

LEONARDO RIBEIRO DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E DA ATIVIDADE MOTORA
E COGNITIVA DA PROLE DE RATAS EXPOSTAS DURANTE A GESTAÇÃO
A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO-A**

São Paulo

2024

LEONARDO RIBEIRO DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E DA ATIVIDADE MOTORA
E COGNITIVA DA PROLE DE RATAS EXPOSTAS DURANTE A GESTAÇÃO
A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO-A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Helenice de Souza Spinosa

Co-orientadora:
Dr^a. Esther Lopes Ricci

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Paula, Leonardo
AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E DATIVIDADE MOTORA E
COGNITIVA DA PROLE DE RATAS EXPOSTAS DURANTE A GESTAÇÃO A UMA
FORMULAÇÃO COMERCIAL DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO-A / Leonardo de
Paula ; orientador Helenice de Souza Spinosa ; coorientador Esther
Lopes Ricci.-- São Paulo, 2024.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada - Departamento de Patologia) - Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
Paulo, 2024.

1. Comportamento animal. 2. Memória. 3. Toxicologia perinatal.
4. Toxicologia do desenvolvimento. 5. Acetilcolina. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



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



Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna Camilla Mota

Mendes



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.

Prof^a. Dr^a. 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 **aprovou** 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,

Prof^a. Dra. Vera de Moura Azevedo Farah

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Presbiteriana

Mackenzie

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

São Paulo, 31 de janeiro de 2023.

À Exma. Sra.

Profa. Dra. Esther 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 lactação”, Processo CEUA/UPM Nº 07-11-2022, sob sua responsabilidade e dos pesquisadores Lorena de Paula Pantaleon, Guilherme Mender Ribeiro, Leonardo Ribeiro de Paula e dos alunos Maria Luiza Éboli Silvestre, Mayara Rosseti Silva e 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 **aprovou** os procedimentos éticos do referido projeto.

Dados do projeto de pesquisa:

Vigência – 15/01/2023 a 31/07/2024

Espécie/Linhagem - Rattus norvegicus

Nº de animais - 3 2 fêmeas (com as ninhadas) e 8 machos

Peso – 300-400 gramas

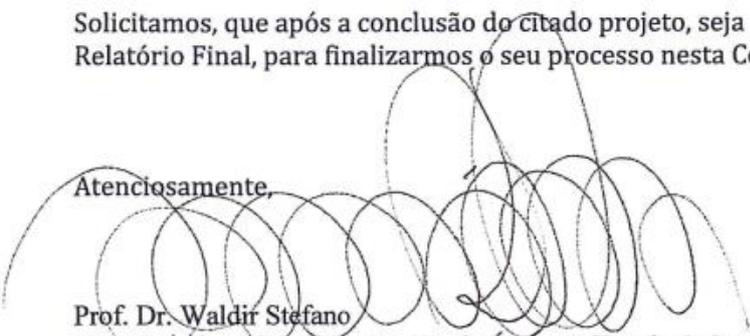
Idade – 60 dias

Sexo – Machos e fêmeas

Origem dos animais – Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP)

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

Atenciosamente,



Prof. Dr. Waldir Stefano

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DE-PAULA, Leonardo Ribeiro

Título: Avaliação do desenvolvimento físico e da atividade motora e cognitiva da prole de ratas expostas durante a gestação a uma formulação comercial de toxina botulínica tipo-A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia de Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os animais que tornaram este projeto possível, a ciência fará jus às vidas destes animais.

Agradeço a CAPES pela bolsa que possibilitou arcar com os custos de passagem e gasolina diariamente para ir ao laboratório executar os testes.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade Presbiteriana Mackenzie e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP por não medirem esforços para ajudar o grupo de pesquisa, de domingo a domingo sempre de prontidão.

Agradeço aos integrantes do grupo de pesquisa pelos momentos de diversão, tornando essa jornada menos pesada de seguir.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dra. Helenice de Souza Spinosa por todo o apoio, principalmente na reta final, não largou o osso e caminhou até o final comigo, foi uma honra ser orientado por uma pessoa deste porte, de suma importância na ciência.

Agradeço a todos os meus amigos por estarem lá comigo nos momentos em que eu pensei não dar conta, seguraram a barra.

Agradeço aos meus pais por todo apoio desde a escola, faculdade e mestrado, sem vocês eu jamais estaria aqui.

Por último, deixo o meu maior agradecimento para a minha esposa Mariana Bittencourt, agradeço por ser meu alicerce, estar lá para provar que eu era capaz nas vezes que mais achei que não conseguiria, por me segurar em todos os momentos ruins e me aplaudir em todas as minhas vitórias, por segurar a barra em casa nas semanas exaustivas de procedimentos cirúrgicos, me dando forças para suportar as eutanásias, por estar lá quando comecei em um emprego novo dividindo meu tempo entre trabalho e dissertação, ela sempre esteve lá. Essa vitória é nossa!

Obrigado a todos os envolvidos citados acima, essa conquista só foi possível com o apoio de cada um, essa foi por vocês e para vocês!

“Sic Parvis Magna”

Grandeza é para pequenos começos

RESUMO

DE-PAULA, L.R. Avaliação do desenvolvimento físico e da atividade motora e cognitiva da prole de ratas expostas durante a gestação a uma formulação comercial de toxina botulínica tipo-A

A Toxina botulínica tipo-A (TbA) tem sido cada vez mais uma opção eficaz de tratamento de doenças caracterizadas pela hiperfunção dos terminais colinérgicos, como é o caso do bruxismo, estrabismo, bexiga urinária hiperativa e também em diversos procedimentos estéticos. Porém, os efeitos da TbA ainda não são totalmente conhecidos e há escassez de estudos relacionados à segurança do seu uso durante a gestação, bem como os possíveis efeitos adversos que podem acometer o crescimento e desenvolvimento da prole. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento físico e as atividades motora e cognitiva das proles masculina e feminina, tanto na infância quanto na idade adulta, de ratas exposta no período gestacional à TbA. Para isso, ratas gestantes, receberam, no dia gestacional 5, dose única (4, 8 ou 16 U/kg) de TbA (Botulim[®], da Blau Farmacêutica S.A.), por via intramuscular, e foram analisados: o desenvolvimento físico (por meio do descolamento de orelha, do aparecimento de pelo, da erupção dos dentes incisivos, da abertura dos olhos, do andar adulto e da descida dos testículos ou da abertura vaginal); o desenvolvimento reflexológico (por meio da preensão palma, do endireitamento postural, da geotaxia negativa e do sobressalto); a atividade motora (avaliada no campo aberto e o teste da marcha); e a atividade cognitiva (por meio do labirinto de Barnes) da prole, tanto na infância quanto na idade adulta de ambos os sexos. Os resultados obtidos mostraram que a exposição gestacional de ratas à TbA não interferiu em nenhum dos parâmetros analisados do desenvolvimento físico e reflexológico, bem como nas atividades motora e cognitiva da prole avaliados durante a infância e na idade adulta. Esses achados somados a outros estudos perinatais podem contribuir para o uso mais seguro desse medicamento durante a gestação.

Palavras-chave: comportamento animal; memória; toxicologia perinatal; toxicologia do desenvolvimento; acetilcolina.

ABSTRACT

DE-PAULA, L.R. Evaluation of the physical development and study of motor and cognitive activity of the offspring of rats exposed during pregnancy to a commercial formulation of botulinum toxin type-A

The botulinum toxin type-A (bTA) has increasingly become an effective treatment option for diseases characterized by the hyperfunction of cholinergic terminals, such as bruxism, strabismus, overactive bladder, and various cosmetic procedures. However, the effects of bTA are not yet fully understood, and there is a scarcity of studies related to its safety during pregnancy, as well as the potential adverse effects that may affect the growth and development of offspring. Therefore, the present study aimed to investigate the physical development and motor and cognitive activities of male and female offspring, both in childhood and adulthood, of rats exposed to TbA during gestation. For this purpose, pregnant rats received a single dose (4, 8, or 16 U/kg) of bTA (Botulim®, from Blau Farmacêutica S.A.) intramuscularly on gestational day 5, and the following were analyzed: physical development (including ear detachment, hair appearance, incisor tooth eruption, eye opening, adult gait, and testicular descent or vaginal opening); reflexological development (including palmar grasp, postural straightening, negative geotaxis, and startle response); motor activity (evaluated in the open field and gait test); and cognitive activity (through the Barnes maze) of the offspring, both in childhood and adulthood of both sexes. The results obtained showed that gestational exposure of rats to bTA did not interfere with any of the analyzed parameters of physical and reflexological development, as well as motor and cognitive activities of the offspring assessed during childhood and adulthood. These findings, along with other perinatal studies, may contribute to the safer use of this medication during pregnancy.

Keywords: animal behavior; memory; perinatal toxicology; developmental toxicology; acetylcholine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação tridimensional da toxina botulínica tipo-A (TbA), à esquerda, e representação esquemática das duas cadeias peptídicas, à direita. A cadeia pesada possui domínios nomeados de acordo com a sua atividade específica (ligação e translocação). A cadeia leve é responsável pela quebra catalítica da proteína alvo. SS = ponte dissulfeto, HN = terminal N da cadeia pesada, HC = terminal C da cadeia pesada..... 17
- Figura 2- Liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular (A) e atuação dos diferentes tipos de toxina botulínica neste local (B). SNARE = Soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein-receptor. 19
- Figura 3 - Ilustração dos parâmetros analisados no desenvolvimento físico dos ratos entre o dia pós-natal (DPN) 2 e DPN45. A) animal no DPN2 com as orelhas ainda coladas; B) animal no DPN4 com as orelhas já descoladas; C) animal no DPN7 já com o aparecimento de pelos; D) animal no DPN10 com as gengivas rompidas pela erupção dos dentes incisivos inferiores; E) animal no DPN14 com as pálpebras ainda coladas; F) animal no DPN15 com a pálpebra já descolada. 26
- Figura 4 - Ilustração do rato apresentando o reflexo de preensão palmar..... 27
- Figura 5 - Ilustração do rato realizando um giro corporal saindo de decúbito dorsal para decúbito ventral. 28
- Figura 6 - Ilustração do rato realizando a virada de descendente para ascendente sobre a tela com inclinação de 45° (aparato de geotaxia negativa). 28
- Figura 7 - Ilustração do rato respondendo ao estímulo sonoro de um estalo, indicando abertura dos canais auditivos. 29
- Figura 8 - Ilustração da arena do campo aberto..... 30
- Figura 9 - Ilustração de um rato no interior do aparato utilizado para o teste da marcha. Note as pegadas das patas deixadas sobre o piso do aparato. 31
- Figura 10 - Parâmetros do teste da marcha avaliados em ratos: A) comprimento da passada (linhas vermelhas); B) comprimento do passo (linhas azuis); C) ângulo do passo (linhas verdes); D) área da passada (losango amarelo); E) distância entre os pés (linha magenta)..... 32
- Figura 11 - Labirinto de Barnes com ilustração indicando a posição das pistas visuais na direção da caixa de escape. 33
- Figura 12 - Delineamento experimental. 33
- Figura 13 – Ganho de peso de ratos, machos e fêmeas, nas três primeiras semanas de vida, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 35

Figura 14 - Parâmetros no desenvolvimento físico da prole masculina – descolamento de orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos, abertura de olhos, andar adulto e descida de testículos –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. 37

Figura 15 - Parâmetros no desenvolvimento físico da prole feminina – descolamento de orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos, abertura de olhos, andar adulto e abertura vaginal –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 38

Figura 16 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole masculina – preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 39

Figura 17 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole feminina – preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 40

Figura 18 - Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole masculina durante a infância (dia pós-natal 22 – DPN22), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. 41

Figura 19- Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole feminina, durante a infância (dia pós-natal 22 – DPN22), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. 42

Figura 20 – Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole masculina adulta (dia pós-natal 60 – DPN60), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. 43

Figura 21 — Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole feminina adulta (dia pós-natal 60 – DPN60), cujas mães foram expostas à toxina

botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. 44

Figura 22 - Parâmetros do teste da marcha, da prole masculina durante a infância (dia pós-natal 22 – DPN22), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. 46

Figura 23 - Parâmetros analisados no teste da marcha realizado por ratas fêmeas no DPN22 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 47

Figura 24 - Parâmetros analisados no teste da marcha realizado por ratos machos no DPN60 cujas - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 48

Figura 25- Parâmetros analisados no teste da marcha realizado por ratas fêmeas no DPN60 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 50

Figura 26 - Parâmetros analisados do labirinto de Barnes em ratos machos do DPN61 ao DPN 65 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 51

Figura 27 - Parâmetros analisados labirinto de Barnes em ratas fêmeas do DPN61 ao DPN 65 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo..... 52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Estrutura química da toxina botulinica tipo-A	16
1.2	Mecanismo de ação da toxina botulinica do tipo A	18
1.3	Toxina botulínica e estudos clínicos e pré-clínicos	20
1.4	Relação da toxina botulínica com a atividade motora e cognitiva	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Animais	24
3.2	Tratamento com Toxina botulínica tipo-A	24
3.3	Procedimentos	25
3.3.1	Acasalamento e diagnóstico de prenhez	25
3.3.2	Nascimento, sexagem e padronização da ninhada	25
3.3.3	Desenvolvimento físico	25
3.3.4	Desenvolvimento reflexológico	26
3.3.5	Campo aberto	29
3.3.6	Teste da marcha	30
3.3.7	Labirinto de Barnes	32
3.3.8	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	57
7	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

As toxinas botulínicas (Tb) são neurotoxinas produzidas pela bactéria Gram-positiva anaeróbia *Clostridium botulinum* e são consideradas as toxinas mais potentes conhecidas (POLI; LEBEDA, 2002; SPOSITO, 2009). Por um lado, sua alta toxicidade aliada a mecanismos de ação altamente específicos faz com que as toxinas possuam características únicas de alto nível de periculosidade, por outro lado, são frequentemente associadas à diversas utilidades na estética e, principalmente, em intervenções médicas (POLI; LEBEDA, 2002; SPOSITO, 2009).

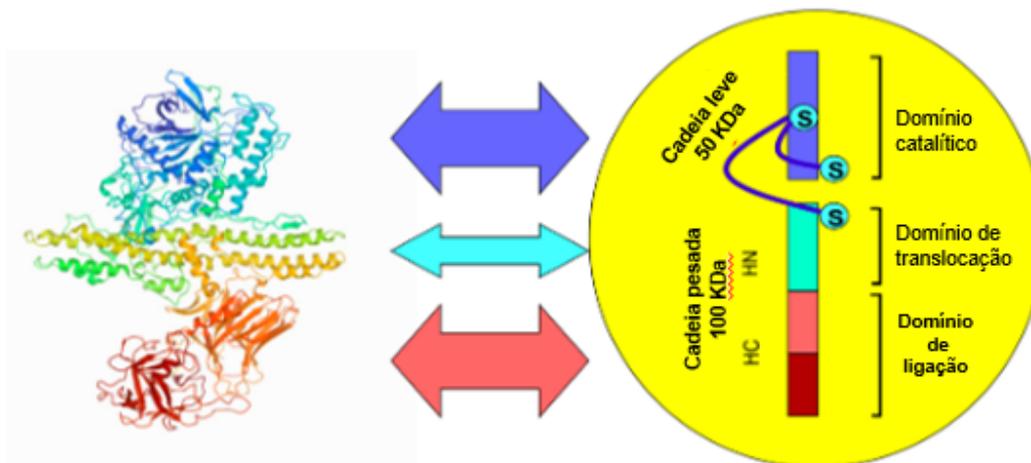
Existem sete sorotipos distintos das neurotoxinas botulínicas produzidas pelo *Clostridium botulinum*. Todos estes sorotipos interferem na transmissão neural, bloqueando a liberação de acetilcolina, o principal neurotransmissor na junção neuromuscular, por meio de sua atuação no citosol neuronal impedindo a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica e, portanto, a liberação de acetilcolina (ELEOPRA et al., 2002; MÜNCHAU; BHATIA, 2000). A toxina botulínica tipo-A (TbA) é aquela mais utilizada na prática clínica em seres humanos (JANKOVIC, 2004; SPOSITO, 2009).

1.1 Estrutura química da toxína botulinica tipo-A

A toxina botulínica tipo-A (TbA) é uma macromolécula que possui uma parte ativa de 150 KDa, sendo composta por duas porções: cadeia leve com atividade catalítica (50 KDa) e cadeia pesada (100 KDa) – Figura 1. A parte ativa da molécula da TbA é formada por uma única cadeia polipeptídica composta por 1.295 aminoácidos, com uma porção leve composta por 447 aminoácidos e por uma porção pesada composta pelos aminoácidos restantes (CHOUDHURY et al., 2021; POLI; LEBEDA, 2002).

A cadeia leve contém o domínio enzimático (CHOUDHURY et al., 2021; POULAIN; POPOFF; MOLGÓ, 2008:), enquanto a cadeia pesada apresenta dois domínios: o de ligação representado por Hc (metade C-terminal da cadeia pesada) e o de translocação representado por Hn (metade N-terminal da cadeia pesada) (AOKI, 2005; CHOUDHURY et al., 2021; HICKS et al., 2005;) representado na Figura 1.

