensão dos dedos	Distância entre o primeiro e o quinto dedos do membro posterior (Figura 8-A; em laranja).
Extensão do pé	Distância entre o terceiro dedo e o calcanhar do membro posterior (Figura 8-B; em azul).

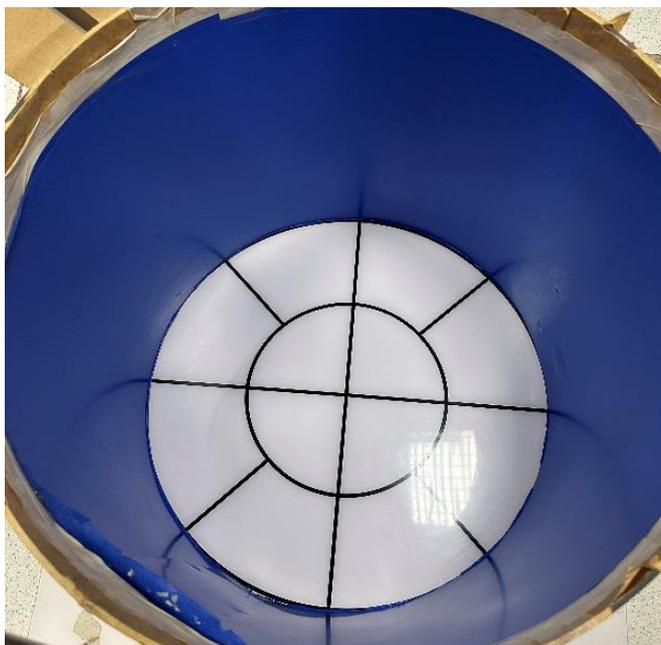
Fonte: Autoral.

3.4.6 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi desenvolvido por Calvin Hall em 1934 e tinha função inicial de mensuração da emocionalidade animal, porém, atualmente é um dos testes mais utilizados para avaliação da atividade geral, motora e exploratória. Esse teste é baseado em características inatas aos roedores, no conflito entre curiosidade e medo de ambientes novos e abertos (Seibenhener; Wooten, 2015).

O aparato utilizado consiste em uma arena circular com 97 cm de diâmetro, circundada por uma parede de 27 cm de altura; o chão da arena é demarcado por linhas pretas formando quadrantes de tamanhos semelhantes (Figura 9), como descrito por Sandini e colaboradores (2014).

Figura 9 – Aparato utilizado no teste do campo aberto.



Fonte: Autoral.

Visando avaliar a atividade motora, os animais foram colocados no centro do aparato e seu comportamento observado por cinco minutos. Para tal, foram previamente selecionados ao acaso e identificados um macho e uma fêmea de cada ninhada para representar a prole de cada grupo. Esse teste foi realizado no DPN 22 e no DPN60 e os parâmetros observados foram:

1) Frequência de locomoção: foi considerada uma unidade de locomoção quando o animal adentrou com as quatro patas em um quadrante;

2) Frequência de levantar: foi considerada uma unidade de levantar quando o animal se apoiou sobre as patas traseiras, ficando com o tronco ereto, podendo ou não tocar a parede do aparato com as patas dianteiras;

3) Tempo de *grooming*: tempo, em segundos, que o animal passa realizando o ato de auto-limpeza;

4) Tempo de imobilidade: tempo, em segundos, em que o animal permanece imóvel.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

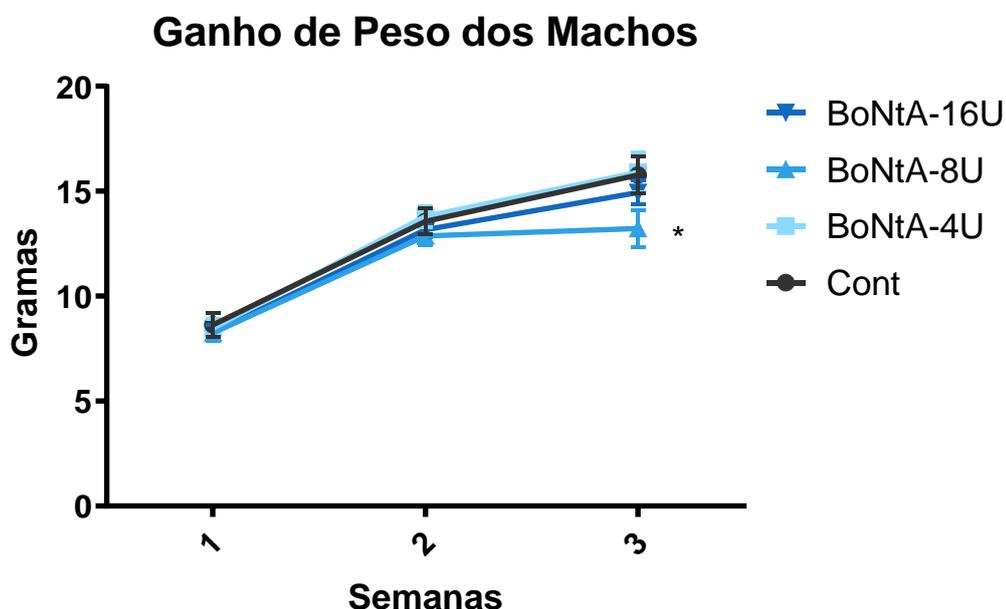
A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism 8® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). Foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, quando havia apenas um fator (tratamento) a ser avaliado. Já quando havia dois fatores (tratamento e tempo) a serem avaliados, foi empregado o teste ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni. O nível de significância para todas as análises foi considerado $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REFLEXOLÓGICO DA PROLE

A Figura 10 apresenta o ganho de peso dos machos, analisado do DPN 2 ao 21 na prole de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de duas vias apresentou uma diferença significativa em relação ao tempo ($F(2, 56)=193,7$, $p<0,0001$), porém não foram observadas diferenças referentes ao tratamento ($F(3, 28)=1,682$, $p=0,1935$), sem interação entre os fatores ($F(6, 56)=1,404$, $p=0,2292$). Nesse sentido, observou-se redução significativa no ganho de massa corporal na prole masculina das fêmeas tratadas com a dose intermediária (BoNtA-8U) em relação aos animais do grupo controle, na terceira semana de vida, isto é, no período mais próximo do fim da lactação.

Figura 10 – Ganho de peso da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. $n=8$ animais por grupo.

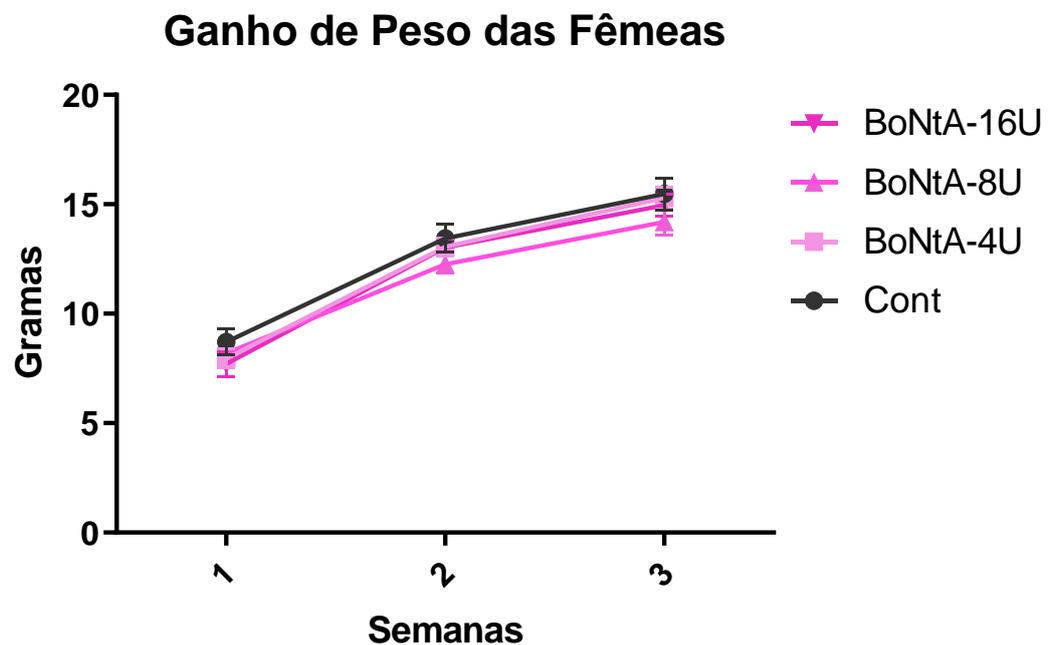


* $p<0,05$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni.

A Figura 11 apresenta o ganho de peso das fêmeas, analisado do DPN 2 ao 21 na prole de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de

duas vias não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em relação ao tempo ($F(2, 56)=346,5$, $p<0,0001$), ao tratamento ($F(3, 28)=1,006$, $p=0,4049$) e sem interação entre os fatores ($F(6, 56)=0,8097$, $p=0,5668$).

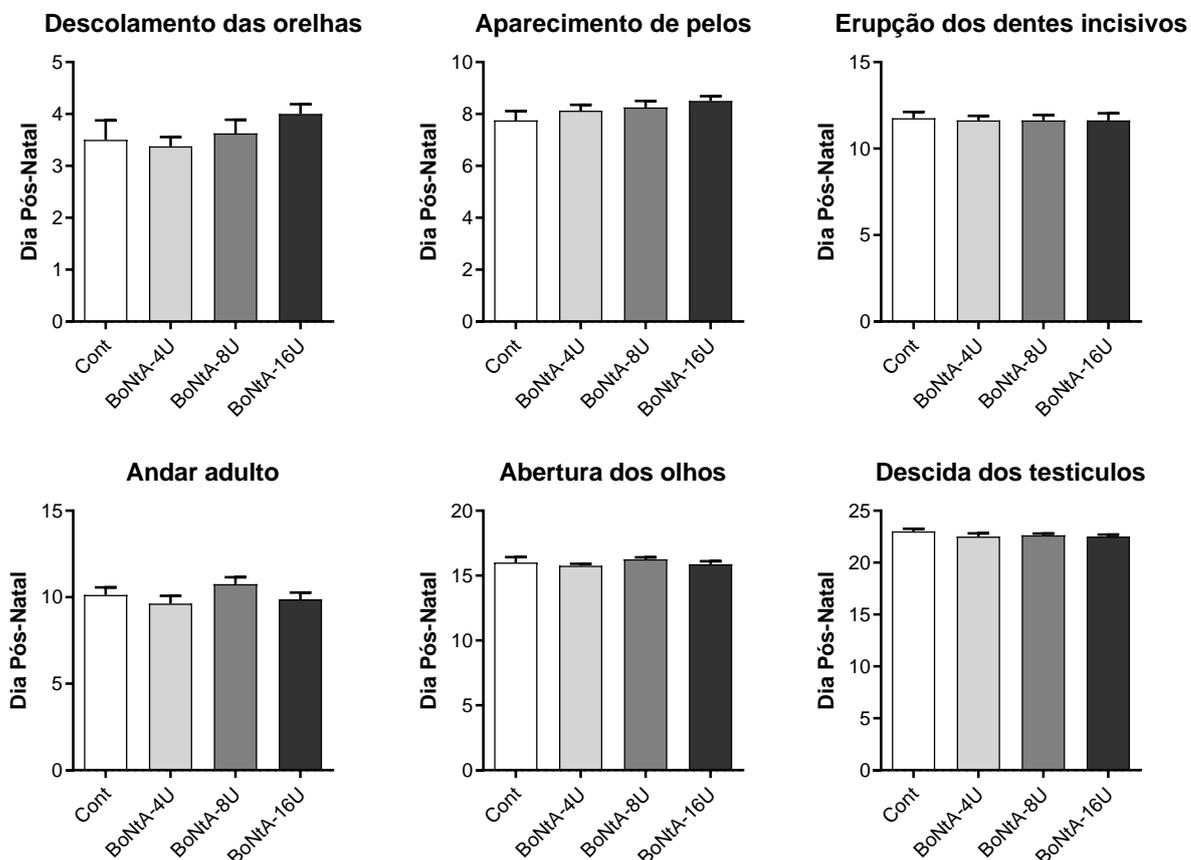
Figura 11 – Ganho de peso da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



$p>0,05$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni.