Figura 1- Representação tridimensional da toxina botulínica tipo-A (TbA), à esquerda, e representação esquemática das duas cadeias peptídicas, à direita. A cadeia pesada possui domínios nomeados de acordo com a sua atividade específica (ligação e translocação). A cadeia leve é responsável pela quebra catalítica da proteína alvo. SS = ponte dissulfeto, HN = terminal N da cadeia pesada, HC = terminal C da cadeia pesada.



Fonte: adaptada de CHOUDHURY et al., 2021.

A porção de 50 KDa (cadeia leve) é a porção responsável pela atividade metaloproteásica zinco dependente que impede a liberação do neurotransmissor (acetilcolina), por meio do bloqueio da fusão das vesículas contendo o neurotransmissor com a membrana pré-sináptica. A porção de 100 KDa (cadeia pesada) possui duas porções: Hn (domínio de ligação) e Hc (domínio de translocação) (CHOUDHURY et al., 2021; POLI; LEBEDA, 2002;).

A porção Hn é uma estrutura helicoidal associada com a atividade de fusão vesícula com a membrana pré-sináptica e com a formação de canais iônicos seletivos transmembrânicos, voltagem dependentes (CHOUDHURY et al., 2021; POLI; LEBEDA, 2002). A porção Hc que é composta fundamentalmente de beta-proteína e visualmente apresenta dois domínios: (CHOUDHURY et al., 2021; POLI; LEBEDA, 2002): a) ligação acessório (Hc-N) e b) ligação a gangliosídeos e a proteínas sinápticas (Hc-C) (CHOUDHURY et al., 2021; POULAIN; POPOFF; MOLGÓ, 2008). Essas regiões (Hc-N e Hc-C) estão envolvidas com a ligação específica aos receptores neuronais existentes na superfície externa dos neurônios colinérgicos periféricos. Assim, a cadeia

pesada é responsável pela ligação aos receptores extracelulares e internalização na célula nervosa, além de ajudar a translocação da cadeia leve para o citoplasma do neurônio (CHOUDHURY et al., 2021; POLI; LEBEDA, 2002).

1.2 Mecanismo de ação da toxina botulínica do tipo A

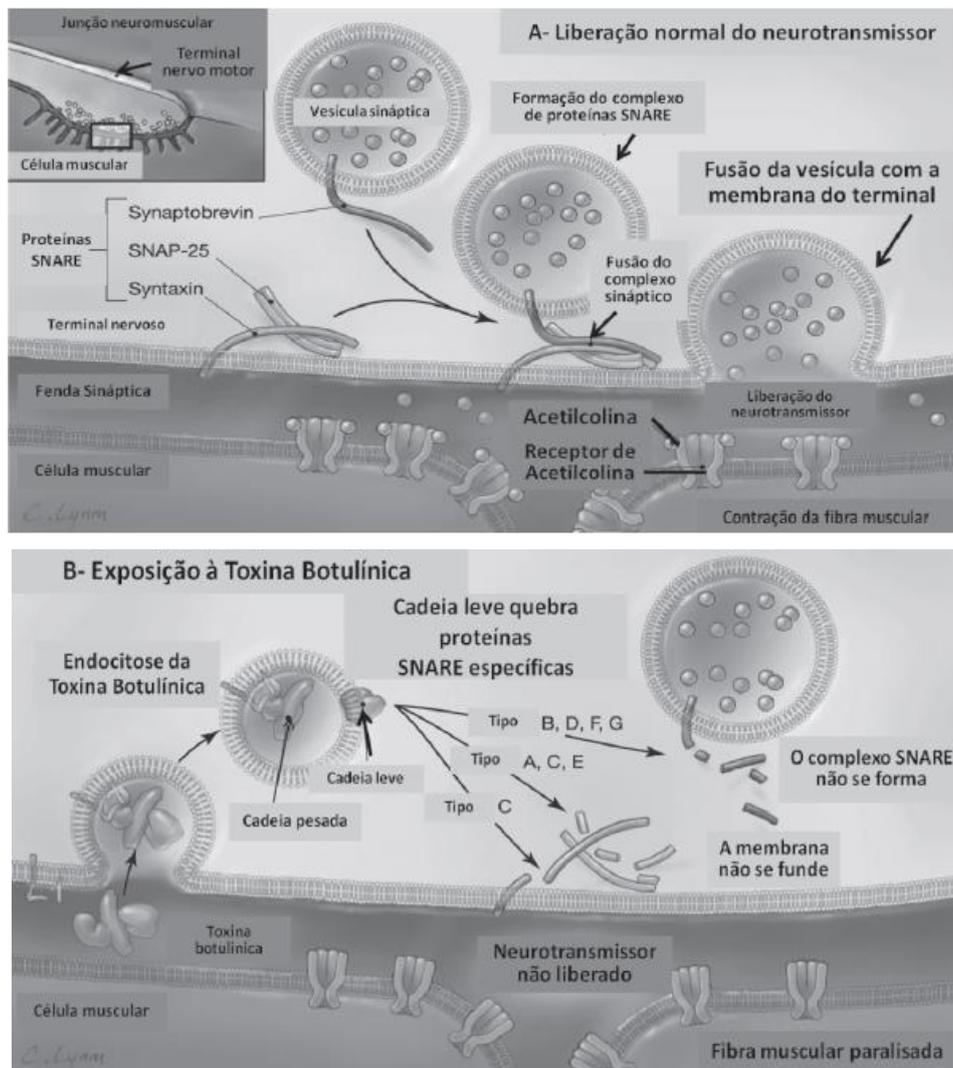
A TbA se liga a um receptor de alta afinidade, predominantemente, encontrado nos neurônios colinérgicos dos nervos motores através do domínio de ligação da cadeia pesada (AOKI, 2004; LIPHAM, 2004; SILBERSTEIN, 2004). Uma vez que a TbA se liga a célula neuronal, inicia-se o processo de internalização presumivelmente intermediado por um receptor de endocitose. Estes receptores estão localizados na porção amielínica da junção neuromuscular de mamíferos. Parecem existir duas fases de internalização: uma entrada rápida: que utiliza um sistema vesicular e outra sendo uma entrada lenta: que requer horas e é menos específica (AOKI, 2004).

A inibição da exocitose do neurotransmissor, acetilcolina, acontece através de uma atividade proteolítica zinco-dependente da cadeia leve, que quebra seletivamente as ligações peptídicas das proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein-receptor*) essencial para a liberação do neurotransmissor que é cálcio dependente (AOKI, 2004; LIPHAM, 2004; SILBERSTEIN, 2004). Assim, a cadeia leve exerce seu efeito quebrando as proteínas que são responsáveis pela fusão das vesículas de acetilcolina com a membrana celular do terminal nervoso (SPOSITO, 2009). Tanto o complexo SNARE, quanto as ligações peptídicas são específicas para cada sorotipo de toxina botulínica. A TbA quebra especificamente a SNAP-25 (AOKI, 2004; SPOSITO, 2009).

A Figura 2 ilustra o processo de liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular, levando a contração muscular, e atuação dos diferentes tipos de toxina botulínica neste local. Note a participação das proteínas SNARE em diferentes sítios intracelulares e os locais de atuação dos vários tipos de toxinas botulínicas. Observe que a quebra das proteínas SNARE, por si, não impedem a formação do complexo SNARE de fusão, mas resulta na formação de um complexo não funcional, no qual o influxo de cálcio, no momento da fusão, é interrompido (SPOSITO, 2009). O aumento da concentração de

cálcio no terminal sináptico reverte parcialmente o efeito da TB (TURTON; CHADDOCK; ACHARYA, 2002).

Figura 2- Liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular (A) e atuação dos diferentes tipos de toxina botulínica neste local (B). SNARE = Soluble N-ethylmaleimidesensitive factor



Fonte: (SPOSITO, 2009)

A junção neuromuscular que sofreu a ação da Tb, após aproximadamente dois meses, inicia a sua expansão por meio de brotamentos que se estendem através da superfície do músculo (SPOSITO, 2009) e quando os brotamentos formam uma conexão sináptica física com a junção neuromuscular, a unidade motora nervosa se restabelece (AOKI, 2004), recuperando a atividade excitatória e devolvendo à terminação nervosa sua forma original, completamente funcional (MAUNIER et al., 2002; PAIVA et al., 1999).

1.3 Toxina botulínica e estudos clínicos e pré-clínicos

A Tb foi a primeira proteína microbiana a ser utilizada por meio de injeção para o tratamento de doenças humanas (SCHANTZ; JOHNSON, 1992) e seu uso terapêutico teve seu início em 1981 com a descrição da administração de TbA nos músculos oculares para o tratamento do estrabismo. Em 1989, após muitos testes pré-clínicos e clínicos, a agência regulatória norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso terapêutico da formulação comercial BOTOX® (Allergan Inc) para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial. Em 2000, o FDA aprovou o BOTOX® e a toxina botulínica B (Myobloc™, Elan Pharmaceuticals Inc., Morristown, NJ, USA) para distonia e o BOTOX® Cosmetic para linhas faciais hiperkinéticas (JANKOVIC, 2004).

Apesar de a Tb ser uma substância biológica altamente tóxica, após a sua aplicação em um uso clínico, a função motora ainda pode ser recuperada, conforme comentado anteriormente. A duração da paralisia é dependente do sorotipo a que o indivíduo foi exposto, da dose, da espécie animal, do modo de administração e do tipo de terminal nervoso afetado (MÜNCHAU; BHATIA, 2000; PIRAZZINI et al., 2017).

Embora os efeitos clínicos da TbA tenham início dentro de 7 a 10 dias após a administração, com pico de ação em 15 dias, permanece no organismo entre 3 e 6 meses. O efeito da toxina é revertido principalmente por brotamento neuronal com reinervação muscular. A função muscular é restaurada dentro de dois a quatro meses (PEDRON, 2020; SALVONI et al., 2019). A meia-vida da Tb administrada por via intramuscular é de cerca de 10 horas, e 60% da sua excreção ocorre após 24 horas, pela via urinária com biotransformação por meio de proteases (AOKI, 1995).

A utilização terapêutica da TbA mostrou, por outro lado, que pode ser observado reações adversas, como sintomas autônomos: boca seca, diminuição da sudoração e do lacrimejamento, retenção urinária, diplopia e visão turva (DRESSLER; BENECKE, 2003). Em função destes achados, a Tb passou a ser utilizada em diferentes condições clínicas nas quais havia o envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), causando hiperatividade de musculatura lisa, como: acalasia de esôfago, disfunção do esfíncter de Oddi, disfunção do

esfíncter anal, anismo, fissura anal, dissinergia do esfíncter urinário e hiperatividade detrusora, entre outras. Além disso, o efeito colateral observado sobre glândulas (sudoríparas, salivares e lacrimais) induziu o raciocínio clínico para a utilização em situações de hipersecreção como hiperidrose, sialorreia e hiperlacrimação (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005).

Em todas estas enfermidades, mas especialmente nos casos de hiperidrose e de hiperatividade detrusora, observou-se que o tempo de duração dos efeitos da aplicação de Tb era mais longo, 6 a 11 meses, em relação aos observados no tratamento de músculos estriados envolvidos nos distúrbios do movimento (APOSTOLIDIS; FOWLER, 2008).

Ressalte-se que os usos terapêutico e estético de Tb estão em constante crescimento, uma vez que doses baixas dessa substância são clinicamente eficazes no tratamento de diversos distúrbios neuromusculares caracterizados por hiperfunção de terminais colinérgicos e outras condições médicas, incluindo espasticidade muscular, estrabismo, bexiga urinária hiperativa, sudorese excessiva, enxaqueca, distonia cervical, acalasia e blefaroespasma (ANTONUCCI et al., 2008; NEPAL; JEONG, 2020; TAN et al., 2013).

Estudos farmacocinéticos da TbA, tanto pré-clínicos (em roedores e não roedores), como clínicos (em seres humanos) expostos às doses terapêuticas (seguidas de acordo com a bula do fabricante) pôde-se verificar que a distribuição sistêmica da substância é pequena; isso ocorre em decorrência da alta afinidade de ligação entre a toxina e os terminais colinérgicos nos neurônios pré-sinápticos (ALLERGAN, INC., 2021). Ainda nesse sentido, após a administração intramuscular, observou-se lenta difusão no músculo seguida de rápida biotransformação sistêmica e excreção urinária (WIEGAND; ERDMANN; WELLHONER, 1976).

Em estudos pré-clínicos realizados pelo fabricante do Botox[®], Allergan Inc, foram avaliados os efeitos da administração de TbA durante a gestação em roedores e coelhos, bem como o comprometimento fetal por meio de diversos protocolos. Nestes estudos foi constatado que duas administrações de Botox[®], por via IM, durante o período da organogênese, nas doses de 4, 8 e 16 U/Kg, promoveram, em fetos dos respectivos animais tratados, redução dos pesos corporais e da ossificação esqueléticas, além de toxicidade materna evidenciada por abortos, partos prematuros e morte materna (ALLERGAN, INC., 2021).

Estes achados, somado ao fato de que há poucos estudos realizados sobre esse tema, fez com que o Botox® fosse contraindicado na gravidez, durante a amamentação e para crianças com menos de 12 anos. Caso crianças sejam expostas a toxina botulínica, por indicação médica ou não, deve haver um monitoramento cuidadoso, considerando que esta substância tem potencial para alterar funções celulares, como o crescimento axonal (MÜNCHAU; BHATIA, 2000; NEWMAN et al, 2005; PIRAZZINI et al., 2017).

1.4 Relação da toxina botulínica com a atividade motora e cognitiva

O clássico mecanismo de ação da TbA é a inibição da liberação de acetilcolina nos terminais nervosos motores (AOKI, 2004; SILBERSTEIN, 2004), o que leva à diminuição da contração muscular, tornando-a útil, terapêutica e clinicamente, em uma série de condições nas quais existe excesso de contrações musculares (AOKI, 2004; SPOSITO, 2009).

Além de possuir grande importância nas funções motoras, a acetilcolina desempenha papel fundamental nas funções cognitivas, particularmente, na aprendizagem e na memória, e estudos farmacológicos mostraram que uma disfunção colinérgica pode influenciar a memória alterando sua consolidação (HASSELMO, 2006; JAEGER, 2010).

Nesse sentido, Jaeger et al. (2013) ressaltaram a importância da acetilcolina no desempenho de diferentes funções cognitivas, como aprendizagem, memória e atenção, bem como mostraram o papel relevante desse neurotransmissor na modulação da memória de objetos, em camundongos, e sugerem que os níveis de liberação de acetilcolina modulam fortemente a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Considerando que a TbA vem sendo cada vez mais utilizada para o tratamento de distonias – isto é, alterações do movimento caracterizada por contrações musculares involuntárias, que acabam levando a movimentos e posturas anormais –, e que a literatura carece de estudos sobre o uso da Tb durante a gravidez, se faz necessário aprofundar os estudos sobre os possíveis efeitos na prole exposta a toxina durante o período gestacional e as possíveis consequências no seu desenvolvimento físico e reflexológico, bem como em comportamentos motores e cognitivos da prole na infância e na idade adulta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as proles masculina e feminina de ratas expostas durante a gestação à TbA, avaliando o desenvolvimento físico e reflexológico, bem como os comportamentos motores e cognitivos, na infância e na idade adulta.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar as proles masculina e feminina de ratas expostas durante a gestação à TbA, considerando o:

- Desenvolvimento físico;
- Desenvolvimento reflexológico;
- Campo aberto na infância e na idade adulta;
- Teste da marcha na infância e na idade adulta;
- Labirinto de Barnes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Esse estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo de número 8186301121) e da Universidade Presbiteriana Mackenzie (protocolo de número 016-12-2021).

Foram utilizados ratos Wistar provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. No presente estudo foram utilizadas as proles oriundas de 8 ratas prenhes.

Os animais foram alojados no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalha autoclavada, como substrato, e mantidas em sala com umidade relativa do ar de $55\% \pm 10\%$, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz acesa à 7 h). Os animais receberam água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Cada gaiola alojava uma rata e sua respectiva prole composta de 8 filhotes e, sempre que possível 4 machos e 4 fêmeas. A prole foi desmamada no 21º de lactação e transferidos para gaiolas-moradia, de acordo com gênero, com 4 animais cada.

3.2 Tratamento com Toxina botulínica tipo-A

Foi empregada a formulação comercial Botulim[®], comercializada no Brasil pela Blau Farmacêutica S.A. e fabricada pela Hugel Inc. Chuncheon, na Coreia do Sul. Cada frasco continha 100 unidades liofilizadas de toxina botulínica tipo-A (TbA), em forma de pó líofilo injetável.

Para aplicação intramuscular (IM), o frasco-ampola de TbA foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%), conforme orientação do fabricante, para administrar doses únicas de 4, 8 ou 16 U/kg, em volume inferior a 0,3 ml e aplicação com uma agulha 25G.