A Figura 12 apresenta os parâmetros de desenvolvimento físico dos machos, analisado do DPN 2 ao 45, na prole de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Descolamento das orelhas – $F(3, 28)=1,037$, $p=0,3914$; Aparecimento de pelos – $F(3, 28)=1,378$, $p=0,2699$; Erupção dos dentes incisivos – $F(3, 28)=0,03226$, $p=0,9920$; Abertura dos olhos – $F(3, 28)=0,6430$, $p=0,5938$; Andar adulto – $F(3, 28)=1,270$, $p=0,3039$; Descida dos testículos – $F(3, 28)=0,9039$, $p=0,4516$].

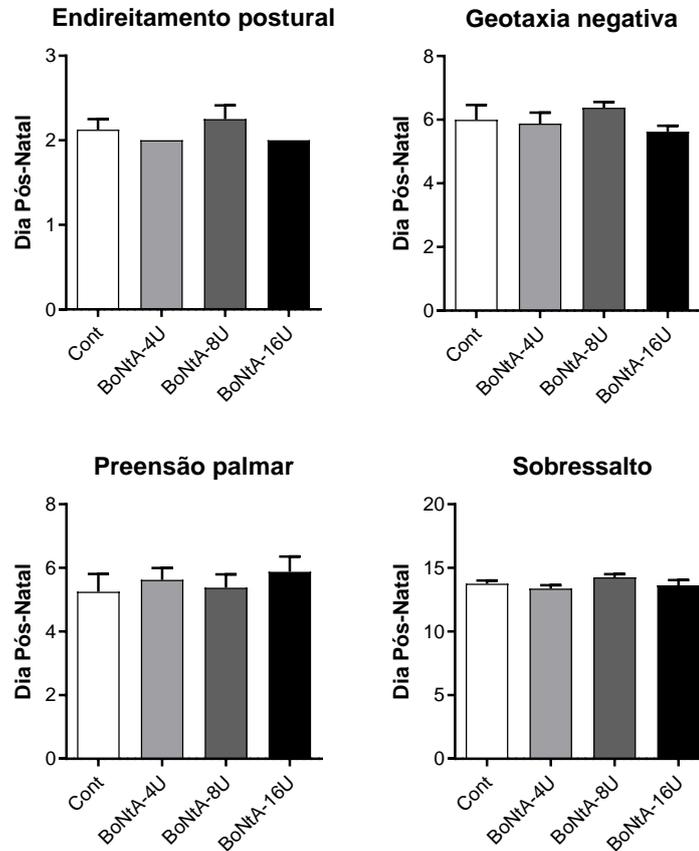
Figura 12 – Parâmetros do desenvolvimento físico da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



$p > 0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A Figura 13 apresenta os parâmetros de desenvolvimento reflexológico dos machos, analisado do DPN 2 ao 21, na prole de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Endireitamento postural – $F(3, 28)=1,351$, $p=0,2780$; Geotaxia negativa – $F(3, 28)=0,9669$, $p=0,4222$; Preensão palmar – $F(3, 28)=0,3576$, $p=0,7840$; Sobressalto – $F(3, 28)=1,462$, $p=0,2462$].

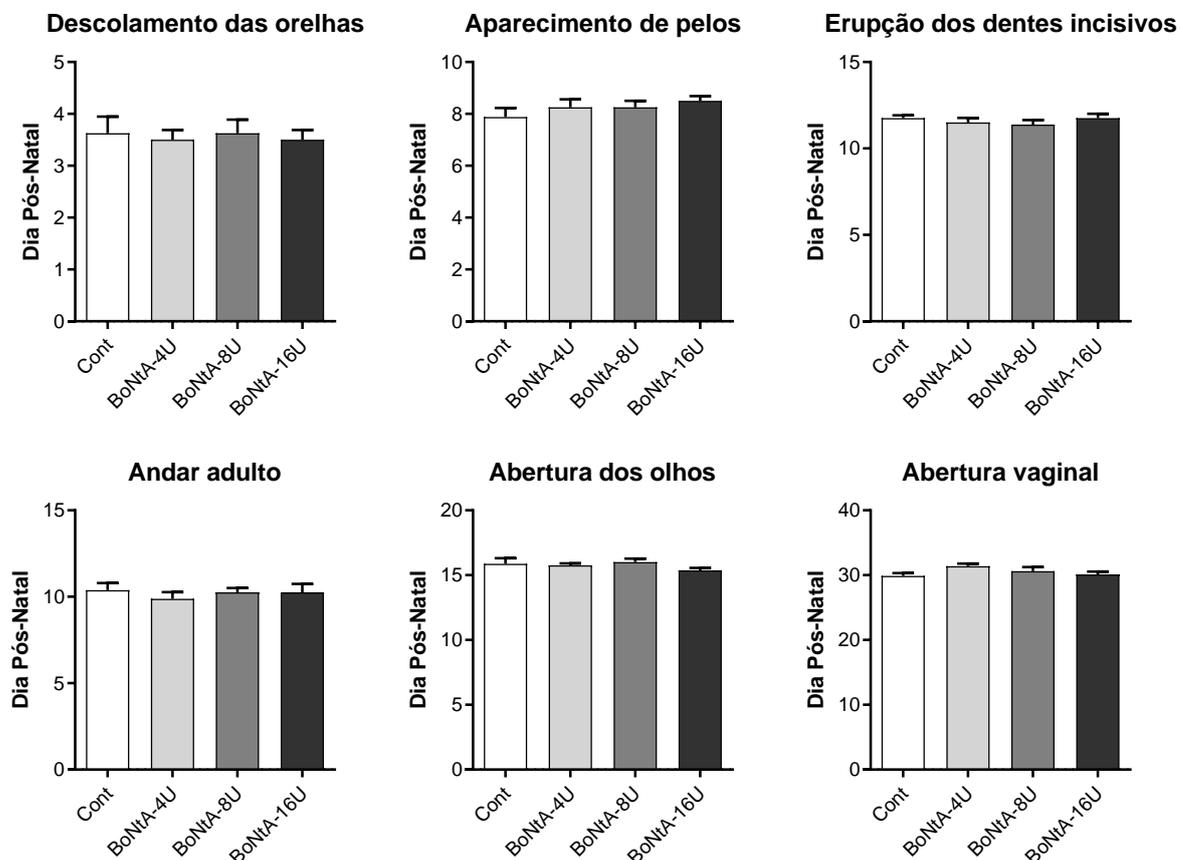
Figura 13 – Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTa (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



$p > 0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A Figura 14 apresenta os parâmetros de desenvolvimento físico das fêmeas, analisado do DPN 2 ao 45, na prole de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTa no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Descolamento das orelhas – $F(3, 28)=0,08485$, $p=0,9678$; Aparecimento de pelos – $F(3, 28)=0,8322$, $p=0,4875$; Erupção dos dentes incisivos – $F(3, 28)=0,6117$, $p=0,6131$; Abertura dos olhos – $F(3, 28)=0,8950$, $p=0,4560$; Andar adulto – $F(3, 28)=0,2937$, $p=0,8296$; Abertura vaginal – $F(3, 28)=1,832$, $p=0,1643$].

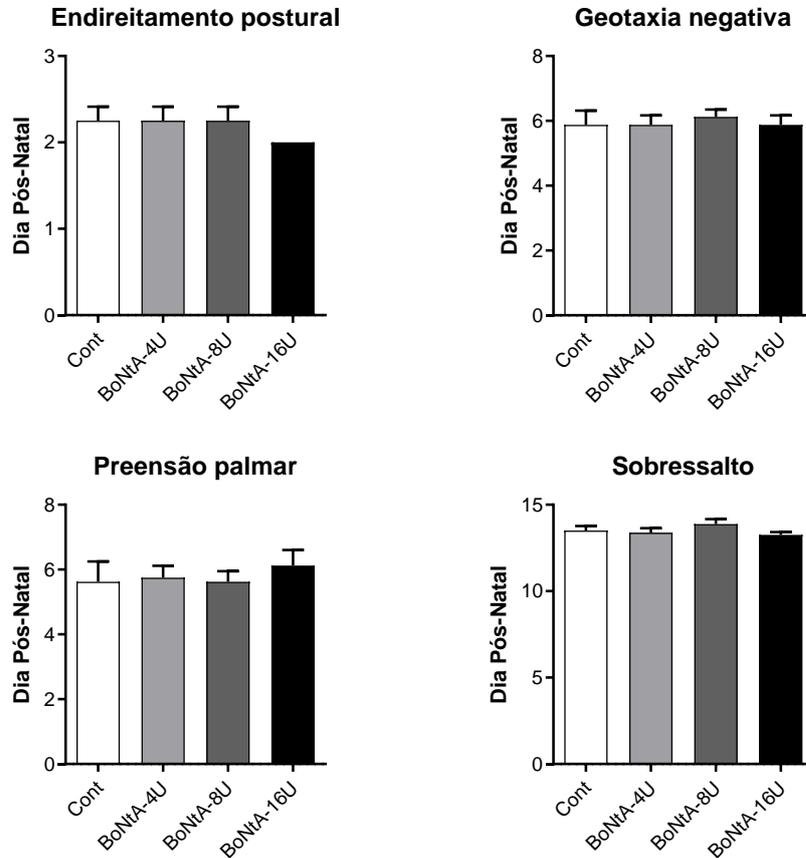
Figura 14 – Parâmetros do desenvolvimento físico da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTa (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



$p > 0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A Figura 15 apresenta os parâmetros de desenvolvimento reflexológico das fêmeas, analisado do DPN 2 ao 21, na prole de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTa no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Endireitamento postural – $F(3, 28)=0,7778$, $p=0,5163$; Geotaxia negativa – $F(3, 28)=0,1489$, $p=0,9295$; Preensão palmar – $F(3, 28)=0,2606$, $p=0,8531$; Sobressalto – $F(3, 28)=1,146$, $p=0,3477$].

Figura 15 – Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



$p > 0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

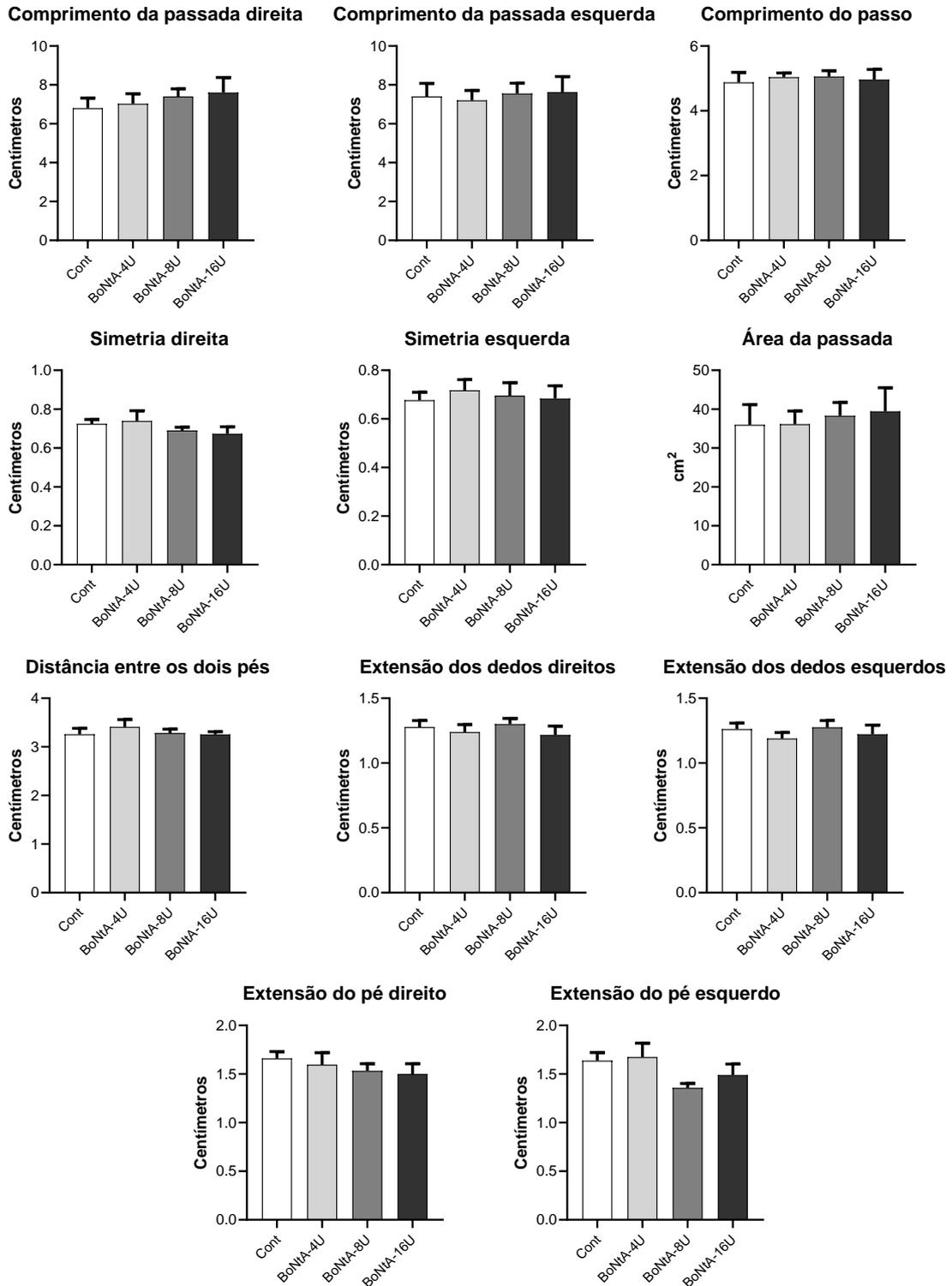
4.2 TESTE DA MARCHA

Quanto aos resultados do teste da marcha realizado com os filhotes durante a infância, a Figura 16 apresenta os parâmetros deste teste, analisados no DPN 22, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Comprimento da passada direita – $F(3, 27)=0,4246$, $p=0,7369$; Comprimento da passada esquerda – $F(3, 27)=0,08723$, $p=0,9664$; Comprimento do passo – $F(3, 27)=0,1155$, $p=0,9502$; Simetria direita – $F(3, 27)=0,7610$, $p=0,5258$; Simetria esquerda – $F(3, 27)=0,1530$, $p=0,9269$; Distância entre os dois pés – $F(3, 27)=0,4402$, $p=0,7261$; Área da passada – $F(3, 27)=0,1332$, $p=0,9395$; Extensão dos dedos direitos – $F(3, 27)=0,4570$,

$p=0,7145$; Extensão dos dedos esquerdos – $F(3, 27)=0,5509$, $p=0,6519$; Extensão do pé direito – $F(3, 27)=0,5429$, $p=0,6571$; Extensão do pé esquerdo – $F(3, 27)=2,102$, $p=0,1234$].

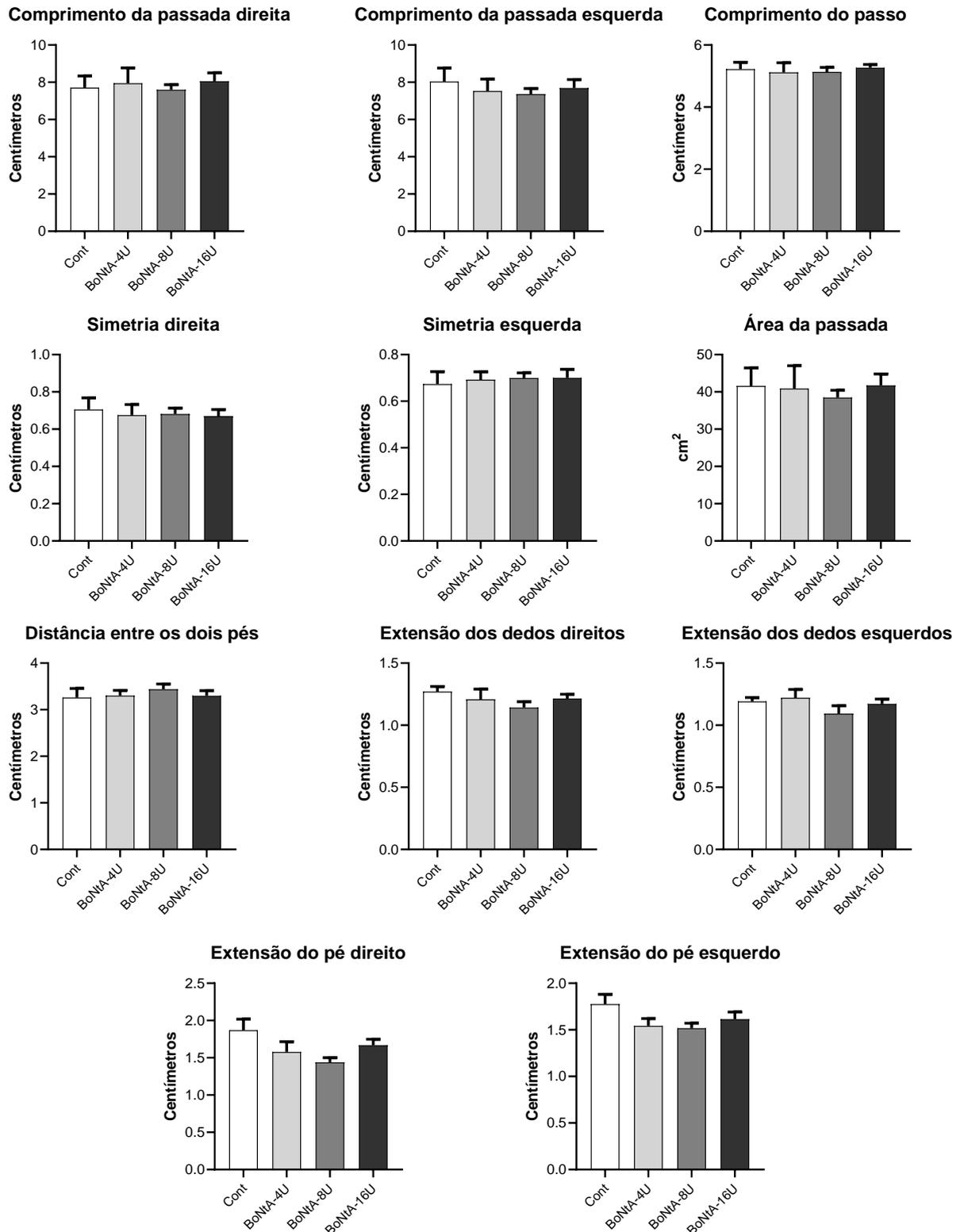
Já a Figura 17 apresenta os parâmetros deste teste, analisados no DPN 22, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Comprimento da passada direita – $F(3, 28)=0,1295$, $p=0,9418$; Comprimento da passada esquerda – $F(3, 28)=0,2672$, $p=0,8485$; Comprimento do passo – $F(3, 28)=0,1171$, $p=0,9493$; Simetria direita – $F(3, 28)=0,1017$, $p=0,9584$; Simetria esquerda – $F(3, 28)=0,1057$, $p=0,9560$; Distância entre os dois pés – $F(3, 28)=0,3198$, $p=0,8109$; Área da passada – $F(3, 28)=0,1228$, $p=0,9459$; Extensão dos dedos direitos – $F(3, 28)=0,9305$, $p=0,4390$; Extensão dos dedos esquerdos – $F(3, 28)=1,071$, $p=0,3771$; Extensão do pé direito – $F(3, 28)=2,539$, $p=0,0767$; Extensão do pé esquerdo – $F(3, 28)=2,042$, $p=0,1308$].

Figura 16 – Parâmetros da marcha, avaliados no DPN 22, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



p>0,05. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

Figura 17 – Parâmetros da marcha, avaliados no DPN 22, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTa (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.