No dia gestacional 5 (DG5), as ratas foram separadas em 4 grupos iguais de 8 animais cada: 3 grupos experimentais e 1 grupo controle. As ratas dos grupos experimentais receberam dose única de 4, 8 ou 16 U/kg de TbA, por via IM (membro pélvico direito) em volume inferior a 0,3 ml de TbA; as ratas do grupo

controle receberam pela mesma via solução salina. Essas doses de TbA foram escolhidas baseadas em estudos prévios realizados em ratas e camundongas, que receberam duas aplicações durante a gestação (DG5 e DG13), as quais causaram redução no peso corporal fetal e diminuição da ossificação esquelética fetal nas duas doses mais altas, sendo que a menor dose não causou toxicidade de desenvolvimento (ALLERGAN, INC.; 2021). A via de administração intramuscular foi escolhida para atender as diretrizes da OECD, que recomenda o uso da via mais relevante para a exposição humana (OECD, 2018).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

As fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos ao fim da tarde para o acasalamento, na razão de três fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte foi feito o esfregaço vaginal das fêmeas para o diagnóstico de prenhez. Esse procedimento consiste na introdução de um *swab* umedecido com solução salina (NaCl 0,9%) no orifício vaginal da fêmea para coleta de material. O diagnóstico de prenhez é considerado positivo quando é detectada presença de espermatozoide após observação em microscopia.

3.3.2 Nascimento, sexagem e padronização da ninhada

As ratas gestantes foram observadas todos os dias para verificar o nascimento dos filhotes; o dia do nascimento foi considerado o dia pós-natal 1 (DPN1). No DPN2 foi realizada a sexagem e padronização do número de filhotes da ninhada para oito; sempre que possível foram deixados quatro fêmeas e quatro machos.

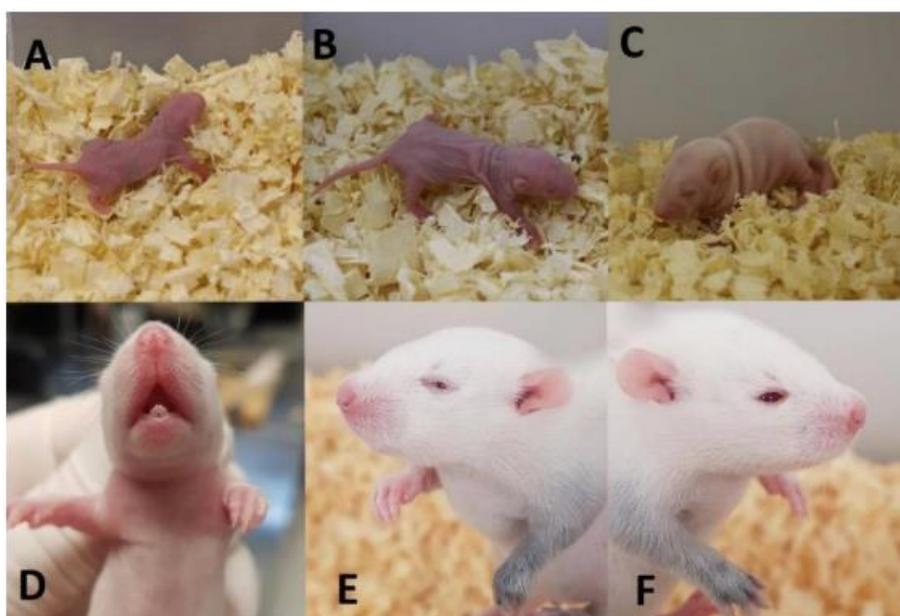
3.3.3 Desenvolvimento físico

Toda a prole dos 4 grupos (Controle, TbA-4U, TbA-8U e TbA-16U) foi pesada diariamente e foi calculado o ganho de peso semanal. Além da avaliação do ganho de peso semanal da prole, também foi avaliado, diariamente, durante toda a lactação (até o DPN21) o desenvolvimento físico da prole, conforme descrito por Udo et al. (2014), anotando o dia do aparecimento dos seguintes parâmetros:

- 1) descolamento de orelha - Figura 3A e 3B;

- 2) aparecimento de pelo - Figura 3C;
- 3) erupção dos dentes incisivos: considerou-se quando houve o rompimento da gengiva - Figura 3D;
- 4) abertura dos olhos: considerou-se o total descolamento das pálpebras de ambos os olhos - Figura 3E e 3F;
- 5) andar adulto: considerou-se quando o animal se sustentou sobre as quatro patas e caminhou sem tocar o ventre no solo;
- 6) descida dos testículos ou abertura vaginal.

Figura 3 - Ilustração dos parâmetros analisados no desenvolvimento físico dos ratos entre o dia pós-natal (DPN) 2 e DPN45. A) animal no DPN2 com as orelhas ainda coladas; B) animal no DPN4 com as orelhas já descoladas; C) animal no DPN7 já com o aparecimento de pelos; D) animal no DPN10 com as gengivas rompidas pela erupção dos dentes incisivos inferiores; E) animal no DPN14 com as pálpebras ainda coladas; F) animal no DPN15 com a pálpebra já descolada.



Fonte: Abreu (2020).

3.3.4 Desenvolvimento reflexológico

As proles de todos os 4 grupos (Controle, TbA-4U, TbA-8U e TbA-16U) foram avaliadas, diariamente, do DPN2 ao DPN21, conforme descrito por Udo et al. (2014), e foi anotado o dia de aparecimento dos seguintes parâmetros:

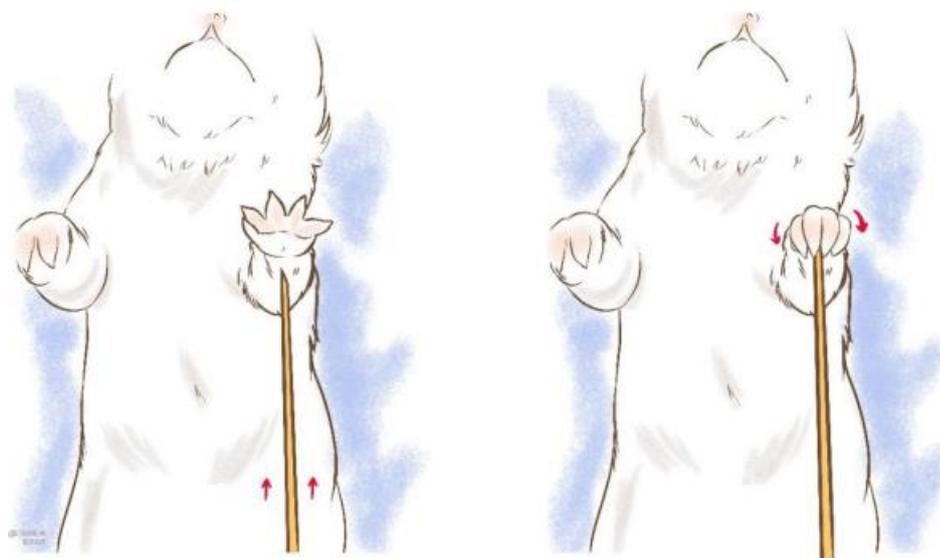
- 1) preensão palma: tocou-se com um clipe metálico o coxim plantar do membro torácico e o animal responde fechando a pata (único reflexo que desaparece ao longo do tempo) - Figura 11;

2) endireitamento postural: o animal foi colocado em decúbito dorsal para a observação da virada do corpo para a posição de decúbito ventral - Figura 13;

3) geotaxia negativa:- o animal foi colocado em uma tela com inclinação de 45° com a cabeça descendente (apontada para baixo) e foi observado se o animal girou para a posição ascendente (apontada para cima) - Figura 14;

4) sobressalto: foi observado se o animal apresentou algum tipo de reação física ao ser exposto à um estalo, indicando abertura do ducto auditivo - Figura 15

Figura 4 - Ilustração do rato apresentando o reflexo de preensão palmar.



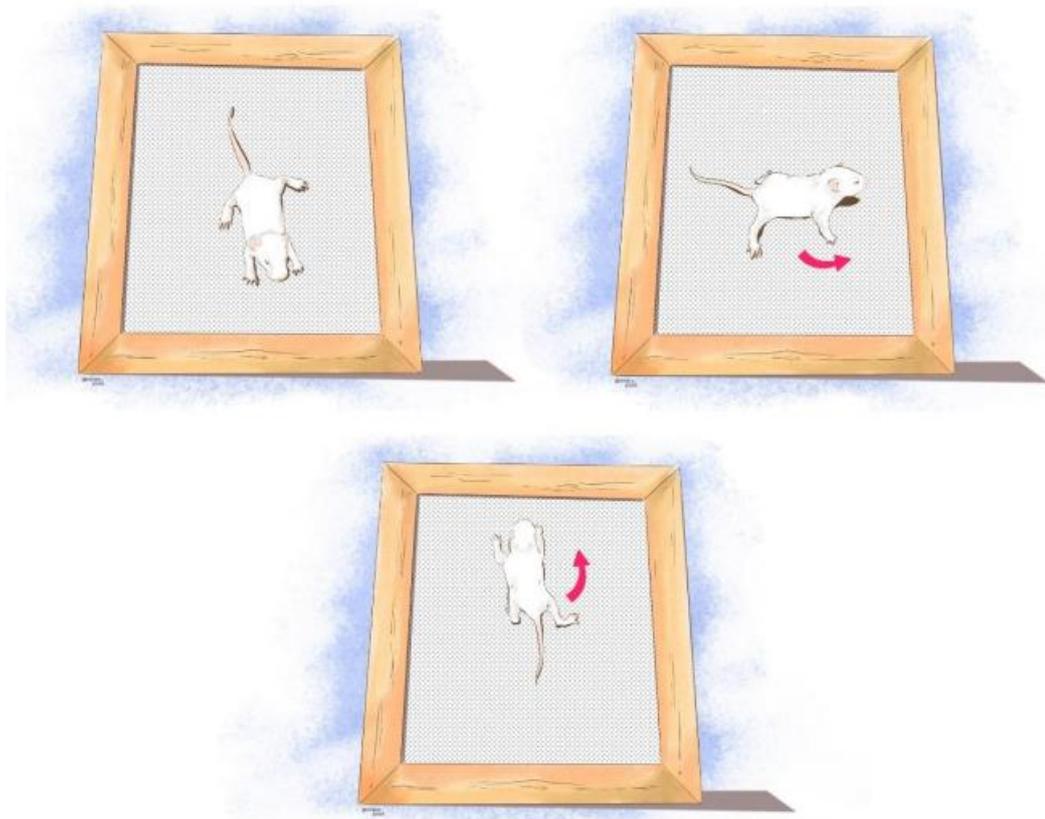
Fonte: Abreu (2020).

Figura 5 - Ilustração do rato realizando um giro corporal saindo de decúbito dorsal para decúbito ventral.



Fonte: Abreu (2020).

Figura 6 - Ilustração do rato realizando a virada de descendente para ascendente sobre a tela com inclinação de 45° (aparato de geotaxia negativa).



Fonte: Abreu (2020).

Figura 7 - Ilustração do rato respondendo ao estímulo sonoro de um estalo, indicando abertura dos canais auditivos.



Fonte: Abreu (2020).

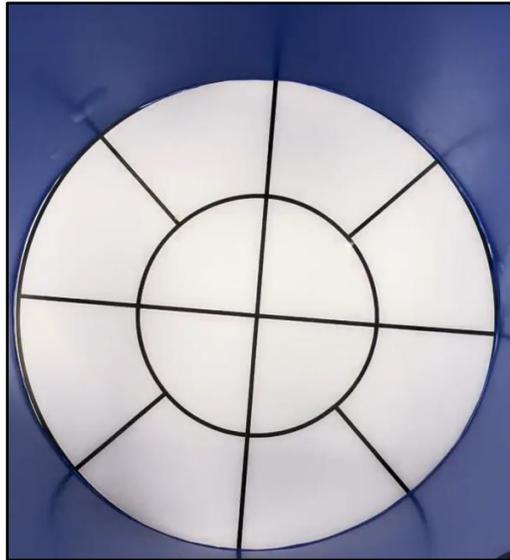
3.3.5 Campo aberto

A atividade motora dos animais foi avaliada por meio do teste do campo aberto, sempre durante o período da tarde, a partir das 13 h. O campo aberto consiste em uma arena circular (97 cm de diâmetro) delimitada por uma placa circular de acrílico envelopada de azul (28 cm de altura), e o chão branco de acrílico dividido em 12 partes aproximadamente iguais (Figura 16). Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e seu comportamento foi observado por 5 minutos. Entre um animal e outro o aparelho foi limpo com solução de álcool a 70% para evitar a interferência do odor do animal anterior. A observação comportamental foi feita intercalando animais dos grupos controle e experimentais.

Os parâmetros observados no campo aberto foram:

- Frequência de locomoção: uma unidade de locomoção foi considerada quando o animal adentrou com as quatro patas em um dos quadrantes delimitados no chão da arena;
- Frequência de levantar: postura do animal permanecer apoiado sobre os membros pélvicos, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com os membros torácicos as paredes do aparato;
- Imobilidade: tempo em segundos em que o animal ficou parado sem realizar qualquer atividade.
- Tempo de *grooming*: comportamento inato de autolimpeza.

Figura 8 - Ilustração da arena do campo aberto.

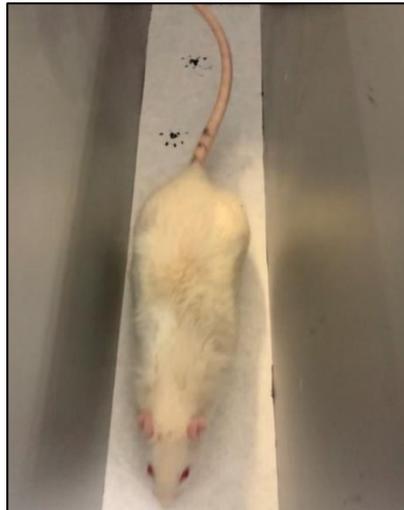


Fonte: Autoral.

3.3.6 Teste da marcha

Para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora foi empregado o teste de marcha, conforme proposto por Pinto et al. (2015). Para tanto foi utilizado um aparato que consiste em uma plataforma horizontal plana de 25 cm de comprimento e 5 cm de largura, sem elevação e forrada com papel de filtro, delimitada por 4 paredes de cm de altura (Figura 17). Os registros diretos da marcha do animal foram obtidos pelas marcas das patas do animal pintadas com tinta e deixadas sobre o papel de filtro. A duração de cada avaliação foi de 15 segundos.

Figura 9 - Ilustração de um rato no interior do aparato utilizado para o teste da marcha. Note as pegadas das patas deixadas sobre o piso do aparato.



Fonte: (PANTALEON, 2021).

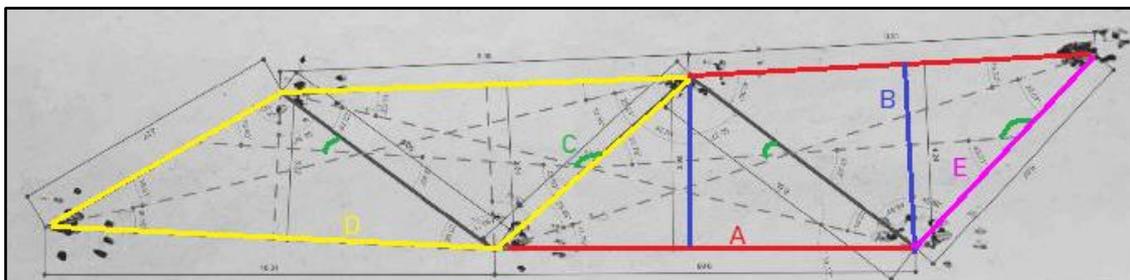
Para avaliar a marcha, cada animal, com os coxins plantares dos membros pélvicos pintados com tinta preta, foi colocado para caminhar no aparato. Ao término do teste de cada animal, o papel de filtro foi substituído e o aparato foi limpo com álcool 70%. Foram intercalados animais dos grupos controle e experimentais.

A partir das pegadas deixadas pelos coxins plantares, foi avaliado o comprimento da passada, conforme proposto por Jacobs et al. (2014) e Yamamoto et al. (2019) – a Figura 9. Assim, os seguintes parâmetros foram quantificados:

- Comprimento da passada (direito e esquerdo): consiste da distância entre duas pegadas da mesma pata (Figura 9-A);
- Comprimento do passo: largura entre os membros direito e esquerdo (Figura 9-B);
- Simetria (direito e esquerdo): comprimento do passo (Figura 9-B) dividido pelo comprimento da passada (Figura 9-A). Um passo simétrico deve ser igual a 0,5;
- Área da passada: área do trapézio formado a cada dois passos (Figura 9-D);
- Distância entre pés: distância entre os dois pés em um mesmo passo (Figura 9E).

A quantificação dos parâmetros foi feita com auxílio do software AutoCAD® para melhor padronização e exatidão das medidas.

Figura 10 - Parâmetros do teste da marcha avaliados em ratos: A) comprimento da passada (linhas vermelhas); B) comprimento do passo (linhas azuis); C) ângulo do passo (linhas verdes); D) área da passada (losango amarelo); E) distância entre os pés (linha magenta).



Fonte: (PANTALEON, 2021).

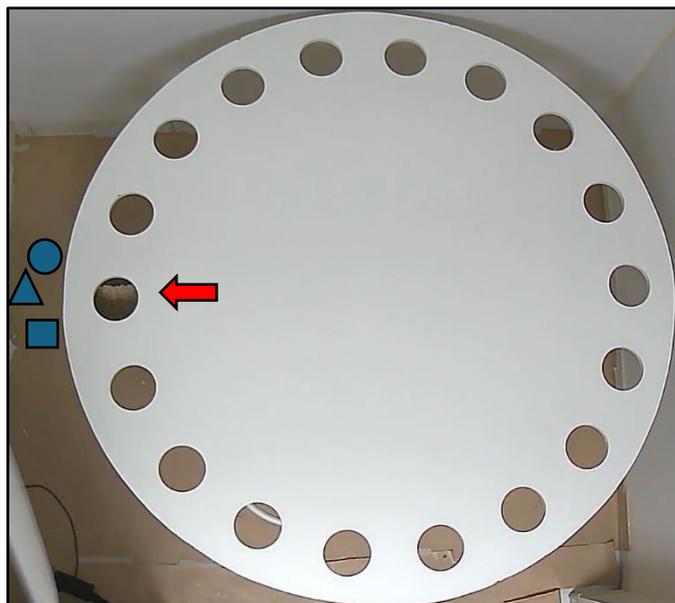
3.3.7 Labirinto de Barnes

O labirinto de Barnes é um teste utilizado para avaliar o aprendizado e a memória espacial, e foi realizado entre os DPN61 e DPN65. Ele consiste em uma plataforma circular de 120 cm de diâmetro elevada a 90 cm do chão; essa plataforma dispõe de 18 entradas com 9 cm de diâmetro cada, dispostos de forma equidistante por todo o perímetro do aparato (SANDINI et al., 2018). Uma das entradas está conectada a uma caixa de fuga contendo maravalha, como apontado pela seta vermelha (Figura 11), situada abaixo da plataforma. O dispositivo tem cor branca e foi colocado em uma sala com paredes brancas, onde três figuras geométricas azuis foram fixadas em uma das paredes, servindo como pistas visuais para o animal encontrar a caixa de fuga - Figura 11.

O teste envolveu posicionar o animal no centro do dispositivo, debaixo de uma caixa de plástico, durante 30 segundos. Após esse tempo, a caixa de plástico foi retirada e o comportamento do animal foi observado por 5 minutos, com a expectativa de que ele encontrasse a caixa de fuga. Nos casos em que o animal não entrou na caixa de fuga dentro dos 5 minutos propostos, ele foi gentilmente conduzido até lá e permaneceu por pelo menos 30 segundos, antes de retornar à sua gaiola moradia. Cada animal passou por quatro dias de treinamento seguidos por um dia de teste (quinto dia), utilizando o dispositivo tanto de manhã quanto à tarde, com um intervalo de 3 horas entre as sessões. Os parâmetros avaliados foram:

- 1) latência, em segundos, para entrar na caixa escape;
- 2) número de tentativas: número de aberturas que o rato farejou antes de entrar na caixa escape. Foi considerado uma tentativa toda vez que o animal farejou a abertura e não entrou, procurou uma nova abertura para farejar ou quando a sua única tentativa resultou na sua entrada.

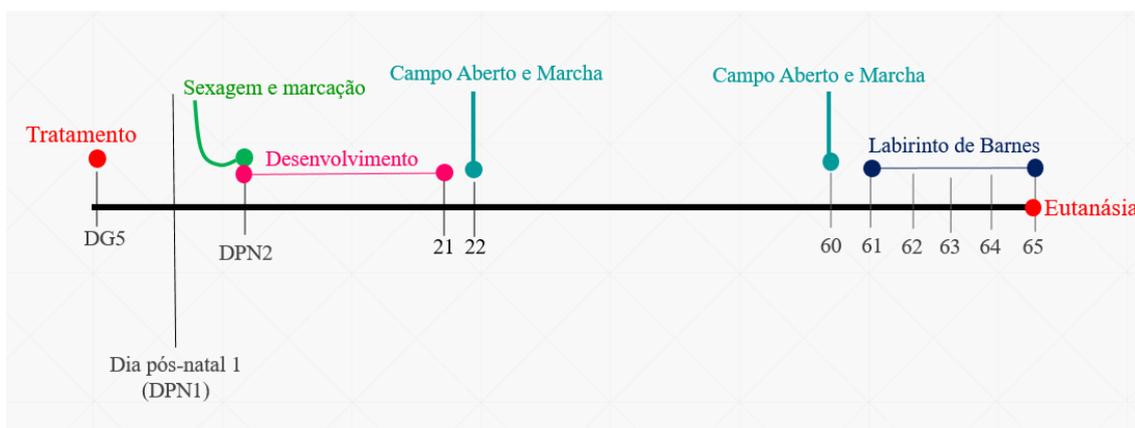
Figura 11 - Labirinto de Barnes com ilustração indicando a posição das pistas visuais na direção da caixa de escape.



Fonte: Autoral.

A Figura 12 ilustra o delineamento experimental, apontando o momento do tratamento das ratas prenhes (dia gestacional 5 – DG5) e da realização das avaliações comportamentais.

Figura 12 - Delineamento experimental.



Fonte: Autoral.

3.3.8 Análise Estatística

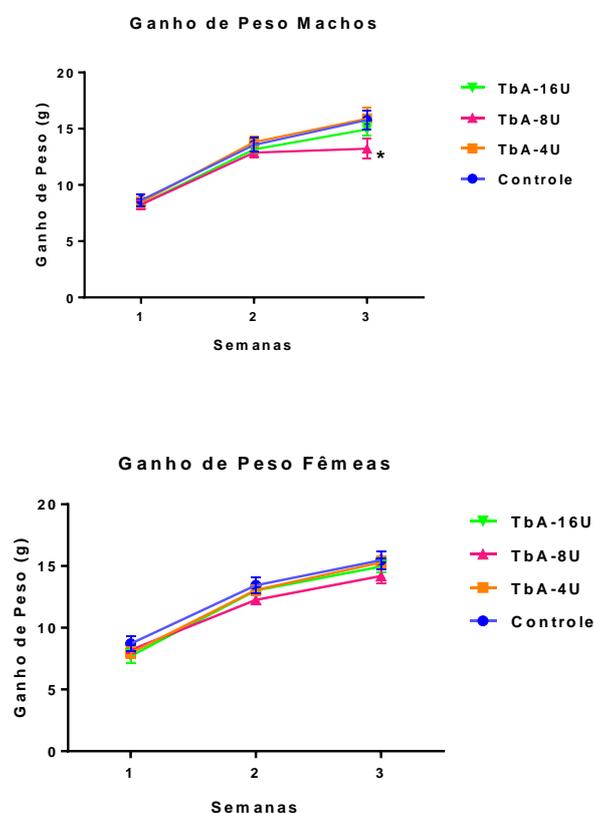
A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6[®] (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homocedasticidade dos dados. Para os dados paramétricos foram utilizados ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, quando havia apenas um fator (tratamento) a ser avaliado e ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, quando tiverem dois fatores (tratamento e tempo) a serem avaliados. O nível de significância para todas as análises foi considerado $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

As Figuras 13 a 17 mostram os resultados dos parâmetros do desenvolvimento físico da prole de ratas expostas durante a gestação à TbA.

A Figura 13 apresenta os resultados o ganho de peso semanal (entre o DPN2 e DPN21) das proles masculina e feminina, cujas mães foram expostas à TbA (4U/kg, 8U/kg ou 16U/kg). A ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni não mostrou diferenças significantes entre os grupos no ganho de peso da prole masculina, exceto o grupo TbA-8U que mostrou redução do ganho de peso, em relação ao grupo controle, na terceira semana [tratamento $F(3,28)=1,682$; $p>0,05$; tempo $F(2,56)=193,7$; $p<0,01$; interação entre os fatores $F(6,56)=1,404$; $p>0,05$], bem como da prole feminina [tratamento $F(3,28)=1,006$; $p>0,05$; tempo $F(2,56)=346,5$; $p<0,01$; interação entre os fatores $F(6,56)=0,8097$; $p>0,05$].

Figura 13 – Ganho de peso de ratos, machos e fêmeas, nas três primeiras semanas de vida, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

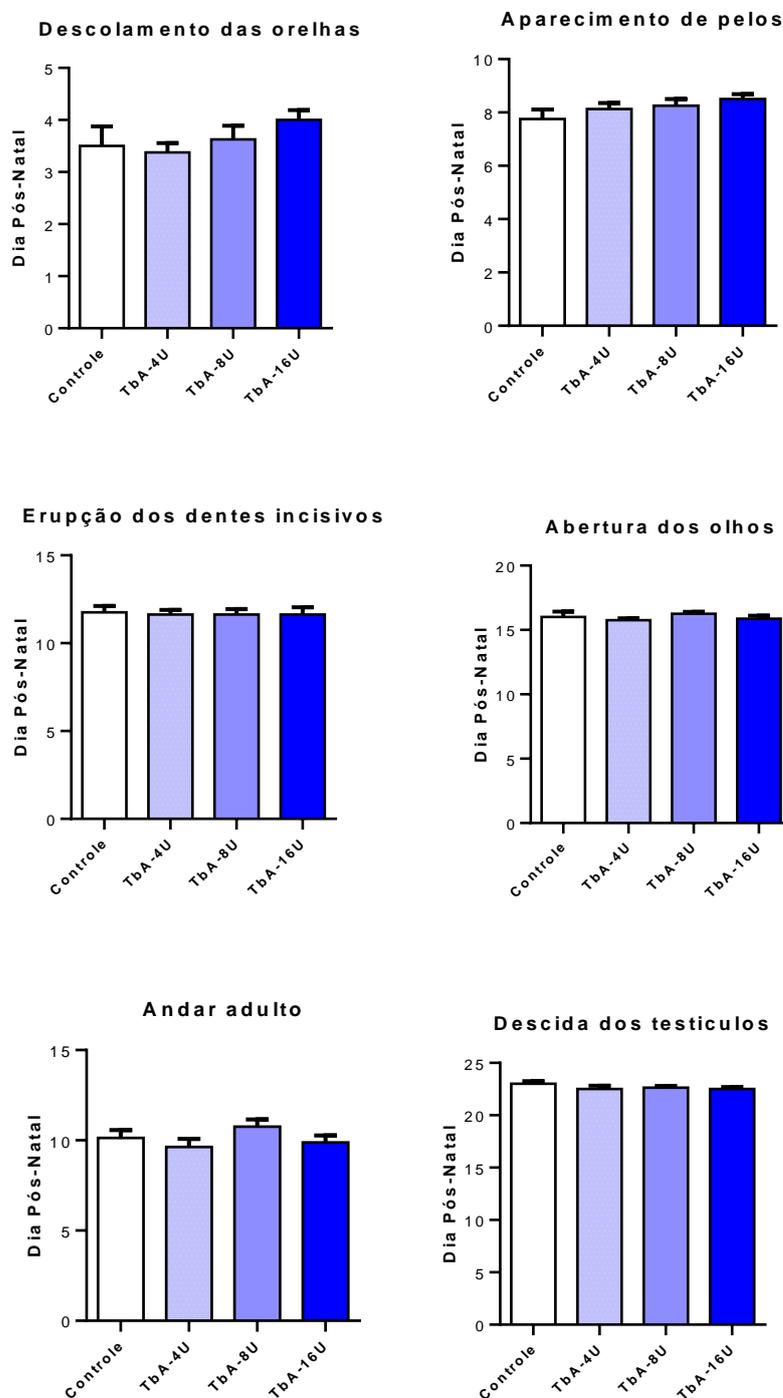


$p<0,01$, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni

A Figura 13 mostra os resultados de parâmetros do desenvolvimento físico da prole masculina – descolamento de orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos, abertura de olhos, andar adulto e descida de testículos –, cujas mães foram expostas à TbA (4U/kg, 8U/kg e 16U/kg). A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: descolamento das orelhas ($F(3,28)=1,351$; $p>0,05$); aparecimento de pelos ($F(3,28)=1,378$; $p>0,05$); erupção dos dentes incisivos ($F(3,28)=0,03226$; $p>0,05$); abertura dos olhos ($F(3,28)=0,6430$; $p>0,05$); andar adulto ($F(3,28)=1,270$; $p>0,05$); e descida dos testículos ($F(3,28)=0,9039$; $p>0,05$).

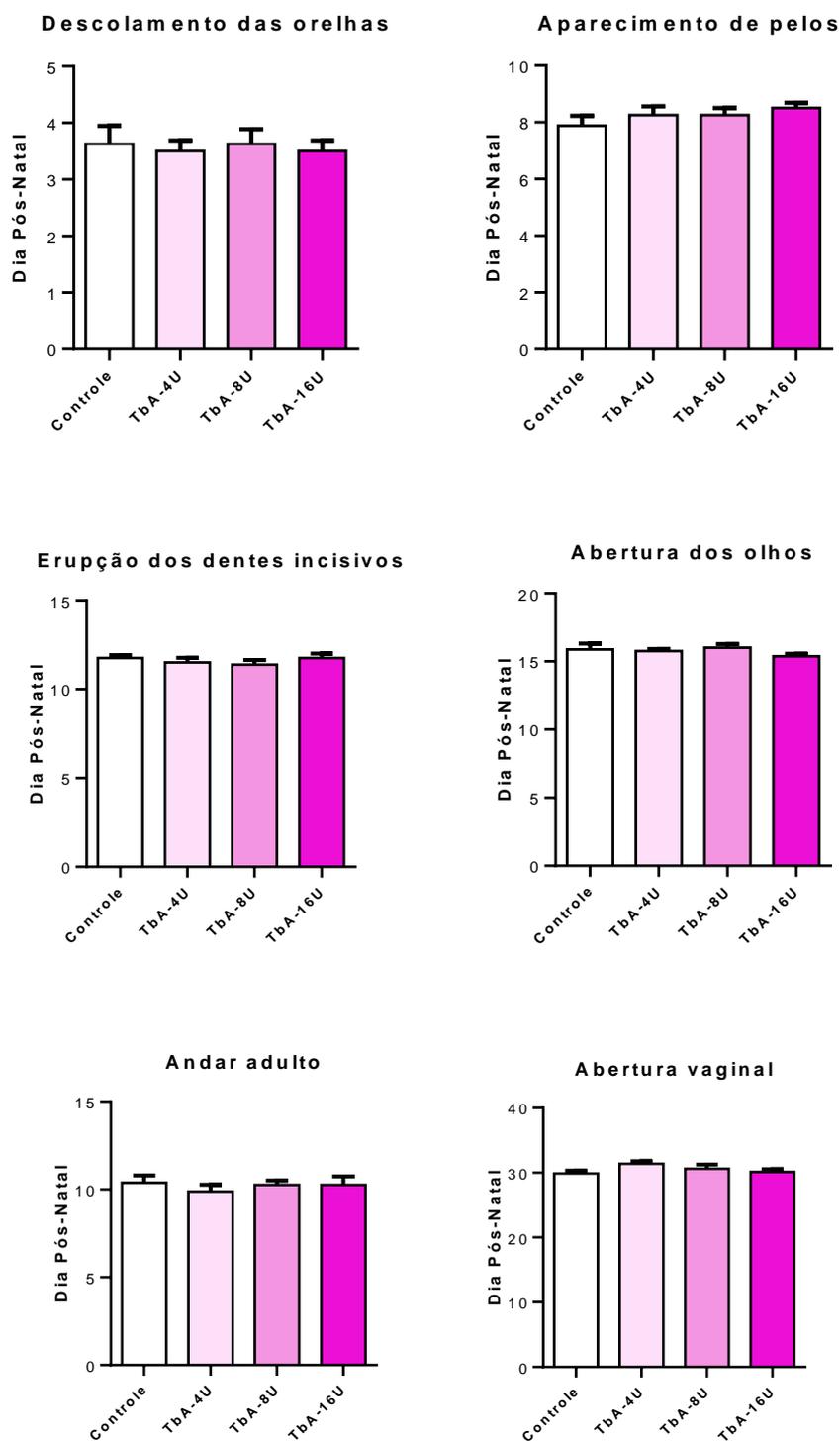
A Figura 14 mostra os resultados do desenvolvimento físico da prole feminina – descolamento de orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos, abertura de olhos, andar adulto e abertura vaginal –, cujas mães foram expostas à TbA (4U/kg, 8U/kg e 16U/kg). A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: descolamento das orelhas ($F(3,28)=0,08485$; $p>0,05$), aparecimento de pelos ($F(3,28)=0,8322$; $p>0,05$), erupção dos dentes incisivos ($F(3,28)=0,6117$; $p>0,05$), abertura dos olhos ($F(3,28)=0,8950$; $p>0,05$), andar adulto ($F(3,28)=0,2937$; $p>0,05$) e abertura vaginal ($F(3,28)=1,832$; $p>0,05$).