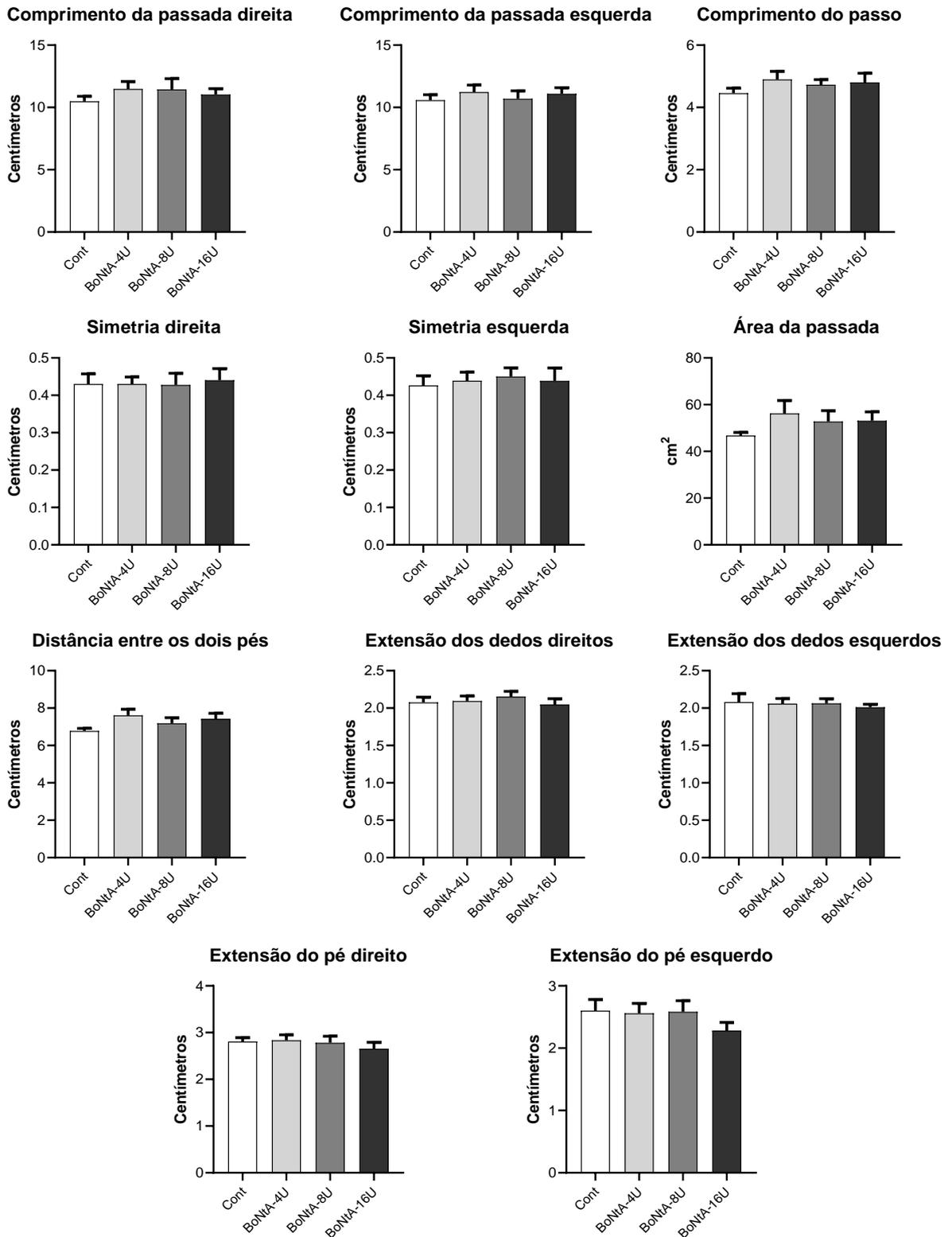


p>0,05. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

Naquilo que compete aos resultados do teste da marcha realizado com os filhotes durante a idade adulta, a Figura 18 apresenta os parâmetros deste teste, analisados no DPN 60, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Comprimento da passada direita – $F(3, 28)=0,5590$, $p=0,6465$; Comprimento da passada esquerda – $F(3, 28)=0,3400$, $p=0,7965$; Comprimento do passo – $F(3, 28)=0,6823$, $p=0,5703$; Simetria direita – $F(3, 28)=0,04012$, $p=0,9890$; Simetria esquerda – $F(3, 28)=0,1280$, $p=0,9427$; Distância entre os dois pés – $F(3, 28)=1,727$, $p=0,1841$; Área da passada – $F(3, 28)=0,9187$, $p=0,4446$; Extensão dos dedos direitos – $F(3, 28)=0,3772$, $p=0,7701$; Extensão dos dedos esquerdos – $F(3, 28)=0,1571$, $p=0,9242$; Extensão do pé direito – $F(3, 28)=0,4231$, $p=0,7379$; Extensão do pé esquerdo – $F(3, 28)=0,8467$, $p=0,4800$].

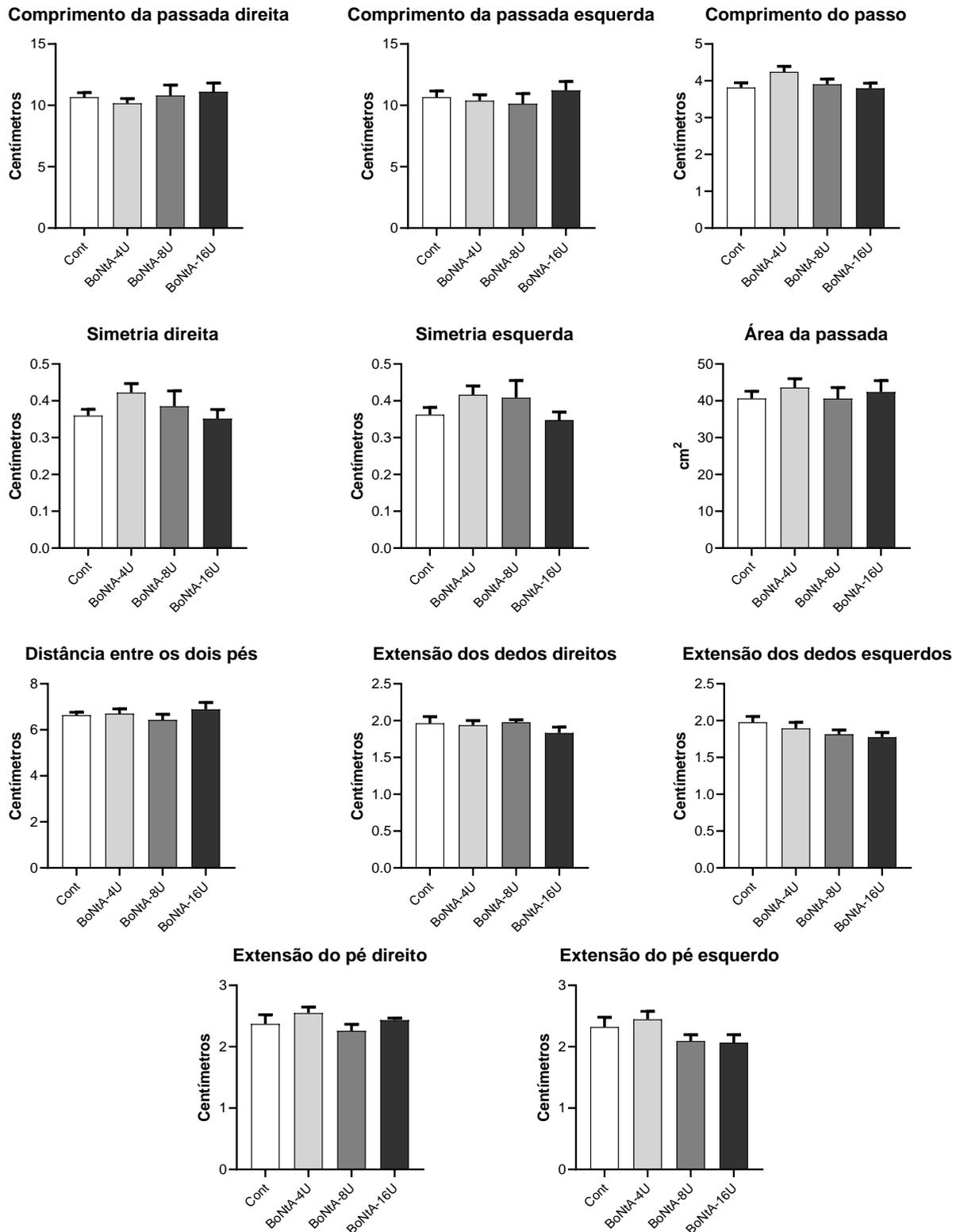
Já a Figura 19 apresenta os parâmetros deste teste, analisados no DPN 60, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Comprimento da passada direita – $F(3, 28)=0,4083$, $p=0,7483$; Comprimento da passada esquerda – $F(3, 28)=0,5160$, $p=0,6746$; Comprimento do passo – $F(3, 28)=2,198$, $p=0,1105$; Simetria direita – $F(3, 28)=1,251$, $p=0,3100$; Simetria esquerda – $F(3, 28)=1,264$, $p=0,3057$; Distância entre os dois pés – $F(3, 28)=0,6576$, $p=0,5850$; Área da passada – $F(3, 28)=0,2966$, $p=0,8276$; Extensão dos dedos direitos – $F(3, 28)=0,8717$, $p=0,4675$; Extensão dos dedos esquerdos – $F(3, 28)=1,635$, $p=0,2038$; Extensão do pé direito – $F(3, 28)=1,321$, $p=0,2872$; Extensão do pé esquerdo – $F(3, 28)=1,921$, $p=0,1491$].

Figura 18 – Parâmetros da marcha, avaliados no DPN 60, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



p>0,05. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

Figura 19 – Parâmetros da marcha, avaliados no DPN 60, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.

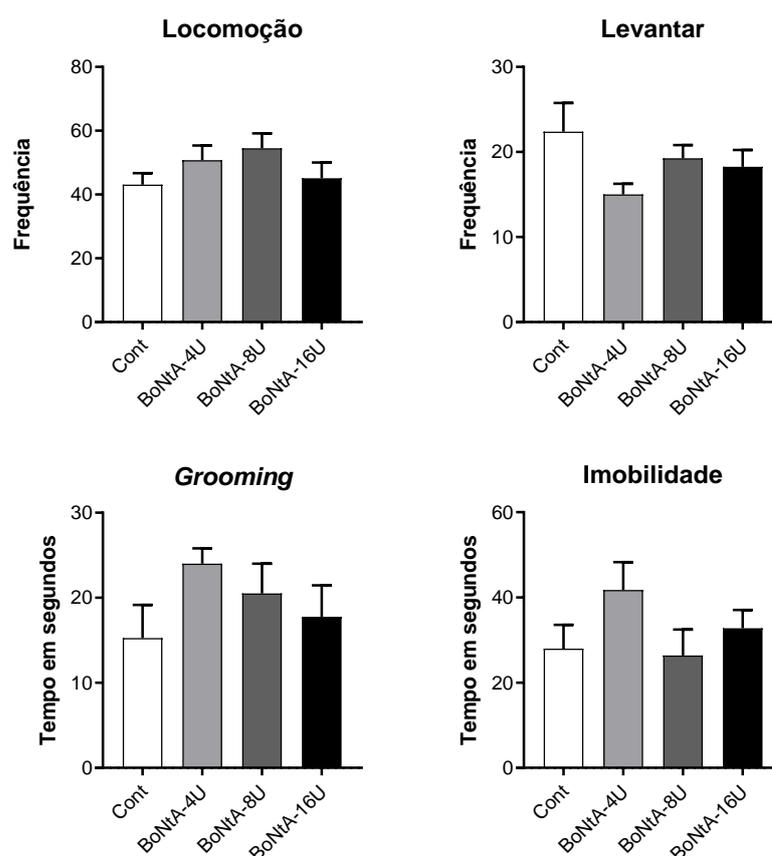


p>0,05. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

4.3 TESTE DO CAMPO ABERTO

Tratando-se dos resultados do teste do campo aberto realizado com os filhotes durante a infância, a Figura 20 apresenta os parâmetros deste teste, analisados no DPN 22, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não exibiu diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Locomoção – $F(3, 28) = 1,354$, $p=0,2770$; Levantar – $F(3, 28) = 1,886$, $p=0,1549$; *Grooming* – $F(3, 28) = 1,259$, $p=0,3074$; Imobilidade – $F(3, 28) = 1,472$, $p=0,2435$].

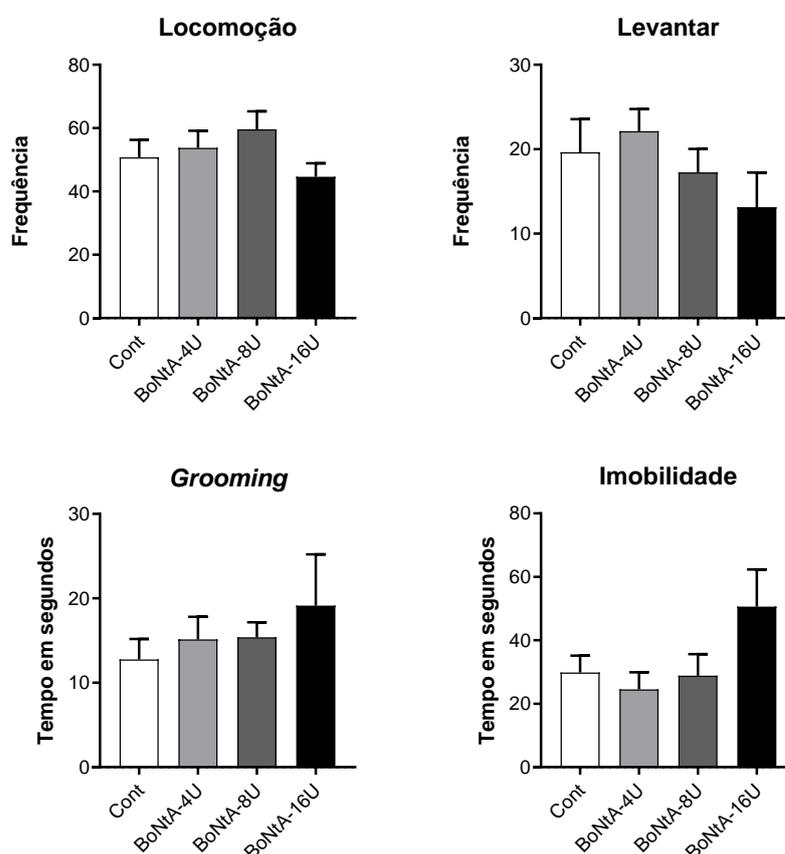
Figura 20 – Parâmetros da atividade geral, avaliados através do teste do campo aberto no DPN 22, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. $n=8$ animais por grupo.



$p>0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A Figura 21, por sua vez, exibe os parâmetros deste teste, analisados no DPN 22, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Locomoção – $F(3, 28)=1,415$, $p=0,2592$; Levantar – $F(3, 28)=1,241$, $p=0,3134$; *Grooming* – $F(3, 28)=0,5198$, $p=0,6721$; Imobilidade – $F(3, 28)=2,270$, $p=0,1022$].

Figura 21 – Parâmetros da atividade geral, avaliados através do teste do campo aberto no DPN 22, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. $n=8$ animais por grupo.

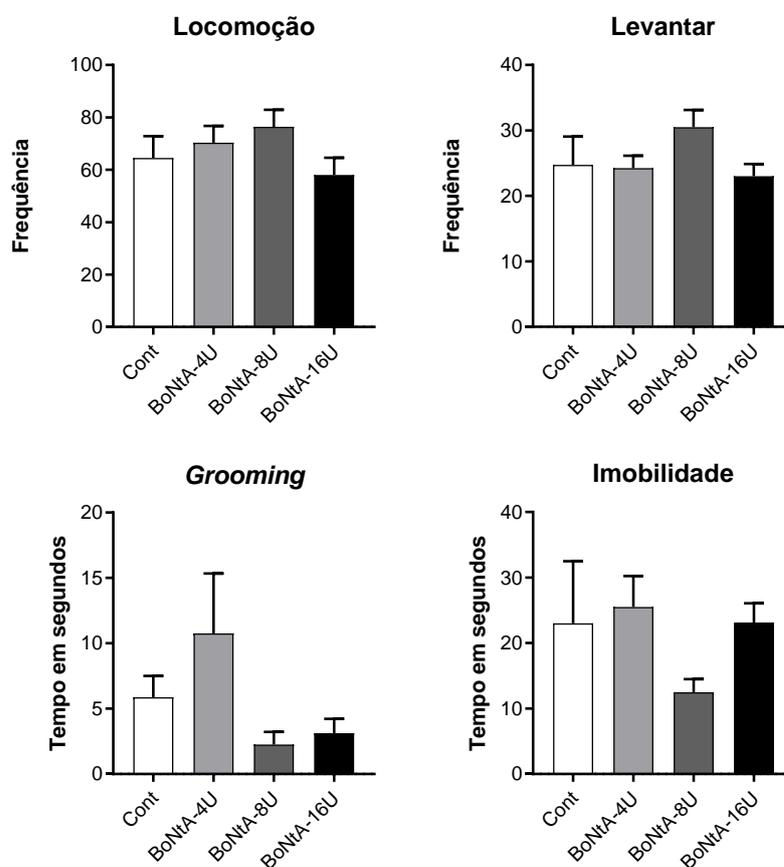


$p>0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

Já em relação aos resultados deste teste realizado com os filhotes durante a idade adulta, a Figura 22 mostra os parâmetros deste teste, analisados no DPN 60, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os

grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Locomoção – $F(3, 28)=1,270$, $p=0,3038$; Levantar – $F(3, 28)=1,361$, $p=0,2748$; *Grooming* – $F(3, 28)=2,263$, $p=0,1030$; Imobilidade – $F(3, 28)=1,077$, $p=0,3749$].

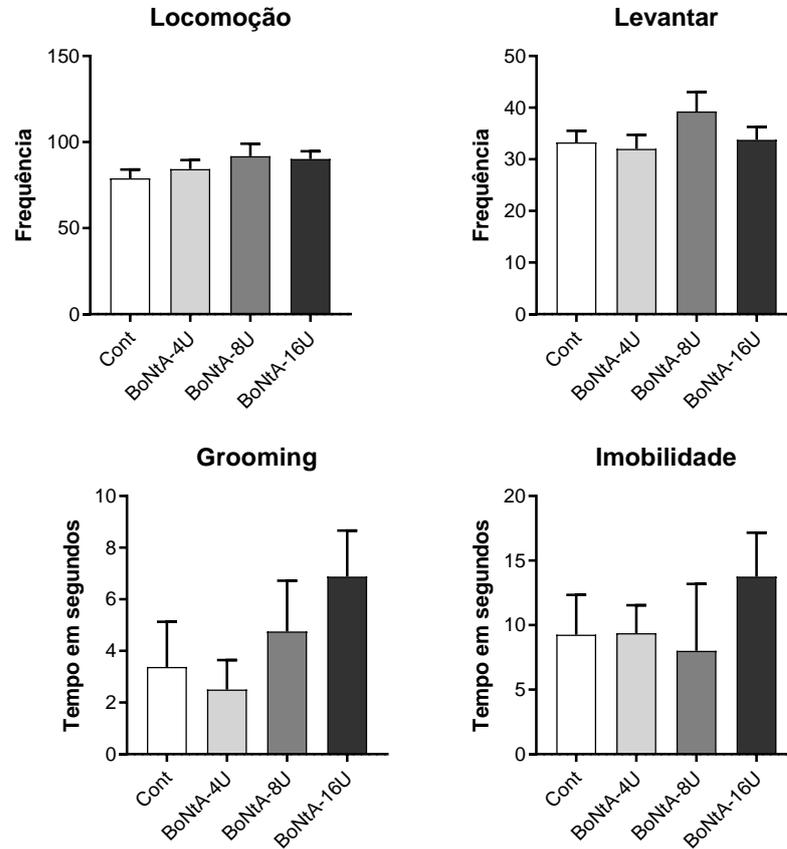
Figura 22 – Parâmetros da atividade geral, avaliados através do teste do campo aberto no DPN 60, da prole masculina das fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. $n=8$ animais por grupo.



$p>0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A Figura 23, por sua vez, exibe os parâmetros deste teste, analisados no DPN 60, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNtA no DG 5. A ANOVA de uma via não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados [Locomoção – $F(3, 28)=1,066$, $p=0,3794$; Levantar – $F(3, 28)=1,244$, $p=0,3126$; *Grooming* – $F(3, 28)=1,268$, $p=0,3044$; Imobilidade – $F(3, 28)=0,4796$, $p=0,6991$].

Figura 23 – Parâmetros da atividade geral, avaliados através do teste do campo aberto no DPN 60, da prole feminina de fêmeas tratadas com diferentes doses de BoNTa (4, 8 ou 16 U/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) (Controle – Cont), por via intramuscular no DG 5. São apresentadas as médias com os respectivos erros padrões nos grupos. n=8 animais por grupo.



$p > 0,05$. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5 DISCUSSÃO

A toxicologia pode ser definida como a ciência que se debruça sobre os efeitos nocivos consequentes da interação de um organismo com substâncias químicas e/ou agentes físicos, avaliando seus efeitos quantitativos e qualitativos. Este é um campo de estudo multi e interdisciplinar além de multiprofissional, envolvendo biólogos, farmacêuticos, químicos, médicos e médicos veterinários. Uma de suas diversas áreas é a toxicologia medicamentosa, dedicada às substâncias químicas utilizadas na terapia, avaliando e contrapondo seus riscos e benefícios (Spinosa; Fukushima, 2020).