Figura 14 - Parâmetros no desenvolvimento físico da prole masculina – descolamento de orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos, abertura de olhos, andar adulto e descida de testículos –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

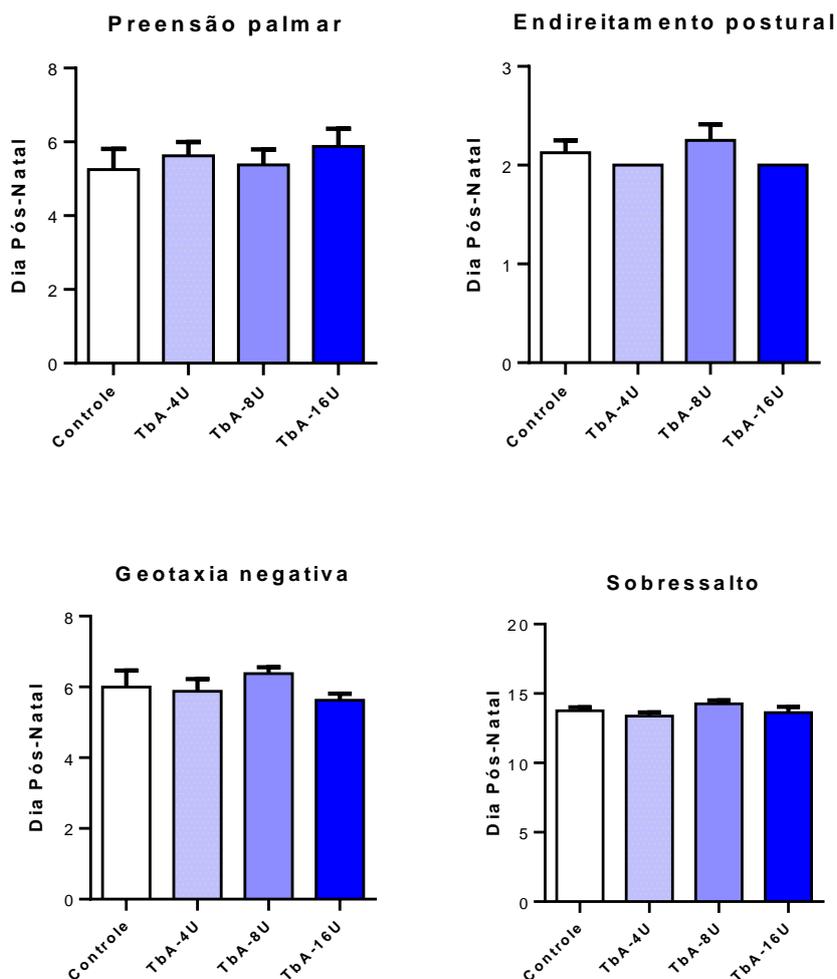
Figura 15 - Parâmetros no desenvolvimento físico da prole feminina – descolamento de orelhas, aparecimento de pelos, erupção de dentes incisivos, abertura de olhos, andar adulto e abertura vaginal –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

A Figura 16 mostra os resultados do desenvolvimento reflexológico da prole masculina – preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto –, cujas mães foram expostas à TbA (4U/kg, 8U/kg e 16U/kg). A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnet não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: preensão palmar $F(3,28)=0,3576$; $p>0,05$; endireitamento postural $F(3,28)=1,351$; $p>0,05$; geotaxia negativa $F(3,28)=0,9669$; $p>0,05$; e sobressalto ($F(3,28)=1,462$; $p>0,05$).

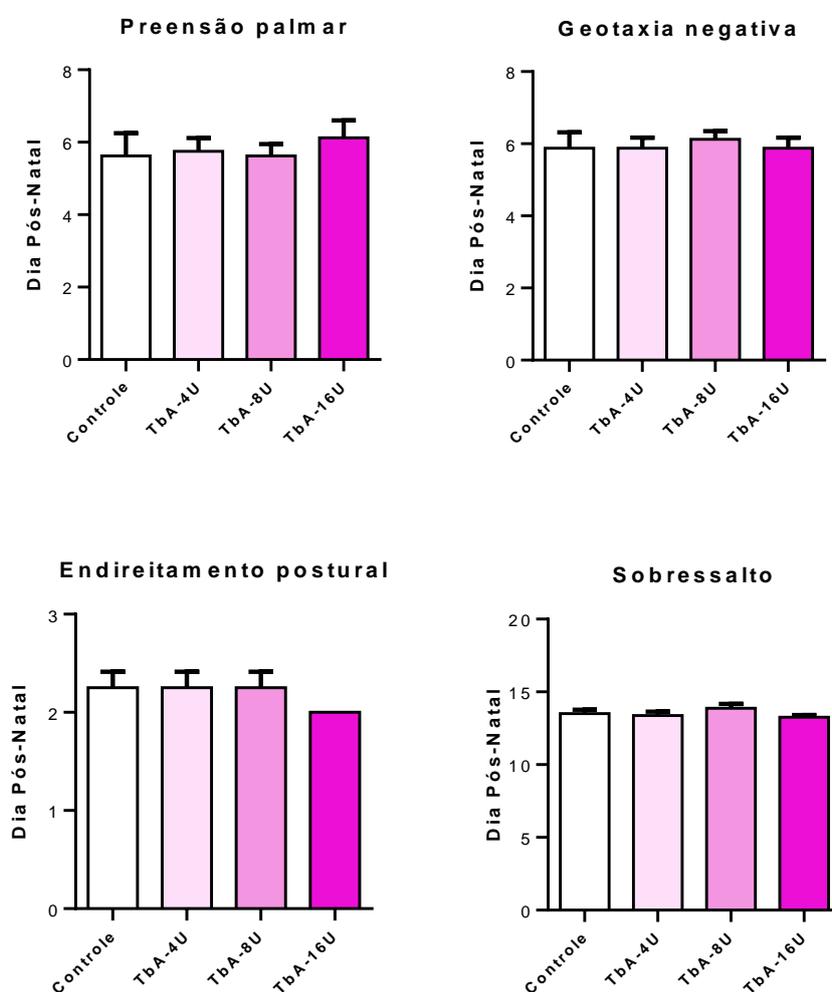
Figura 16 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole masculina – preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

A Figura 17 mostra os resultados do desenvolvimento reflexológico da prole feminina – preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto –, cujas mães foram expostas à TbA (4U/kg, 8U/kg e 16U/kg). A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: preensão palmar $F(3,28)=0,2606$; $p>0,05$; endireitamento postural $F(3,28)=0,7778$; $p>0,05$; geotaxia negativa $F(3,28)=0,1489$; $p>0,05$; e sobressalto $F(3,28)=1,146$; $p>0,05$.

Figura 17 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole feminina – preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto –, cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

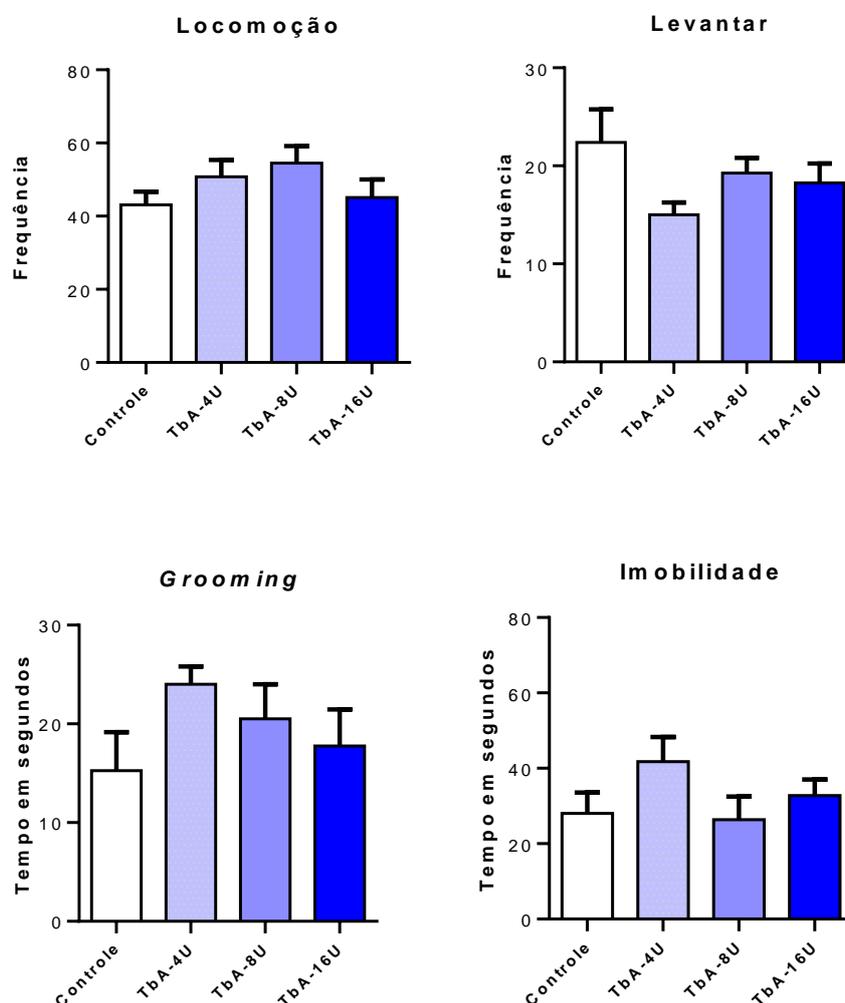


$p>0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

A Figura 18 mostra os resultados da atividade motora da prole masculina, avaliada no campo aberto, durante a infância (DPN22), cujas mães foram

expostas à TbA. A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: frequência de locomoção $F(3,28)=1,354$; $p>0,05$; frequência de levantar $F(3,28)=1,886$; $p>0,05$; tempo de *grooming* $F(3,28)=1,259$; $p>0,05$; e tempo de imobilidade $F(3,28)=1,472$; $p>0,05$.

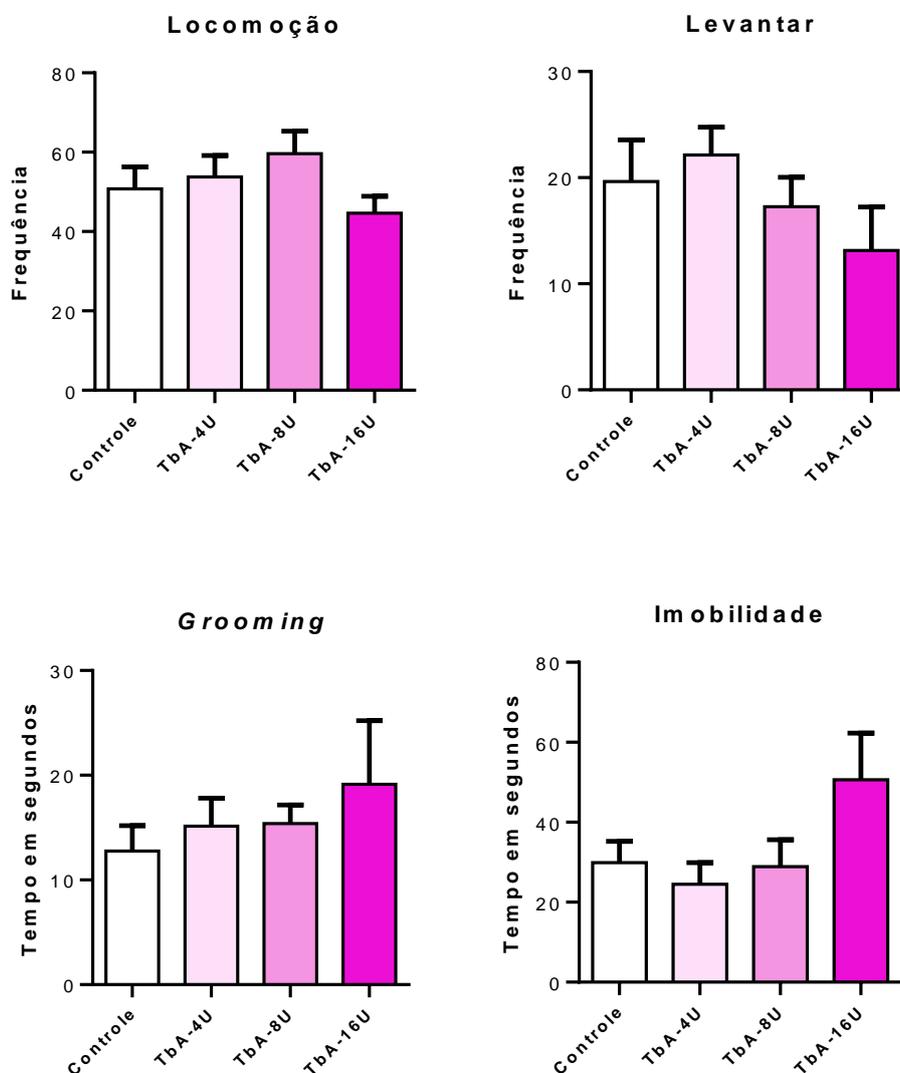
Figura 18 - Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole masculina durante a infância (dia pós-natal 22 – DPN22), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

A Figura 19 mostra os resultados da atividade motora da prole feminina, avaliada no campo aberto, durante a infância (DPN22), cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferença significativa entre os grupos, em nenhum dos parâmetros avaliados: frequência de locomoção $F(3,28)=1,415$; $p>0,05$; frequência de levantar $F(3,28)=1,241$; $p>0,05$; tempo de *grooming* $F(3,28)=0,5198$; $p>0,05$; e tempo de imobilidade $F(3,28)=2,270$; $p>0,05$

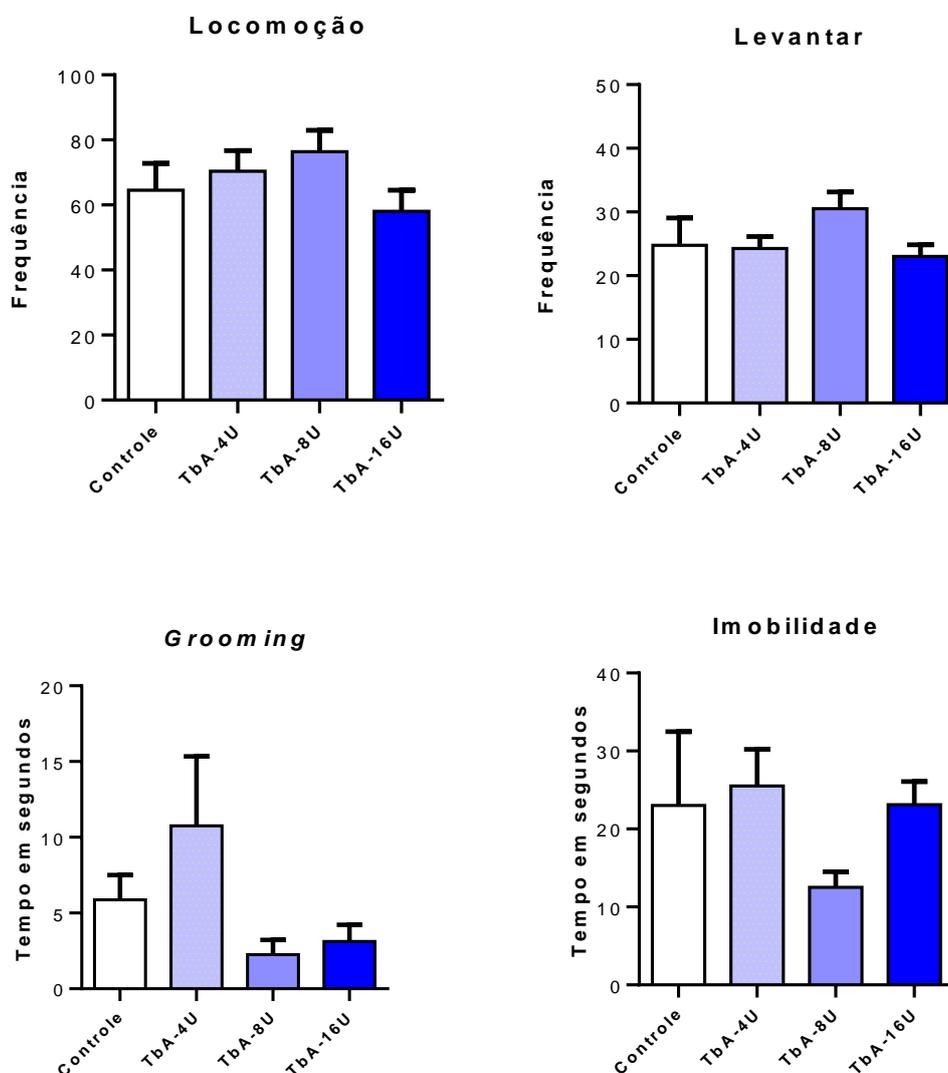
Figura 19- Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole feminina, durante a infância (dia pós-natal 22 – DPN22), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

A Figura 20 mostra os resultados da atividade motora da prole masculina, avaliada no campo aberto, na idade adulta (DPN60), cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: frequência de locomoção $F(3,28)=1,270$; $p>0,05$; frequência de levantar $F(3,28)=1,361$; $p>0,05$; tempo de *grooming* $F(3,28)=2,263$; $p>0,05$; e tempo de imobilidade $F(3,28)=1,077$; $p>0,05$.

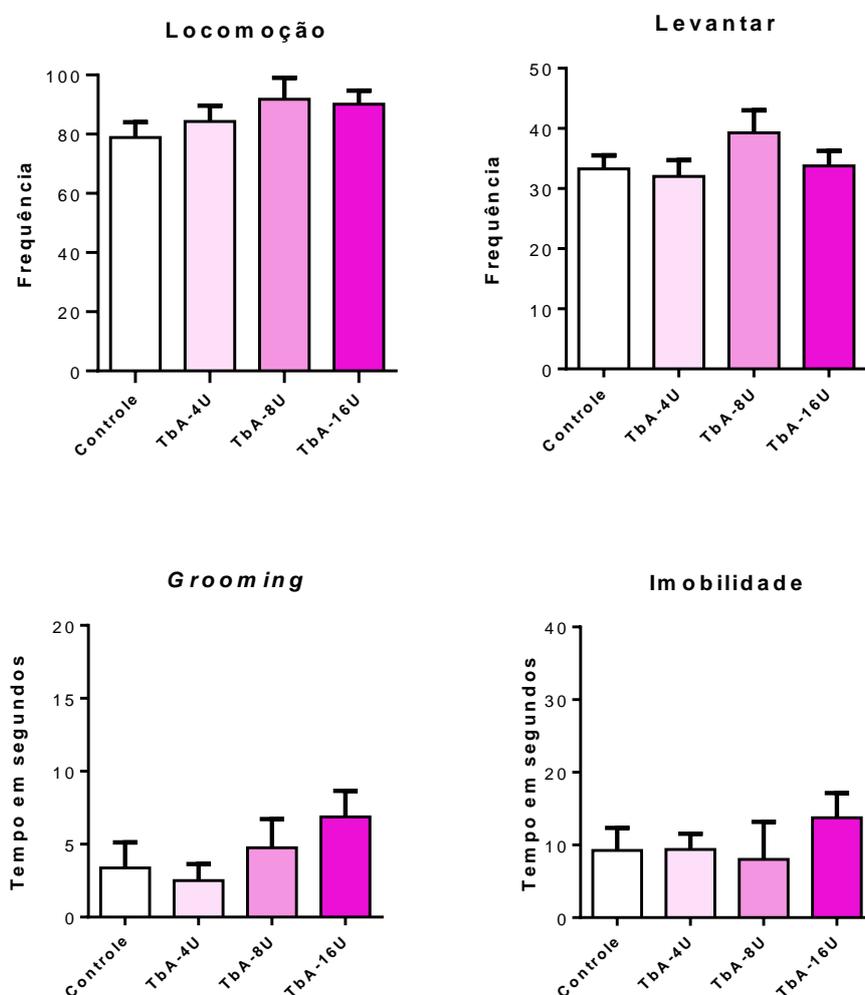
Figura 20 – Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole masculina adulta (dia pós-natal 60 – DPN60), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

A Figura 21 mostra os resultados da atividade motora da prole feminina, avaliada no campo aberto, na idade adulta (DPN60), cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: frequência de locomoção $F(3,28)=1,066$; $p>0,05$; frequência de levantar $F(3,28)=1,244$; $p>0,05$; tempo de *grooming* $F(3,28)=1,268$; $p>0,05$; e tempo de imobilidade $F(3,28)=0,04796$; $p>0,05$.

Figura 21 — Parâmetros da atividade motora, avaliada no campo aberto, da prole feminina adulta (dia pós-natal 60 – DPN60), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

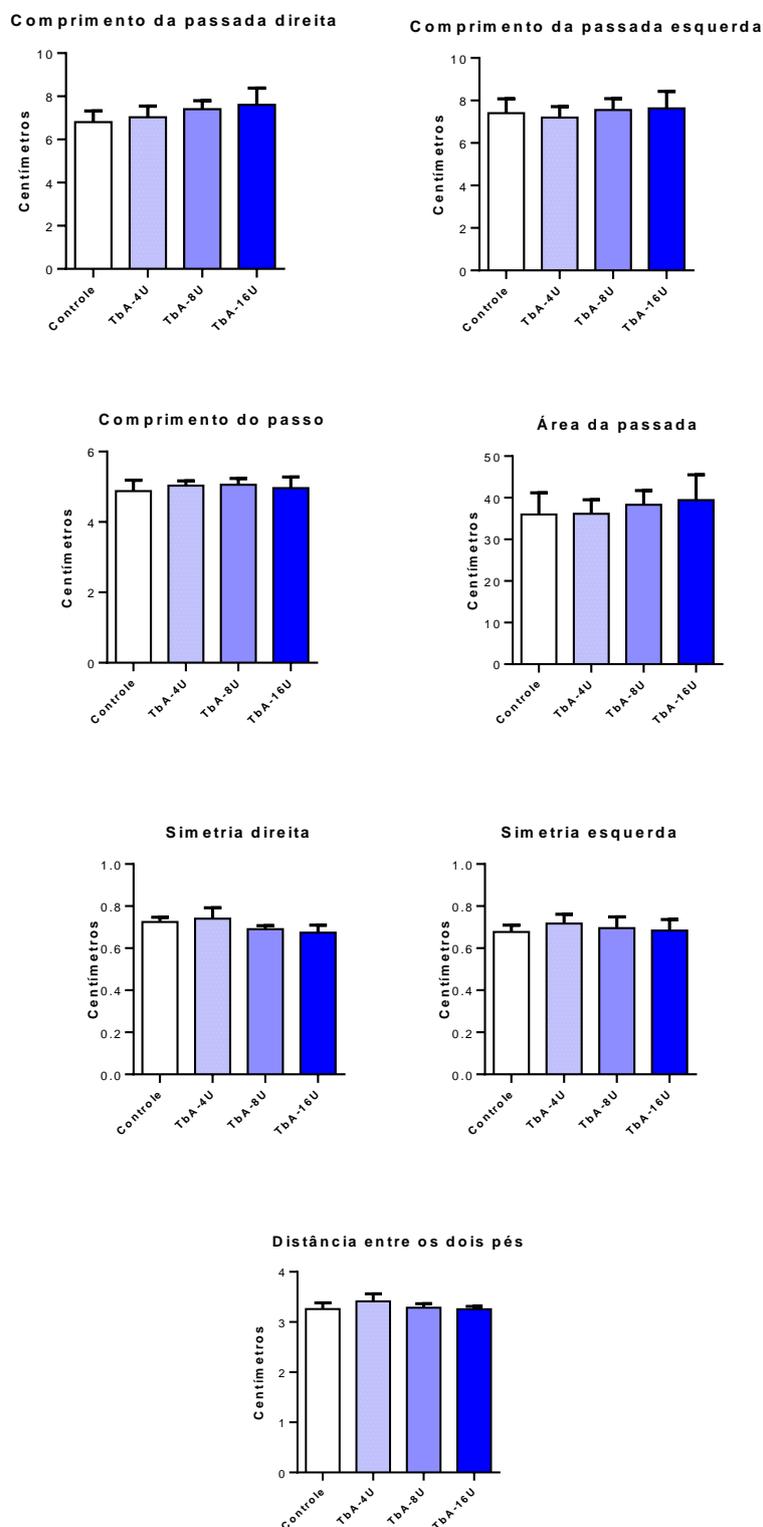
As Figuras 22 a 25 mostram os resultados do teste da marcha da prole, na infância e na idade adulta, cujas mães foram expostas à TbA durante a gestação.

A Figura 22 mostra os resultados do teste da marcha da prole masculina na infância (DPN22), cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via seguida dos teste de Dunnett não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: comprimento da passada direita $F(3,27)=0,4246$, $p>0,05$; comprimento da passada esquerda $F(3,27)=0,08723$, $p>0,05$; simetria direita $F(3,27)=0,7610$, $p>0,05$; simetria esquerda $F(3,27)=0,1530$, $p>0,05$; comprimento do passo $F(3,27)=0,1155$, $p>0,05$; área da passada $F(3,27)=0,1332$, $p>0,05$; e distância entre os dois pés $F(3,27)=0,4402$; $p>0,05$.

A Figura 23 apresenta os resultados do teste da marcha realizado por ratas fêmeas no DPN22 cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa nos parâmetros: comprimento da passada direita $F(3,28)=0,1295$; $p>0,05$, comprimento da passada esquerda $F(3,28)=0,2672$; $p>0,05$, simetria direita $F(3,28)=0,1017$; $p>0,05$ simetria esquerda $F(3,28)=0,1057$; $p>0,05$, comprimento do passo $F(3,28)=0,1171$; $p>0,05$, área da passada $F(3,28)=0,1228$; $p>0,05$, distância entre os dois pés $F(3,28)=0,3198$; $p>0,05$.

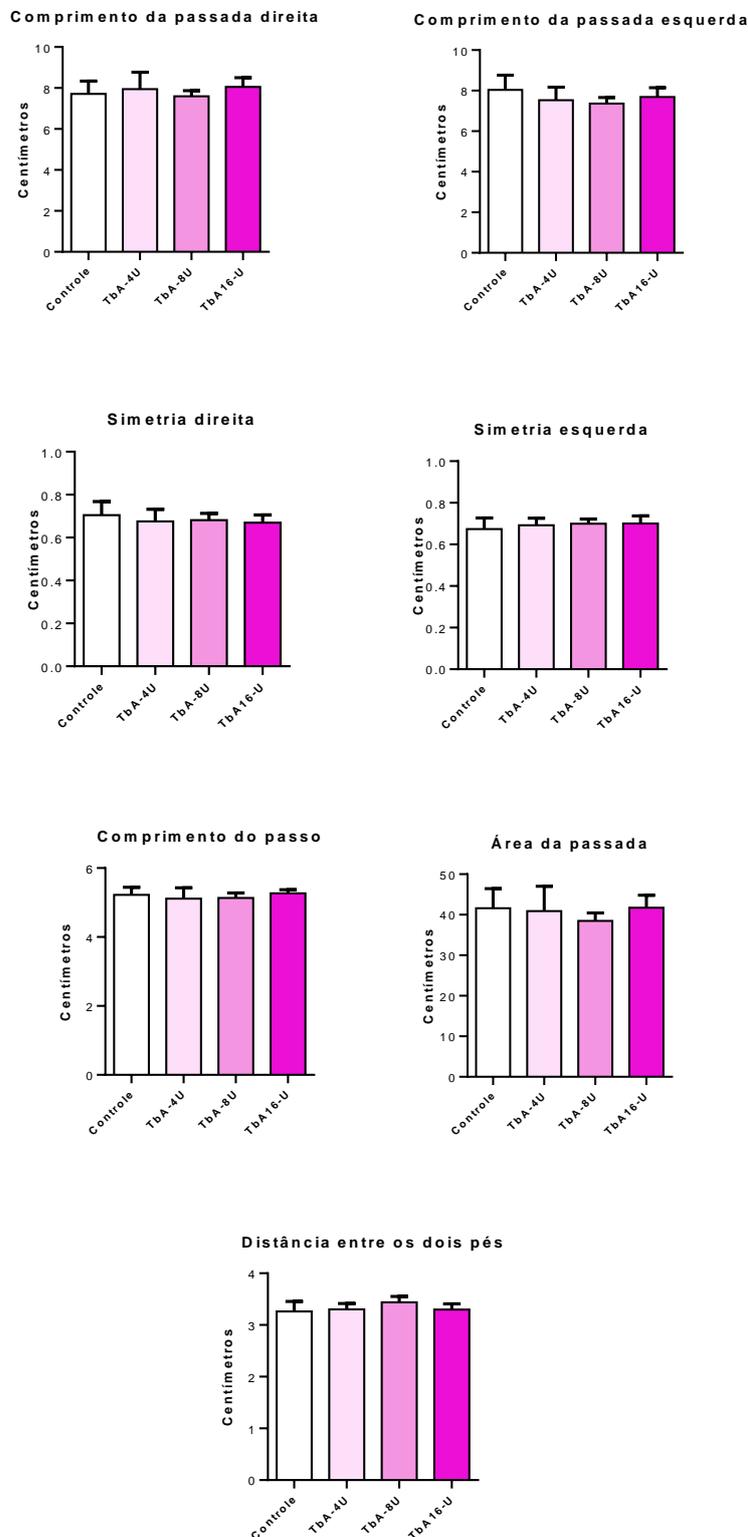
A Figura 24 apresenta os resultados do teste da marcha realizado por ratos machos no DPN60 cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa nos parâmetros: comprimento da passada direita $F(3,28)=0,5590$; $p>0,05$, comprimento da passada esquerda $F(3,28)=0,3400$; $p>0,05$, simetria direita $F(3,28)=0,04012$; $p>0,05$ simetria esquerda $F(3,28)=0,1280$; $p>0,05$, comprimento do passo $F(3,28)=0,6823$; $p>0,05$, área da passada $F(3,28)=0,9187$; $p>0,05$, distância entre os dois pés $F(3,28)=1,727$; $p>0,05$.

Figura 22 - Parâmetros do teste da marcha, da prole masculina durante a infância (dia pós-natal 22 – DPN22), cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM, no dia gestacional 5 (DG5). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



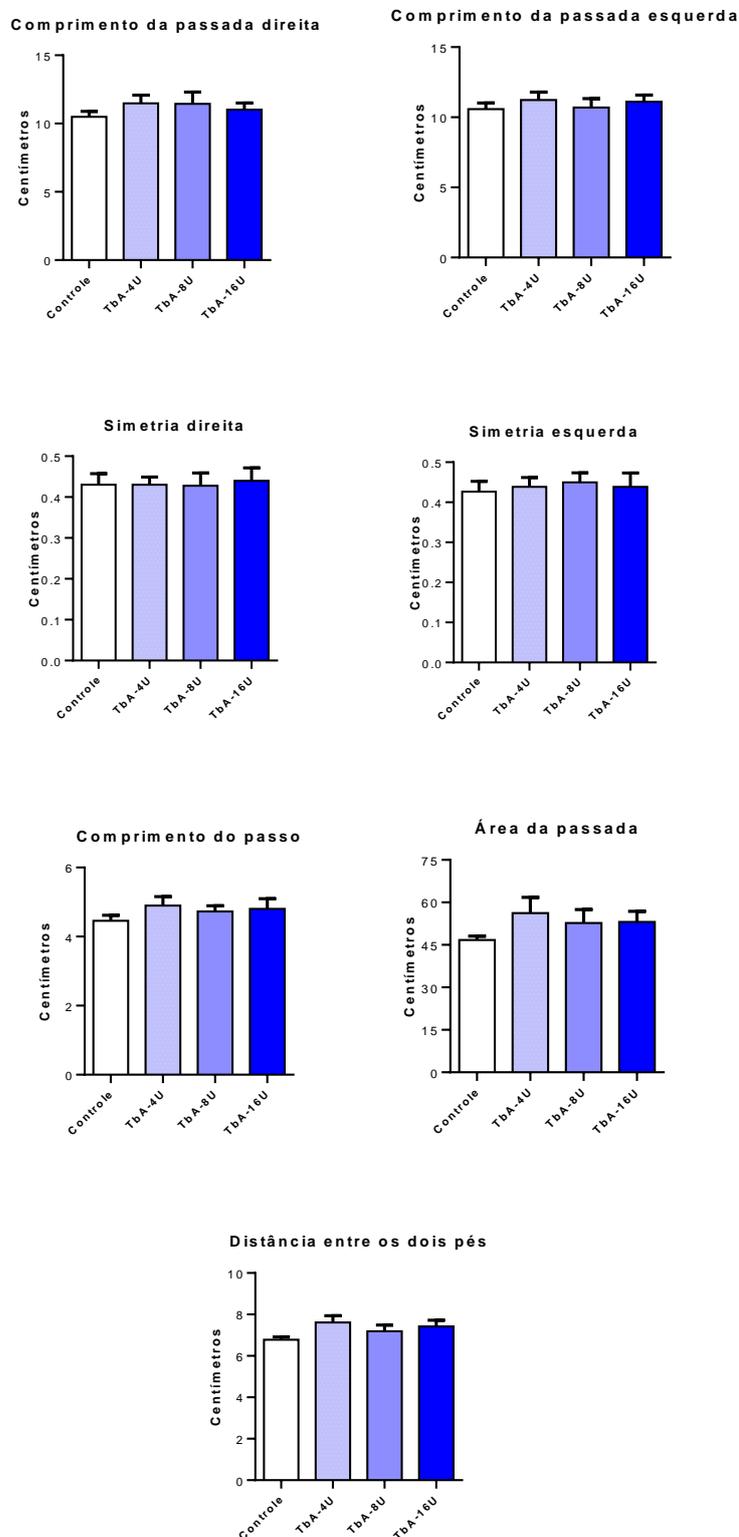
$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Figura 23 - Parâmetros analisados no teste da marcha realizado por ratas fêmeas no DPN22 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

Figura 24 - Parâmetros analisados no teste da marcha realizado por ratos machos no DPN60 cujas - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

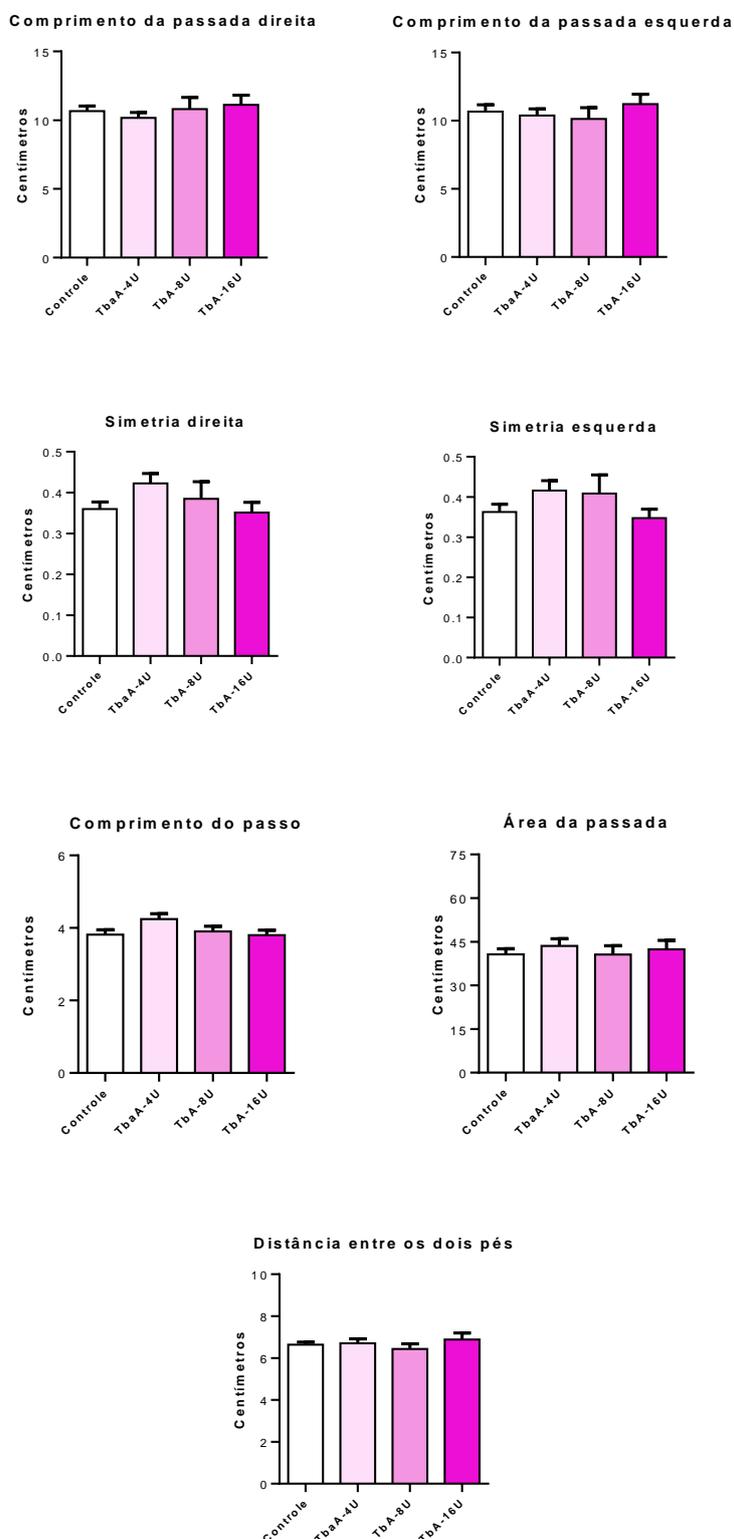


$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

A Figura 25 apresenta os resultados do teste da marcha realizado por ratas fêmeas no DPN60 cujas mães foram expostas à TbA. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa nos parâmetros: comprimento da passada direita $F(3,28)=0,4083$; $p>0,05$, comprimento da passada esquerda $F(3,28)=0,5160$; $p>0,05$, simetria direita $F(3,28)=1,251$; $p>0,05$ simetria esquerda $F(3,28)=1,264$; $p>0,05$, comprimento do passo $F(3,28)=2,198$; $p>0,05$, área da passada ($F(3,28)=0,2966$; $p>0,05$), distância entre os dois pés $F(3,28)=0,6576$; $p>0,05$.

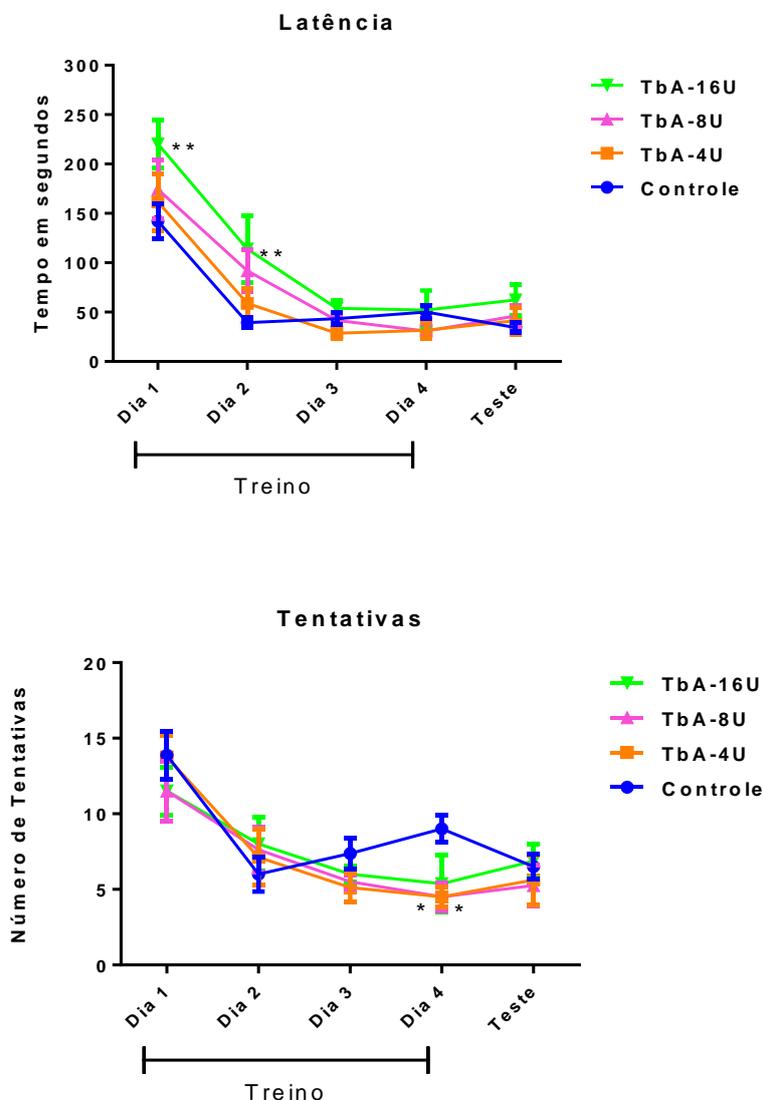
A Figura 26 apresenta os resultados do labirinto de Barnes (entre o DPN61 ao DPN 65) da prole masculina, cujas mães foram expostas à uma TbA (4U/kg, 8U/kg ou 16U/kg). A ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni mostraram diferenças significantes nos parâmetros: Latência [tratamento: $F(12,112)=0,9230$; $p>0,05$; tempo: $F(4,112)=46,40$; $p<0,0001$; interação entre os fatores $F(3,28)=4,948$; $p<0,05$] entre o grupo Controle e TbA-16U no Dia 1 e no Dia 2 e Tentativas [tratamento: $F(12,112)=0,8585$; $p>0,05$; tempo: $F(4,112)=19,08$; $p<0,0001$; interação entre os fatores: $F(3,28)=1,409$; $p>0,05$] entre o grupo Controle e TbA-4U e Controle e TbA-8U ambos no Dia 4. A ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni mostraram que, Dia 1 e no Dia 2 de treino, os animais do grupo TbA-16U levaram mais tempo para encontrar a caixa de escape comparado os animais do grupo Controle e mostrou que, no Dia 4 de treino, os animais dos grupos TbA-4U e TbA-8U precisaram de menos tentativa para encontrar a caixa de escape comparados aos animais do grupo Controle.

Figura 25- Parâmetros analisados no teste da marcha realizado por ratas fêmeas no DPN60 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

Figura 26 - Parâmetros analisados do labirinto de Barnes em ratos machos do DPN61 ao DPN 65 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

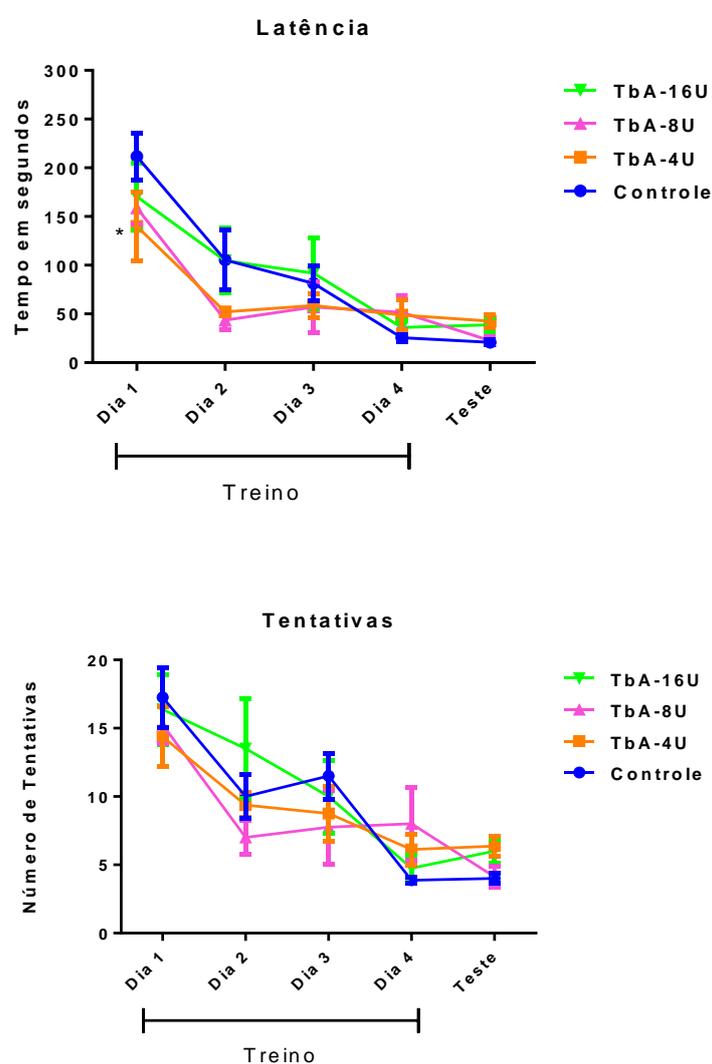


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

A Figura 27 apresenta os resultados do labirinto de Barnes (entre o DPN61 ao DPN 65) da prole feminina, cujas mães foram expostas à uma TbA (4U/kg, 8U/kg ou 16U/kg). A ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni apresentou diferença significativa no parâmetro: latência [tratamento: $F(12,112)=1,379$; $p > 0,05$; tempo: $F(4,112)=36,27$; $p < 0,0001$; comparação entre os fatores: $F(3,28)=0,9100$; $p > 0,05$] entre o grupo Controle e TbA-4U no Dia 1.

A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa no parâmetro: tentativas [tratamento: $F(12,112)=1,093$; $p>0,05$; tempo: $F(4,112)=23,45$; $p<0,0001$; comparação entre os fatores: $F(3,28)=0,5358$; $p>0,05$]. A ANOVA de duas vias mostrou que, no Dia 1, os animais do grupo TbA-4U precisaram de menos tempo para encontrar a caixa de escape comparado ao grupo Controle.

Figura 27 - Parâmetros analisados labirinto de Barnes em ratas fêmeas do DPN61 ao DPN 65 - cujas mães foram expostas à toxina botulínica tipo-A (TbA), nas doses de 4U/kg, 8U/kg e 16U/kg (respectivamente, TbA-4U, TbA-8U e 16U-TbA), ou solução fisiológica (controle), por via IM no DG5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.



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

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado a prole de ratas gestantes expostas a uma formulação comercial de TbA e os efeitos na atividade motora e cognitiva tanto na infância, quanto na fase adulta destas proles. Para isso, foram empregadas três doses de TbA – 4U/kg, 8U/kg ou 16U/kg – em administração única, por via IM, em ratas prenhes no DG5. Esse dia gestacional foi escolhido considerando o período de desenvolvimento intrauterino de ratos, no qual a implantação do embrião ocorre entre DG5 e DG6 e o período de organogênese entre DG6 e DG15 (BERNARDI; SPINOSA, 2023; WILSON, 1976); dessa forma, afasta-se a possibilidade de perda do embrião no período de pré-implantação uterina e favorece a gestação a termo.

O período de organogênese é caracterizado pela proliferação, diferenciação e migração celular, até a organogênese propriamente dita, que consiste na formação de órgãos rudimentares; é neste período em que ocorre a maior incidência de teratogênese (BERNARDI; SPINOSA, 2023; WILSON, 1976). O termo teratogênese designa as malformações induzidas por agentes patológicos, químicos e ambientais durante o período de desenvolvimento dos órgãos de um animal (BERNARDI; SPINOSA, 2023; CAMARGO et al, 2017).

As doses de TbA empregadas no presente trabalho foram escolhidas baseada em estudos prévios que avaliaram os efeitos da TbA durante a gestação em roedores e em coelhos. Nestes estudos pré-clínicos realizados pelo fabricante do Botox®, Allergan Inc, foi constatado que duas administrações de Botox®, por via IM, durante o período da organogênese, nas doses de 4, 8 e 16 U/kg, promoveram, em fetos dos respectivos animais tratados, redução dos pesos corporais e da ossificação esqueléticas, além de toxicidade materna evidenciada por abortos, partos prematuros e morte materna (ALLERGAN, INC., 2021).

No presente trabalho, não foi observado em nenhuma prole, tanto do grupo controle como dos grupos experimentais, a ocorrência de natimorto ou animal nascido com qualquer tipo de malformação, o que sugere ausência de teratogênese induzida pela TbA.

Para a avaliação do desenvolvimento físico da prole foram empregados vários parâmetros e, dentre eles, o descolamento de orelha, o aparecimento de pelo, a erupção dos dentes incisivos e a abertura dos olhos, os quais têm sido associados a presença do fator de crescimento epidérmico (EGF) (ABREU et al., 2024; COHEN, 1962). O EGF é um polipeptídeo com 53 resíduos de aminoácidos que está envolvido na regulação da proliferação celular (BOONSTRA et al., 1995).

No presente trabalho não foi observado diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos experimentais, tanto da prole masculina como da feminina, em nenhum dos parâmetros que podem estar relacionados ao EGF. Acrescente-se, ainda, que também não foi observado diferenças significantes entre os grupos em relação ao andar adulto e abertura vaginal. Em particular, a abertura vaginal é um sinal externo da puberdade feminina, que, geralmente, ocorre um dia após o primeiro curso de liberação de gonadotrofinas (SANDINI et al., 2014). Por outro lado, considerando o ganho de peso das proles nas três primeiras semanas de vida, foi observado redução do peso apenas da prole masculina do grupo TbA 8U/Kg, na terceira semana de vida, contudo, sem repercussão nos demais parâmetros avaliados na infância e idade adulta.

O desenvolvimento reflexológico foi avaliado por meio da preensão palmar, endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto auditivo. Esses reflexos estão relacionados à adaptação do neonato à vida extrauterina e alterações nesses reflexos podem ser indicativos de alterações comportamentais e/ou neurológicas na idade adulta (ABREU et al., 2024; GALLEGOS et al., 2016; KHALKI et al., 2012).

A preensão palmar (também conhecido como reflexo de Babinski) é um reflexo motor que está relacionado à maturação dos sistemas nervoso central e periférico e deve desaparecer à medida que o animal se desenvolve e cresce (ABREU et al., 2024; SANDINI et al., 2014). A persistência deste reflexo pode ser um indicativo de lesão neurológica (KAKITANI et al., 2010).

Os reflexos de endireitamento postural, geotaxia negativa e sobressalto auditivo são guiados pelo sistema motor e pelo sistema vestibular e começam a se desenvolver logo após o nascimento (SANDINI et al., 2014).

A ausência de diferenças significantes entre os grupos nos diferentes parâmetros relacionados ao desenvolvimento reflexológico avaliados no presente trabalho indica que a TbA não interferiu na manifestação desses reflexos da prole.

No presente trabalho não foi observado diferenças significantes entre grupos, tanto da prole masculina como da feminina, em nenhum dos parâmetros que podem estar relacionados ao desenvolvimento reflexológico.

A atividade motora das proles na infância e na idade adulta foi avaliada por meio do teste do campo aberto. Esse teste tem sido empregado para avaliar possíveis alterações nos sistemas vestibular e motor, ansiedade e estados emocionais dos roedores (WALSH; CUMMINS, 1976; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2023). Nesse aparato é possível avaliar vários parâmetros. No presente estudo foram avaliados a locomoção e o levantar, os quais indicam, respectivamente, a exploração horizontal e vertical; o *grooming* que reflete a autolimpeza; e a imobilidade que pode indicar habituação ao ambiente. Não foi observado diferenças significantes entre os grupos controle e experimentais, tanto da prole masculina como da feminina, em nenhum dos parâmetros avaliados no campo aberto.