É possível avaliar, ainda, os efeitos tóxicos de agentes físicos ou químicos em conceitos em desenvolvimento, constituindo a área da toxicologia do desenvolvimento. Sua origem está nos estudos teratológicos, isto é, focados nas alterações estruturais nos conceitos, e, atualmente, aborda alterações comportamentais, funcionais, morte da progênie e retardos no crescimento, com muitas de suas investigações sendo em mamíferos (Górniak; Gotardo, 2020).

A ação dos agentes no organismo embrionário está fortemente relacionada com o estágio do desenvolvimento em que ele se encontra e por quanto tempo foi exposto aos agentes. Por exemplo, independentemente da espécie mamífera, antes da implantação do embrião no endométrio uterino, ocorrem variações hormonais, mediados principalmente pela progesterona e pelo estrogênio, cujo grande benefício é aumentar a receptividade uterina ao blastocisto, porém determinadas substâncias podem acarretar um efeito danoso sobre esse mecanismo. Tanto os agentes que atingem a ação desses hormônios quanto aqueles que restringem a contratilidade do útero podem afetar a implantação adequada do blastocisto e resultar em malformações e embriofetalidade (Górniak; Gotardo, 2020).

É valioso ressaltar, ainda, que os efeitos tóxicos e possivelmente teratogênicos de um agente sobre a progênie estão profundamente relacionados com as propriedades físico-químicas da substância em questão. Tal porque a barreira placentária, que separa a circulação fetal da materna, é formada por uma membrana lipídica que permite a passagem de substâncias lipossolúveis e de baixo peso molecular (Górniak; Gotardo, 2020). Elas podem realizar essa travessia por difusão simples ou facilitada, pinocitose, endocitose, ultrafiltração e transporte ativo e

moléculas com mais de 1000 Da enfrentam extrema dificuldade (Stanisław; Artur; Marcin, 2009).

Nesse sentido, considerando-se que a molécula de BoNtA tem peso molecular de 150 kDa, a chance de que atravesse a membrana através dos mecanismos de transporte passivo citados é ínfima, exceto pelo transporte ativo, que não pode ser descartado (Dayan et al., 2018; Wong; Khalil; Ahmed, 2020). Em decorrência dessa possibilidade, a administração da BoNtA durante o período gestacional é contraindicada, uma vez que ainda há uma carência de estudos acerca desse cenário que elucidem os mecanismos fisiológicos e os potenciais riscos envolvidos (Pirazzini et al., 2017; FDA, 2021).

Em estudos toxicológicos, é considerado ideal que se estabeleça um grupo controle – em que não seja administrada a substância química a ser estudada, porém que passe pelas mesmas condições de manejo que os demais – e três doses experimentais, a fim de se avaliar a possibilidade de uma alteração dose-dependente causada pela substância (OECD, 2016). No atual estudo, as doses de 4, 8 ou 16 U/kg de BoNtA foram empregadas para os três grupos experimentais, aplicadas por via intramuscular no DG 5, e tanto as doses quanto a via de administração basearam-se naquelas do estudo realizado pelo laboratório Allergan, Inc. (2022) para avaliar os efeitos desta toxina administrada durante a gestação.

Desde a década de 1960, tem-se construído o conhecimento de que o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) é um polipeptídeo diretamente relacionado à proliferação de células epidérmicas, promovendo diferenciação e divisão celular na epiderme. Desta forma, está relacionado a importantes parâmetros de desenvolvimento físico, como o descolamento das orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos e abertura dos olhos (Cohen, 1986; Gerenutti et al., 2008; Zaccarelli-Magalhães et al., 2020). Quanto a este último parâmetro, não apenas fatores de crescimento, mas também agentes hormonais contribuem para a coordenação e controle temporal dos eventos relacionados ao desenvolvimento morfológico e funcional do aparato visual (Pinazo-Durán et al., 2011). Neste caso, a ação dos hormônios tireoidianos é fundamental, pois eles estimulam determinadas células diretamente relacionadas à formação da neuroretina, órbita ocular, pálpebras e estruturas nasolacrimais (Barkur; Bairy, 2016).

Também foram avaliados os parâmetros de maturação sexual dos animais, através da descida de testículos, na prole masculina, e da abertura vaginal, na prole feminina. Ao atingir a puberdade, em ambos os sexos, há um mecanismo de *feedback* negativo (retroalimentação negativa), em que os baixos níveis circulantes do hormônio esteroide gonadal – testosterona, nos machos, e estrogênio e progesterona, nas fêmeas – estimulam o hipotálamo a secretar o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), que provoca a liberação de Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) pela adenohipófise, que provocam a liberação dos hormônios gonadais (Jeje; Raji, 2017; Gotardo, 2020; Chen et al., 2022).

Em machos, a puberdade se inicia com uma alteração sensitiva nesse mecanismo de *feedback* negativo, havendo um aumento no nível de gonadotrofinas e, conseqüentemente, aumento da secreção de testosterona pelas células de Leydig nas gônadas até que, posteriormente, um novo estado de equilíbrio seja atingido. Em decorrência desse aumento nos níveis de testosterona, ocorre a descida dos testículos para o escroto. Assim, efeitos adversos neste parâmetro pode ser um indicativo de uma alteração pós-natal no eixo hipotálamo-hipófise-testicular (Moraes et al., 2004; Gotardo, 2020). O cuidado materno com a prole masculina também pode ser um fator determinante, uma vez que a lambedura que a genitora realiza na genitália dos descendentes durante a lactação também estimula essa liberação de testosterona (Zaccarelli-Magalhães et al., 2020).

As fêmeas, por sua vez, têm um aporte natural de GnRH através do leite materno, que é transferido para a corrente sanguínea do neonato durante a lactação, suprimindo a atividade hipotalâmica natural de liberação deste hormônio através de um mecanismo de *feedback* negativo. No entanto, após a erupção dos dentes incisivos, quando a prole começa a se alimentar por conta própria, os eventos de amamentação tornam-se mais raros, e o aporte de GnRH é reduzido. Tal evento estimula – também por retroalimentação negativa – o hipotálamo a produzir esse hormônio, permitindo o desenvolvimento ovariano (Grosvenor; Picciano; Baumrucker, 1993; Zaccarelli-Magalhães et al., 2020). Em seguida, em decorrência da produção de estrogênio pelos ovários, ocorre a canalização da vagina, também denominada abertura vaginal, que consiste na apoptose das células epiteliais deste órgão (Zaccarelli-Magalhães et al., 2020).

Em estudos toxicológicos, ainda, é de notável relevância avaliar o andamento da adaptação dos neonatos à vida extrauterina, pois quaisquer alterações neste âmbito podem acarretar prejuízos neurocomportamentais na vida adulta. É possível realizar tal avaliação através da ontogenia dos reflexos do animal, pois estes se constituem como indicativos dessa adaptação e, caso sofram atrasos, podem apontar para distúrbios neurológicos (Khalki et al., 2012). Logo, avaliou-se nesse estudo o desenvolvimento reflexológico da prole através dos parâmetros de geotaxia negativa, endireitamento postural, preensão palmar e sobressalto. Os dois primeiros foram utilizados para analisar o desenvolvimento do controle postural dos animais.

O reflexo de endireitamento mostra-se presente no animal entre os DPN 1 e 3 (Zaccarelli-Magalhães et al., 2020) e indica a maturação inicial das estruturas subcorticais (Machado et al., 2023), bem como a integridade das funções vestibular e cerebelar e da atividade neuromuscular que permite o desenvolvimento motor (Pometlová et al., 2009; Barkur; Bairy, 2016). Um atraso nesse reflexo poderia ser um sinal de atraso no processo de mielinização neuronal do neonato (Sandini et al., 2014). O reflexo de geotaxia negativa, por sua vez, desenvolve-se após o estabelecimento do endireitamento postural, entre os DPN 6 e 8 (Zaccarelli-Magalhães et al., 2020). Esse parâmetro do desenvolvimento também depende da integridade dos sistemas cerebelar e vestibular, responsáveis pela manutenção do equilíbrio e detecção da orientação da cabeça (Guyton; Hall, 2011; Udo et al., 2014). Dessa forma, atrasos no aparecimento desse reflexo podem indicar alterações na maturação do cerebelo e demais estruturas do sistema nervoso central relacionadas à função motora (Dorce et al., 2009). Similarmente, a manifestação do andar adulto nos filhotes de roedores ocorre em decorrência do desenvolvimento neuromotor, sendo diretamente influenciado pelo sistema vestibular (Pinto; Souza; Ko, 2015; Sandini et al., 2014).

O reflexo de preensão palmar está presente desde o nascimento e, à medida que emerge o uso voluntário das patas anteriores, é naturalmente extinto (Udo et al., 2014). Trata-se de um reflexo mediado na medula espinal, o que indica que o cérebro ainda imaturo não exerce controle o suficiente sobre tal mecanismo. Contudo, ao passo que progride a maturação cerebral, ocorre um aumento do controle do circuito espinal pelas áreas motoras não-primárias, resultando em um ato de preensão voluntário e com maior controle adaptativo e regulatório (Futagi; Toribe; Suzuki, 2012). Dessa maneira, tal parâmetro é comumente utilizado para a detecção de alterações

no neurodesenvolvimento do neonato, considerando-se uma anormalidade quando o reflexo se apresenta de forma reduzida ou ausente na fase em que se espera que esteja ativa ou, então, se mostra ativo por mais tempo do que seria o típico (Udo et al., 2014). O reflexo de sobressalto revela a abertura do ducto auditivo, permitindo o início da percepção de som pelos animais (Zaccarelli-Magalhães et al., 2020). Tal indicativo do desenvolvimento do sistema auditivo resulta da estimulação do complexo dos núcleos cocleares e da ativação do sistema vestibular e/ou trigêmeo (Sandini et al., 2014).

No presente estudo, foram avaliados os parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas Wistar expostas a diferentes doses de BoNtA no período gestacional (DG 5) e não foram observadas diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos experimentais, em nenhum destes parâmetros avaliados. Desse modo, é possível inferir que a administração de BoNtA em suas genitoras durante o período intrauterino não prejudicou as vias metabólicas de produção do EGF, a via hipotálamo-hipófise-gônadas, nem o desenvolvimento do cerebelo, do sistema vestibular, ou do sistema nervoso central e periférico. Tais resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Allergan, Inc. (2022), que apresenta que a administração intramuscular de BoNtA em ratas gestantes uma única vez em três momentos do desenvolvimento fetal – anterior à implantação embrionária, durante a implantação e durante a organogênese – nas doses de 1, 4 ou 16 U/kg não culminou em efeitos adversos no desenvolvimento da prole.

Outro parâmetro do desenvolvimento físico avaliado foi o ganho de peso da prole. Em um estudo experimental realizado por Allergan, Inc. (2022), apresentou-se que a administração intramuscular de BoNtA em ratas prenhes duas vezes durante a organogênese fetal (DGs 5 e 13), nas doses de 4, 8 ou 16 U/kg, provocou a redução do peso corporal e da ossificação esquelética da prole nestas duas doses mais altas. Mais um estudo do mesmo laboratório evidenciou que a administração de BoNtA em ratas gestantes, também por via intramuscular, nas doses de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 4 ou 8 U/kg, diariamente durante o período de organogênese (totalizando 12 doses), produziu os mesmos resultados nas duas doses mais altas (Allergan, Inc., 2022).

Na investigação atual, observou-se uma redução significativa no ganho de massa corporal nos descendentes machos das mães tratadas com a dose intermediária (BoNtA-8U) em relação aos animais do grupo controle, na terceira

semana de vida. Desta forma, os resultados obtidos quanto ao ganho de peso estão condizentes com os de Allergan, Inc. (2022) nesses dois estudos supracitados, uma vez que ambos exibiram uma aparente relação entre a dose de 8 U/kg de BoNtA e a diminuição do peso corporal da prole. Concordantemente, a bula do Botulim® (2023) reitera tal relação.

É possível afirmar, ainda, que os resultados obtidos no presente experimento evidenciam um efeito sexualmente dimórfico, uma vez que tal redução ocorreu apenas nos filhotes machos. A razão fisiológica para tal achado é desconhecida, porém pode ter relação com os genes ligados aos cromossomos X e Y. Isto porque, tendo em vista que a placenta é formada por células maternas e células trofoblásticas fetais, a placenta de filhotes fêmea, geralmente, possui maior expressão gênica para determinadas enzimas que são fundamentais para o metabolismo placentário. Esta diferença pode explicar por que machos apresentam uma maior suscetibilidade à exposição pré-natal a agentes tóxicos capazes de gerar déficits metabólicos, comportamentais ou cognitivos (Górniak; Gotardo, 2020).

A marcha fisiológica do animal é mais um aspecto que pode dar indícios do desenvolvimento neuromotor, uma vez que sua elaboração depende da integridade tanto neurológica (sistemas proprioceptivos centrais e periféricos, aferências e eferências cerebelares, sistema piramidal e nervos e raízes periféricos) quanto ortopédica (tendões, ligamentos, articulações e musculatura estriada esquelética) (Pinto; Souza; Ko, 2015). Sua análise torna-se relevante para o presente trabalho pois este é um método capaz de fornecer dados quantificáveis sobre a maneira como o movimento de um animal pode ser impactado por doenças, lesões ou exposição a drogas (Wertman et al., 2019).

Anormalidades no padrão da marcha podem ser indicativos de alterações morfológicas e funcionais no cerebelo, incluindo aquelas induzidas por danos à via dopaminérgica nigroestriatal, a qual está intimamente relacionada ao controle da atividade motora (Yamamoto et al., 2019). O corpo estriado é a porção cerebral final da via nigroestriatal e participa do controle de movimentos voluntários, como a marcha, através da interação com áreas do córtex motor, e a interrupção deste sistema pode resultar em perturbações na caminhada (Hikosaka; Takikawa; Kawagoe, 2000; Hull; Rodríguez-Manzo, 2017).

O padrão de caminhada dos roedores costuma ser simétrico, logo, quaisquer aumentos ou reduções nos aspectos investigados podem revelar a ocorrência de perda de equilíbrio com consequentes mecanismos compensatórios na caminhada (Pantaleon et al., 2023). Sabe-se, ainda, que os parâmetros de comprimento da passada e comprimento do passo estão profundamente relacionados à velocidade da caminhada e uma redução no comprimento da passada caracteriza-se como uma evidência de lentidão, denominada hipocinesia da marcha, que pode apontar para disfunções nos gânglios da base (Yamamoto et al., 2019; Fernagut et al., 2002).

O teste de campo aberto foi desenvolvido em 1934 com o intuito inicial de mensurar a emocionalidade em roedores frente a um novo ambiente, porém atualmente é amplamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora e de comportamentos exploratórios (Seibenhener; Wooten, 2015). Isto porque diversos estudos acerca do comportamento exploratório evidenciam que, ao explorar novos ambientes, os roedores – assim como diversos outros animais – estão se expondo ao risco de serem predados, porém, concomitantemente, têm o possível benefício de encontrar alimento ou abrigo (Klejbor; Ludkiewicz; Turlejski, 2013). Sabe-se que a busca pelo desconhecido é um fator que tende a provocar um aumento na locomoção, ao passo que a exposição à maior luminosidade tende a causar sua diminuição, por ser um estímulo estressor (Miller et al., 2021).

A frequência de levantar, por sua vez, é interpretada como uma medida de atenção não seletiva do animal, utilizada para avaliação de risco e mapeamento do local desconhecido (Aspide et al., 1998). Esse parâmetro tem sido correlacionado positivamente à atividade colinérgica no hipocampo e dopaminérgica nas regiões ventral e dorsal do corpo estriado (Pawlak; Schwarting, 2002). O *grooming* é um comportamento inato desses animais que, frente a situações de estresse, tende a sofrer um aumento, sendo amplamente utilizado como um meio de detectar comportamentos tipo-ansiosos (Nin et al., 2012). O parâmetro de locomoção – sendo a imobilidade interpretada como seu antagonista –, além de ser utilizado como uma medida do progresso da atividade exploratória, tal como os parâmetros supracitados, é utilizado para a realização de inferências acerca do desenvolvimento neuromuscular dos animais e das possíveis alterações causadas por drogas, fatores estressores, idade ou ciclo circadiano (Zhang; Li; Han, 2020).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos experimentais, em nenhum dos parâmetros avaliados, tanto na marcha fisiológica quanto nos comportamentos locomotores e exploratórios da prole de ratas Wistar expostas a diferentes doses de BoNtA no período gestacional (DG 5). Tais dados evidenciam que a exposição das genitoras a diferentes doses de BoNtA durante a vida intrauterina de sua prole não provocou efeitos adversos sobre o desenvolvimento neuromotor dos filhotes, permitindo sua integridade neurológica e ortopédica e não prejudicou o progresso de seus comportamentos locomotores e exploratórios.

6 CONCLUSÃO

A exposição de ratas Wistar a diferentes doses de toxina botulínica tipo A no período gestacional (DG 5):

- Provocou redução significativa no ganho de peso da prole masculina das mães tratadas com a dose intermediária (8 U/kg) na terceira semana de vida;
- Não provocou efeitos adversos no desenvolvimento físico da prole;
- Não provocou efeitos adversos no desenvolvimento reflexológico da prole;
- Não causou alterações na marcha fisiológica da prole, na infância e na idade adulta;
- Não causou alterações na atividade motora, locomotora e exploratória da prole, na infância e na idade adulta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, G. R. **Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratos lactantes**: Avaliação das implicações na prole. 2020. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.
- ALLERGAN, INC. **(Botulinum Toxin Type A) Purified Neurotoxin complex**. [S.l.]: 2004. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/103000s5050lbl.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- ALLERGAN, INC. **BOTOX® (onabotulinumtoxinA) for injection, for intramuscular, intradetrusor, or intradermal use**. [S.l.]: 2022. Disponível em: <https://www.rxabbvie.com/pdf/botox_pi.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- AOKI, K. R. Botulinum Toxin: A Successful Therapeutic Protein. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 3085-3092, 2004.
- AOKI, K. R. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. **Journal of Neurology**, v. 248, Supl. 1, p. I3-I10, 2001.
- APOSTOLIDIS, A. et al. Recommendations on the Use of Botulinum Toxin in the Treatment of Lower Urinary Tract Disorders and Pelvic Floor Dysfunctions: A European Consensus Report. **European Urology**, v. 55, n. 1, p. 100-120, 2009.
- ASPIDE, R. et al. Non-selective attention and nitric oxide in putative animal models of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 95, n. 1, p. 123–133, 1998.
- AZAM, A. et al. Botox Therapy in Dentistry: A Review. **Journal of International Oral Health: JIOH**, v. 7, Supl. 2, p. 103-105, 2015.
- BARKUR, R. R.; BAIRY, L. K. Comparison of the developmental milestones and preweaning neurobehavioral parameters in rat pups exposed to lead (Pb) during gestation, lactation and pregestation period. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 248-255, 2016.
- BARROS, S. M. O. et al. Fármacos no ciclo gravídico-puerperal. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 1, n. 1, p. 18-21, 1988.
- BLASI, J. et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. **Nature**, v. 365, p. 160-163, 1993.
- BOTULIM®. **Modelo de Bula Profissional de Saúde – RDC 47/09**. Chuncheon: Hugel, Inc. 2023. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?numeroRegistro=116370143>>. Acesso em: 07 set. 2023.
- BROLIO, M. P. et al. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 222-232, 2010.
- CERESER, N. D. et al. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 280-287, 2008.

- CHEN, Z. et al. Exogenous Melatonin Regulates Puberty and the Hypothalamic GnRH-GnIH System in Female Mice. **Brain Sciences**, v. 12, n. 11, p. 1550–1550, 2022.
- COHEN, S. Epidermal growth factor. **Bioscience Reports**, v. 6, n. 12, p. 1017–1028, 1986. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/cohen-lecture.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2023.
- COLHADO, O. C. G.; BOEING, M.; ORTEGA, L. B. Toxina Botulínica no Tratamento da Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 59, n. 3, p. 366-381, 2009.
- DAYAN, S. H. et al. Complications of Botulinum Toxin A: A Comprehensive Review. **Scholarly Journal of Otolaryngology**, v. 1, n. 1, p. 13-20, 2018.
- DESESSO, J. M. et al. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 185-210, 2012.
- DORCE, A. L. C. et al. Effects of prenatal exposure to Tityus bahiensis scorpion venom on rat offspring development. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 365-370, 2009.
- FERNAGUT, P. O. et al. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 113, n. 2, p. 123–130, 2002.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **MEDICATION GUIDE BOTOX®**: BOTOX ® Cosmetic (Boe-tox) (onabotulinumtoxinA) for Injection. 2016. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/77359/download>>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **MEDICATION GUIDE BOTOX®**: BOTOX ® Cosmetic (Boe-tox) (onabotulinumtoxinA) for injection, for intramuscular, intradetrusor, or intradermal use. 2021. Disponível em: <https://www.rxabbvie.com/pdf/botox_medguide.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- FUTAGI, Y.; TORIBE, Y.; SUZUKI, Y. The Grasp Reflex and Moro Reflex in Infants: Hierarchy of Primitive Reflex Responses. **International Journal of Pediatrics**, v. 2012, n. 1, p. 1–10, 2012.
- GERENUTTI, M. et al. The effect of Cecropia glazioui SNETHLAGE on the physical and neurobehavioral development of rats. **Die Pharmazie**, v. 63, n. 5, p. 398–404, 2008. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2008/00000063/00000005/art00015?crawler=true>>. Acesso em: 11 out. 2023.
- GÓRNIAC, S. L.; GOTARDO, A. T. Toxicologia do desenvolvimento. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2 ed. Barueri: Manole, 2020.
- GOTARDO, A. T. Toxicologia da reprodução. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2 ed. Barueri: Manole, 2020.
- GROSVENOR, C. E.; PICCIANO, M. F.; BAUMRUCKER, C. R. Hormones and growth factors in milk. **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 6, p. 710–728, 1 dez. 1993.