O teste da marcha foi empregado no presente trabalho para avaliação do sistema motor e do equilíbrio. A marcha fisiológica, que está diretamente relacionada ao equilíbrio e pode ser rapidamente avaliada. Execução adequada da marcha depende da integridade neurológica central e periférica (PANTALEON et al., 2023). A locomoção normal em mamíferos envolve uma série de eventos coordenados envolvendo os quatro membros, postura, posicionamento, precisão do movimento, equilíbrio e suporte, que são acompanhados por uma comunicação neurológica e musculoesquelética complexa. Assim, déficits em qualquer aspecto das vias motoras podem produzir anormalidades em movimentos e comportamentos, como caminhada, predação, exploração, reprodução, cópula, e luta e fuga, entre outros (DUNNETT; BROOKS, 2018). Wertman et al. (2019) relataram que a análise da marcha pode fornecer dados comportamentais correlacionados a uma determinada doença, lesão ou exposição a medicamentos que pode afetar os movimentos. Neste contexto e considerando que no presente trabalho não foram observadas

diferenças significantes entre os grupos no teste da marcha da prole, infere-se que a exposição pré-natal da prole à TbA não prejudicou locomoção e equilíbrio desses animais, tanto na infância quanto na idade adulta.

O labirinto de Barnes foi descrito por Carol Barnes, em 1979, e tem sido amplamente utilizado, em roedores, para avaliar o aprendizado e a memória espacial; esse teste utiliza pistas visuais para a memorização e o aprendizado da caixa de escape (HARISSOM et al, 2006; ROSENFELD; FERGUSON. 2014). O objetivo do teste é avaliar se o animal aprende o local da caixa escape, mesmo em uma situação considerada aversiva, uma vez que é realizado em ambiente claro e aberto.

A memória é o processo que permite armazenar informações e é definida pela aquisição, formação, conservação e a evocação de informações. Existem várias classificações para a memória, varia de acordo com sua função, com o tempo de duração e do seu conteúdo (IZQUIERDO et al., 2002). A memória de curto prazo é considerada como a memória que mantém a informação por algumas horas (DUDAI, 2004; MCGAUGH, 1966). A memória de curta duração é volátil e pode ser danificada por estímulos externos (IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH, 2000). Já a memória de longo prazo não é tão volátil, mas precisa de um tempo maior para ser armazenada, em média de 6 a 12 horas (IZQUIERDO ET AL., 1999; IZQUIERDO ET AL., 2002).

Klinkenberg et al. (2011), em artigo de revisão, ressaltaram que, historicamente, a acetilcolina tem sido implicada nas funções de aprendizagem e memória de curto prazo. Esses autores mencionam também estudos em animais e em seres humanos que investigaram o papel da acetilcolina na atenção e na cognição, em particular, a acetilcolina cortical.

No presente trabalho o labirinto de Barnes foi empregado com o intuito de avaliar se a interferência na transmissão colinérgica induzida pela toxina botulínica na rata prenhe poderia causar algum efeito nocivo manifesto na prole adulta. Os resultados obtidos mostraram poucas diferenças entre os grupos controle e experimentais em relação ao desempenho no labirinto, exceto pelo fato da prole masculina que recebeu a maior dose de TbA ter latência maior para

achar a caixa escape nas duas primeiras sessões treino, porém sem ingerência no dia do teste.

Os presentes achados, em conjunto, indicam que a exposição gestacional de ratas à TbA não interferiu no desenvolvimento físico e reflexológico da prole, bem como nos comportamentos motores e cognitivos avaliados durante a infância e na idade adulta.

6 CONCLUSÃO

A exposição de ratas à diferentes doses de TbA (4, 8 e 16 U/kg), por via IM, no DG5 não interferiu no desenvolvimento físico e reflexológico da prole masculina e feminina, bem como nos comportamentos motores e cognitivos, na infância e na idade adulta. Esses achados somados a outros estudos perinatais podem contribuir para o uso mais seguro desse medicamento durante a gestação.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, G.R; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FÉBA, L.S.; PENNA, E.Y; SILVA, J.P.; TEIXEIRA, M.V.; MANES, M.; VERGARA, G.A.; RODRIGUES, L.M.A.; FUKUSHIMA, A.R.; RICCI, E.L.; SPINOSA, H.S. Fluoxetine alters rat's milk properties causing impact on offspring's development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 483, 116805, 2024.
- ALLERGAN, INC. **BOTOX® (onabotulinumtoxinA) for injection, for intramuscular, intradetrusor, or intradermal use**. 2021. Disponível em: <<https://media.allergan.com/actavis/actavis/media/allergan-pdf-documents/product-prescribing/20190620-BOTOX-100-and-200-Units-v3-0USPI1145-v2-0MG1145.pdf>>. Acesso em: 27 agosto 2023.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behavior**, v. 23, p. 896-920, 1975.
- ANTONUCCI, F.; ROSSI, C.; GIANFRANCESCHI, L.; et al. Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 3689-3696, 2008.
- AOKI KR. Botulinum toxin: a successful therapeutic protein. **Curr Med Chem**. 2004;11(23):3085-92.
- AOKI KR. Pharmacology of Botulinum neurotoxins. **Oper Tech Otolaryngol Head Neck Surg**. 2004;15(2):81-5.
- AOKI KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. **Neurotoxicology**. 2005;26(5):785-93.
- AOKI, K. R. Pharmacology of BOTOX (!R)(Botulinum toxin type A) purified neurotoxin complex: local versus systemic muscle activity measurements in mice. **European Journal of Neurology**, v. 2, p. 3-9, 1995.
- APOSTOLIDIS A, FOWLER CJ. The use of botulinum neurotoxin type A (BoNTA) in urology. **J Neural Transm**. 2008;115(4):593-605.
- BERNARDI, M.M.; **SPINOSA, H.S.** Exposição aos medicamentos durante o período do desenvolvimento. In: **Spinosa, H.S.**; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 973 – 981, 2023.
- BOONSTRA,J.; RIJKEN,P.; HUMBEL, B.; CREMERS, F.; VERKLEI, A.; HENEGOUWEN, P.B. The epidermal growth factor. **Cell Biology International**, v. 19, n. 5, p. 413-430, 1995.
- CAMARGO, E. L. R. A. Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CAMARGO, E.L.R.A.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FUKUSHIMA, A.R.; SPINOSA, H.S. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 17, n. 1, p. 8-25, 2017.
- COHEN, S., 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **J. Biol. Chem**. 237, 1555–1562.
- Cosmetic and clinical application of Botulinum Toxin**. Thorofare: Slack; 2004.p. 5-9.

- DRESSLER D, BENECKE R. Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment.
- DRESSLER, D.; SABERI, F.A.; BARBOSA, E.R. Botulinum toxin: mechanisms of action. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 180-185, 2005.
- DUNNETT, S.B.; BROOKS, S.P. Motor assessment in Huntington's Disease mice. **Methods in Molecular Biology**, v. 1780, 2018.
- ELEOPRA, R.; TUGNOLI, V.; QUATRALE, R.; et al. Botulinum Neurotoxin Serotypes A and C do not Affect Motor Units Survival in Humans: An Electrophysiological Study by Motor Units Counting. **Clinical Neurophysiology**, v. 113, p. 1258-1264, 2002.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). BOTOX® Cosmetic (Boe-Tox) (onabotulinumtoxinA) for injection. 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/77359/download>>. Acesso em: 02 setembro 2023.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the Mouse. *Animal Behavior*, v. 13, p. 234-241, 1965.
- function and therapeutic utility. **Trends Biochem Sci.** 2002;27(11):552-8.
- GALLEGOS, C.E., BARTOS, M., BRAS, C., GUMILAR, F., ANTONELLI, M.C., MINETTI, A., 2016. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. **Neurotoxicology** 53, 20–28. H.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Physiology**, v.18, n. 3, p. 385-403, 1934.
- HARRISON, F.E.; REISERER, R.S.; TOMARKEN, A.J.; MCDONALD, M.P. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. **Learn Mem.** 2006 Nov-Dec;13(6):809-19.
- HASSELMO, M.E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, p. 710-715, 2006.
- HICKS RP, HARTELL MG, NICHOLS DA, BHATTACHARJEE AK, VAN HAMONT JE, SKILLMAN DR. The medicinal chemistry of botulinum, ricin and anthrax toxins. **Curr Med Chem.** 2005;12(6):667-90.
- IZQUIERDO I (1989) Different forms of post-training memory processing. **Behav Neural Biol** 51:171-202.
- IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MR, IZQUIERDO LA, BARROS DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res** 103:1-11.
- IZQUIERDO LA, BARROS DM, VIANNA MR, COITINHO A, DEDAVID E SILVA T, CHOI H, MOLETTA B, MEDINA JH, IZQUIERDO I (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell Mol Neurobiol** 22:269-287.
- JAEGER, X. Modelos Animais De Disfunção Colinérgica: Papel Da Acetilcolina Na Cognição. 2010.
- JAEGER, X; CAMMAROTA, M.; PRADO, M.A.M.; IZQUIERDO, I.; PRADO, V.P.; PEREIRA, G.S. Decreased acetylcholine release delays the consolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v.238, p. 62-68, 2013.
- JANKOVIC J. Botulinum toxin in clinical practice. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2004 Jul;75(7):951-7. doi: 10.1136/jnnp.2003.034702. PMID: 15201348; PMCID: PMC1739107.

- KAKITANI, F.T., COLLARES, D., KUROZAWA, A.Y., DE LIMA, P.M., TEIVE, H.A., 2010. How many Babinski's signs are there? *Arq. Neuropsiquiatr.* 68, 662–665.
- KHALKI, H., KHALKI, L., ABOUFATIMA, R., OUACHRIF, A., MOUNTASSIR, M., BENHARREF, A., CHAIT, A., 2012. Prenatal exposure to tobacco extract containing nicotinic alkaloids produces morphological and behavioral changes in newborn rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 342–347.
- KLINKENBERG, I.; SAMBETH, A.; BLOKLAND, A. Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research* Volume 221, Issue 2, 10 August 2011, Pages 430-442.
- LIPHAM WJ. What is botulinum toxin and how does it work? In: Lipham WJ. MCGAUGH JL (2000) **Memory--a century of consolidation.** *Science* 287:248-251.
- MEUNIER FA, HERREROS J, SCHIAVO G, POULAIN B, MOLGÓ J. Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at skeletal neuromuscular junction. In: Massaro EJ. **Handbook of neurotoxicology.** Totowa: Human Press; 2002. p 305-47.
- MÜNCHAU, A.; BHATIA, K.P. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *British Medical Journal*, v. 320, p. 161-165, 2000.
- NEPAL, M.R.; JEONG, T.C. Alternative Methods for Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. *Biomolecules and Therapeutics*, v. 28, n. 4, p. 302-310, 2020.
- Neuropsiquiatr.* 2005;63(1):180-5.
- NEWMAN, W.J.; DAVIS, T.L.; PADALIYA, B.B.; et al. Erratum: Botulinum toxin type a therapy during pregnancy. *Movement Disorders*, v. 19, n.11, p. 1384–1385, 2004. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, v. 20, n. 1, 2005.
- of cervical dystonia and hyperhidrosis. *Eur Neurol.* 2003;49(1):34-8.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for the testing of chemicals: **Chronic toxicity studies.** Paris: OECD, 2018. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071209-en.pdf?expires=1623014656&id=id&accname=guest&checksum=4E29728045BA6FDF7CDFDE1C13D66298>>. Acesso em: 12 jan. 2023.
- Pain Pract.* 2004;4 Suppl 1:S19-26.
- PAIVA A, MEUNIER FA, MOLGÓ J, AOKI KR, DOLLY JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(6):3200-5.
- PANTALEON, L.; FUKUSHIMA, A.R.; DE-PAULA, L.R.; RIBEIRO, G.M.; PACCA, B.P.; MUNOS, J.W.P.; SPINOSA, H.S.; RICCI, E.L. Integrative Review: Verification of the Influence of Atrazine Exposure on Behavioral, Neurochemical, and Parkinson's Disease Disorders. *Biomedical Research & Environmental Sciences*, v. 2, n. 10, 1044-1058, 2021.
- PEDRON IG. Therapeutic Indications of the Botulinum Toxin Type A in Dentistry. *Scientific Archive of Dental Sciences.* 2020;3(2):13–4.
- PINTO, W.B.C.R.; SOUZA, P.V.S.; KO, G.M. Avaliação da marcha normal e patológica no camundongo. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.* v. 3, n.1, 2015.

- PIRAZZINI, M.; ROSSETTO, O.; ELEOPRA, R.; et al. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 200-235, 2017.
- POLI MA, LEBEDA FJ. An overview of clostridial neurotoxins. In: Massaro EJ. Handbook of neurotoxicology. **Totowa: Human Press**; 2002. p. 293-304
- POULAIN B, POPOFF MR, MOLGÓ J. How do the botulism neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. **The Botulinum J**. 2008;1(1):14-87.
- ROSENFELD, C.S.; FERGUSON, S.A. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. **J Vis Exp** 2014; (84):e51194.
- SALVONI A, SALVONI T, KAMEZAWA L, AMORIM J, PAGANI C. Botulinum toxin for modulating the muscle strength of patients rehabilitated with zygomatic implants. **Braz Dent Sci**. 2019;22(2):220–7.
- SANDINI, T.M., UDO, M.S.B., REIS-SILVA, T.M., BERNARDI, M.M., SPINOSA, H.S., 2014. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. **Int. J. Dev. Neurosci**. 36, 53–63.
- SANDINI, T.M.; REIS-SILVA, T.M.; MOREIRA, N.; BERNARDI, M.M.; LEBRUN, I.; SPINOSA, H.S. Effects of isoflavones on behavior, estradiol, glutamate, and GABA levels in intact middle-aged female rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, p. 1-12, 2018.
- SCHANTZ. EJ, JOHNSON. EA. Properties and Use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine. **Microbiol Rev**. 1992;56(1):80–99.
- SILBERSTEIN S. **Botulinum neurotoxins**: origins and basic mechanisms of action.
- SILVA, V.; RIUL, T. R.; GOLOVATTEI, M. A. R.; PAUMGARTTER, F. J. R. Ethanol embryofetotoxicity in malnourished rats. **Nutrition Reports Internacional**, v. 36, n. 04, p. 887-895, 1987.
- SPOSITO, M. M. (2009). Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. **Acta fisiátrica**, 16(1):25-37.
- TAN, M.; KIM, E.; KOREN, G.; BOZZO, P. Botulinum Toxin Type A in Pregnancy. **Canadian Family Physician**, v. 59, n. 11, p. 1183-1184, 2013.
- TURTON K, CHADDOCK JA, ACHARYA KR. **Botulinum and tetanus neurotoxins**: structure.
- UDO, M.S.B.; SANDINI, T.M.; REIS, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.45, p.27-33, 2014.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychol. Bull.** 83 (1976) 482–504.
- WERTMAN, V.; GROMOVA, A.; SPADA, A.R.L. CORTES, C.J. Low-Cost Gait Analysis for Behavioral Phenotyping of Mouse Models of Neuromuscular Disease. **Journal of Visualized Experiments**, v. 149, p. 1-6, 2019.
- WIEGAND, H.; ERDMANN, G.; WELLHONER, H. H. 125I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 292, n. 2, p. 161-165, 1976.
- WILSON, J.C. The evolution of teratological tests. **Teratology**, v. 20, p. 205-2011, 1979.

- WILSON, J. G. Embriological Considerations in Teratology. In: WILSON, J.G.; WARKANY, J. **Teratology-Principes and Techniques**. Chicago: The University of Chicago Press, 1965. p.251-261.
- YAMAMOTO, P.K.; SOUZA, T.A.; ANTIORIO, A.T.F.B.; ZANATTO, D.A.; GARCIA-GOMES, M.S.A.; ALEXANDRE-RIBEIRO, S.R.; OLIVEIRA, N.S.; MENCK, C.F.M.; BERNARDI, M.M.; MASSIRONI, S.M.G.; MORI, C.M.C. Genetic and behavioral characterization of Kmt2d mouse mutant, a new model for Kabuki Syndrome. **Genes, Brain and Behavior**, p. 1-12, 2019.
- ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; ABREU, G.R; FUKUSHIMA, A.R.; PANTALEON, L.P.; RIBEIRO, B.B; MUNHOZ, C.; MANES, M.; DE LIMA, M.A.; MIGLIOLI, J.; FLÓRIO, J.C.; LEBRUN, I.; WAZIRY, P.A.F.; AND FONSECA, T.L.; BOCCO, B.M.L. C.; BIANCO, A.; RICCI, E.L.; SPINOSA, H.S. Postpartum depression in rats causes poor maternal care and neurochemical alterations on dams and long-lasting impairment in sociability on the offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 436, p. 114082, 2023.