GUDMUNDSSON, S.; DUBIEL, M.; SLADKEVICIUS, P. Placental Morphologic and Functional Imaging in High-Risk Pregnancies. **Seminars in Perinatology**, v. 33, n. 4, p. 270-280, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Disponível em: <<https://cssjd.org.br/imagens/editor/files/2019/Abril/Tratado%20de%20Fisiologia%20M%C3%A9dica.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2023.

HIKOSAKA, O.; TAKIKAWA, Y.; KAWAGOE, R. Role of the Basal Ganglia in the Control of Purposive Saccadic Eye Movements. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 953–978, 2000.

HUGHES, B. W.; KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & Nerve**, v. 33, n. 4, p. 445-461, 2006.

HULL, E. M.; RODRÍGUEZ-MANZO, G. Male Sexual Behavior. In: PFAFF, D. W.; JOËLS, M. (editores). **Hormones, Brain and Behavior**. 3 ed. Oxford: Academic Press, 2017. p. 1-57.

JACOBS, B. Y.; KLOEFKORN, H. E.; ALLEN, K. D. Gait Analysis Methods for Rodent Models of Osteoarthritis. **Current Pain and Headache Reports**, v. 18, n. 10, 2014.

JEJE, S. O.; RAJI, Y. Maternal treatment with dexamethasone during gestation alters sexual development markers in the F1 and F2 male offspring of Wistar rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 1, p. 101–112, 2017.

KHALKI, H. et al. Prenatal exposure to tobacco extract containing nicotinic alkaloids produces morphological and behavioral changes in newborn rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 342–347, 2012.

KLEJBOR, I.; LUDKIEWICZ, B.; TURLEJSKI, K. Effect of light-dark changes on the locomotor activity in open field in adult rats and opossums. **Folia Morphologica**, v. 72, n. 4, p. 300–305, 2013.

MACHADO, D. N. et al. Bumetanide Attenuates Cognitive Deficits and Brain Damage in Rats Subjected to Hypoxia-Ischemia at Two Time Points of the Early Postnatal Period. **Neurotoxicity Research**, 2023.

MAGALHÃES, J. Z. et al. Prenatal exposure to fipronil disturbs maternal aggressive behavior in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 52, n. 1, p. 11–16, 2015.

MILLER, C. K. et al. Interactions of the estrous cycle, novelty, and light on female and male rat open field locomotor and anxiety-related behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 228, n. 1, p. 113203, 2021.

MORAES, A. P. et al. Maternal exposure to diphenhydramine during the fetal period in rats: effects on physical and neurobehavioral development and on neurochemical parameters. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 5, p. 681–692, 2004.

MORGAN, J.C. et al. Botulinum Toxin A During Pregnancy: A Survey of Treating Physicians. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 77, p. 117-119, 2006.

MÜNCHAU, A.; BHATIA, K. P. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 320, p. 161-165, 2000.

- NEPAL, M. R.; JEONG, T. C. Alternative Methods for Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 302-310, 2020.
- NEWMAN, W. J. et al. Botulinum toxin type A therapy during pregnancy. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 19, n. 11, p. 1384-1385, 2004.
- NIGAM, P. K.; NIGAM, A. Botulinum toxin. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 8-14, 2010.
- NIN, M. S. et al. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, n. 1-3, p. 95–101, 2012.
- OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Paris: **OECD Publishing**, 2016. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1693082268&id=id&accname=guest&checksum=428BA9DF93C115F406AB7BDCD97BCF42>>. Acesso em: 26 ago. 2023.
- PANTALEON, L. et al. Physiological gait test: an effective method for analyzing balance, locomotion, and neuromuscular disorders in rats and a comparison to the elevated beam test. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 60, 2023.
- PAWLAK, C. R.; SCHWARTING, R. K. W. Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 679–687, 2002.
- PEARCE, C. S. Can I treat this pregnant patient with botulinum toxin? **Practical Neurology**, v. 14, n. 1, p. 32-33, 2014.
- PELLETT, S.; YAKSH, T. L.; RAMACHANDRAN, R. Current Status and Future Directions of Botulinum Neurotoxins for Targeting Pain Processing. **Toxins**, v. 7, n. 11, p. 4519-4563, 2015.
- PINAZO-DURÁN, M. D. et al. Thyroid hormone deficiency disrupts rat eye neurodevelopment. **Brain Research**, v. 1392, n. 1, p. 16–26, 2011.
- PINTO, W.B.C.; SOUZA, P.V.S.; KO, G.M. Avaliação da marcha normal e patológica no camundongo. **Revista Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 3, n. 1, p. 45-51, 2015.
- PIRAZZINI, M. et al. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 200-235, 2017.
- POMETLOVÁ, M. et al. Cross-fostering effect on postnatal development of rat pups exposed to methamphetamine during gestation and preweaning periods. **International Journal of Development Neuroscience**, v. 27, n. 2, p. 149-155, 2009.
- ROBINSON, N. E. Transporte Fetal e Neonatal de Oxigênio. *In*: KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de fisiologia veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 543-548.

- SANDINI, T. M. et al. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 1, p. 53–63, 2014.
- SAUNDERS, C. Ajustes fisiológicos da gestação. *In*: ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E. M. A. **Nutrição em Obstetrícia e Pediatria**. 2 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan; 2009. p. 89-102.
- SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 123-127, 2002.
- SCHMIEG, N.; BERCSENYI, K.; SCHIAVO, G. Uptake and transport of clostridial neurotoxins. *In*: ALOUF, J.; LADANT, D.; POPOFF, M. R. **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. 4 ed. Amsterdã: Elsevier, 2015. p. 337-360.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 1, n. 96, 2015.
- SPINOSA, H. S.; FUKUSHIMA, A. R. Introdução à toxicologia veterinária. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2 ed. Barueri: Manole, 2020.
- SPOSITO, M. M. de M. Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 1, p. 25-37, 2009.
- SPOSITO, M. M. de M. Toxina botulínica tipo A: propriedades farmacológicas e uso clínico. **Acta Fisiátrica**, v. 11, Supl.1, p. S7-S44, 2004.
- STANISŁAW, W.; ARTUR, P.; MARCIN, K. Active and passive transport of drugs in the human placenta. **Ginekologia polska**, v. 80, n. 10, p. 772-777, 2009.
- SYME, M. R.; PAXTON, J. W.; KEELAN, J. A. Drug transfer and metabolism by the human placenta. **Clinical pharmacokinetics**, v. 43, n. 8, p. 487-514, 2004.
- UDO, M. S. B. et al. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 27-33, 2014.
- WERTMAN, V. et al. Low-Cost Gait Analysis for Behavioral Phenotyping of Mouse Models of Neuromuscular Disease. **Journal of Visualized Experiments**, n. 149, 18 jul. 2019.
- WONG, H.-T.; KHALIL, M.; AHMED, F. OnabotulinumtoxinA for chronic migraine during pregnancy: a real world experience on 45 patients. **The Journal of Headache and Pain**, v. 21, n. 129, 2020.
- YAMAMOTO, P. K. et al. Genetic and behavioral characterization of a Kmt2d mouse mutant, a new model for Kabuki Syndrome. **Genes, Brain and Behavior**, v. 18, n. 8, 2019.
- ZACCARELLI-MAGALHÃES, J. et al. Neurotoxicidade do nascimento à puberdade em roedores: revisão dos principais agentes tóxicos e suas implicações. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 10-63, 2020.
- ZHANG, C.; LI, H.; HAN, R. An open-source video tracking system for mouse locomotor activity analysis. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, 2020.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA UPM

Universidade Presbiteriana

Mackenzie**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais**

São Paulo, 07 de dezembro de 2021.

À Exma. Sra.

Profª. Drª. Esther Lopes Ricci Adari Camargo
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Após análise do projeto de pesquisa "**Possíveis efeitos comportamentais e fisiológicos da exposição de ratas à toxina botulínica A durante a gestação**", Processo CEUA/UPM Nº 016-12-2021, sob sua responsabilidade e de seus Orientandos *Leonardo Ribeiro de Paula, Guilherme Mendes Ribeiro, Mayara Rosseti Silva, Victor Hugo Rosa Romanato*, a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie informa, que os procedimentos se encontram de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2008, do Decreto nº 6.899/2009 e das Normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e **aprova** os procedimentos éticos do referido projeto.

Dados do projeto de pesquisa:**Vigência** - 01/2022 a 02/2023**Espécie/Linhagem** - Norvegicus/Wistar**Nº de animais** - 256**Peso** - 300 e 400 g**Idade** - 0 a 60 dias**Sexo** - Macho e fêmea**Origem dos animais** - Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Solicitamos, que após a conclusão do citado projeto, nos seja encaminhada uma cópia digital do Relatório Final, para finalizarmos o seu processo nesta Comissão.

Atenciosamente,

Profª. Dra. Vera de Moura Azevedo Farah
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA FMVZ-USP (continua)



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos comportamentais e neurofisiológicos da exposição de ratas à toxina botulínica A durante a gestação ou a lactação e possíveis implicações neurocomportamentais nas proles", protocolada sob o CEUA nº 8186301121 (ID 009255), sob a responsabilidade de **Helenice de Souza Spinosa e equipe; Lorena de Paula Pantaleon; Leonardo Ribeiro de Paula; Guilherme Mendes Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 10/03/2022.

We certify that the proposal "Study of behavioral and neurophysiological effects of exposure of female rats to botulinum toxin A during pregnancy or lactation and possible neurobehavioral effects on offspring", utilizing 745 Heterogenics rats (329 males and 416 females), protocol number CEUA 8186301121 (ID 009255), under the responsibility of **Helenice de Souza Spinosa and team; Lorena de Paula Pantaleon; Leonardo Ribeiro de Paula; Guilherme Mendes Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/10/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2022 a 11/2023** Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 60 a 90 dias N: 9
Linhagem:	Wistar			Peso: 300 a 400 g
Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 60 a 90 dias N: 96
Linhagem:	Wistar			Peso: 250 a 350 g
Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 2 a 65 dias N: 320
Linhagem:	Wistar			Peso: 2 a 300 g
Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 2 a 65 dias N: 320
Linhagem:	Wistar			Peso: 2 a 300 g

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia/ FMVZ USP - Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia (LADTOX)

São Paulo, 11 de março de 2022

**ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA FMVZ-USP
(continuação)**



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo