

GUILHERME MENDES RIBEIRO

**EXPOSIÇÃO GESTACIONAL DE RATAS À TOXINA BOTULÍNICA  
TIPO-A: AVALIAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS SOCIAL E TIPO-  
ANSIOSO DA PROLE**

São Paulo

2024

GUILHERME MENDES RIBEIRO

**Exposição gestacional de ratas à toxina botulínica tipo-a: avaliação dos comportamentos social e tipo-ansioso da prole**

Dissertação de mestrado 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenice de Souza Spinosa

**Co-orientadora:**

Dr<sup>a</sup>. 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).

Ribeiro, Guilherme Mendes  
EXPOSIÇÃO GESTACIONAL DE RATAS À TOXINA BOTULÍNICA TIPO-A:  
AVALIAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS SOCIAL E TIPO-ANSIOSO DA PROLE /  
Guilherme Mendes Ribeiro ; orientador Helenice de Souza  
Spinosa ; coorientador Esther Lopes Ricci.-- São Paulo,  
2024.  
46 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. Toxina botulínica. 2. Ansiedade. 3. Gestação. 4. Comportamento  
social. I. Título.

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



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

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

We certify that the proposal "Study of behavioral and neurophysiological effects of exposure of female rats to botulinum toxin A during pregnancy or lactation and possible neurobehavioral effects on offspring", utilizing 745 **Heterogênicos** 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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676  
Horário de atendimento: 2ª a 5ª das 7h30 às 16h : e-mail: [ceuvet@usp.br](mailto:ceuvet@usp.br)  
CEUA N 8186301121



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna Camilla Mota

Mendes

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



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



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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Esther Lopes Ricci Adari Camargo**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

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

**Dados do projeto de pesquisa:**

**Vigência** - 01/2022 a 02/2023

**Espécie/Linhagem** - Norvegicus/Wistar

**Nº de animais** - 256

**Peso** - 300 e 400 g

**Idade** - 0 a 60 dias

**Sexo** - Macho e fêmea

**Origem dos animais** - Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

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

Atenciosamente,

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera de Moura Azevedo Farah

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIBEIRO, Guilherme Mendes

**Título: Exposição gestacional de ratas à toxina botulínica tipo-A: avaliação dos comportamentos social e tipo-ansioso da prole**

Dissertação de mestrado 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**

Toda a minha gratidão à Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helenice de Souza Spinosa e Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Esther Lopes Ricci por terem acreditado em mim, me orientado e me ensinado muito durante anos, além de todo o apoio e paciência que tiveram comigo por todo o tempo que estivemos juntos.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório Gabriel, Júlia, Leonardo, Lorena, Maria Luiza, Mayara e Victor Hugo, por terem me auxiliado durante toda essa jornada. Esses dois últimos anos foram uma loucura e sem a ajuda de vocês nada disso seria possível.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Patologia por possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho fornecendo grande parte dos materiais.

Agradeço à Universidade Presbiteriana Mackenzie que é presente em minha vida desde o nascimento e colaborou com a elaboração do trabalho.

Agradeço a todos os animais que participaram da elaboração do projeto e possibilitaram sua conclusão.

Dedico um agradecimento especial à minha família, por sempre terem me aconselhado e apoiado minhas escolhas durante toda a minha vida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Por esse motivo agradeço também à CAPES pelo apoio financeiro e por possibilitar que o departamento continue prosperando, recebendo muitos alunos, desenvolvendo novas pesquisas, trazendo novas ideias e gerando resultados.



## RESUMO

RIBEIRO, G.M. **Exposição gestacional de ratas à toxina botulínica tipo-A: avaliação dos comportamentos social e tipo-ansioso da prole.** 2024. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A toxina botulínica tipo-A é utilizada para o tratamento de diversas enfermidades que acometem o ser humano, bem como em procedimentos estéticos. Contudo, as agências reguladoras, internacionais e nacional, no âmbito da saúde enquadram a toxina botulínica na categoria C de risco de gravidez, tornando seu uso contraindicado durante a gestação, sendo recomendada apenas se o benefício justificar o risco potencial para o feto. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar os comportamentos social e tipo-ansioso das proles de ratas expostas durante a gestação (5º dia gestacional) à toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg, por via intramuscular). Os testes comportamentais foram realizados nas proles masculina e feminina na infância e idade adulta, sendo eles: comportamento de brincar, interação social, labirinto em cruz elevado, *grooming* espontâneo e *marble burying test*. Os resultados obtidos mostraram que a exposição gestacional de ratas à toxina botulínica tipo-A não interferiu em nenhum dos parâmetros analisados nos diferentes testes comportamentais. Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que a exposição gestacional de ratas à toxina botulínica tipo-A não causou alterações no comportamento social e tipo-ansioso da prole, tanto na infância quanto na idade adulta, de ambos os sexos. Esses resultados podem contribuir, juntamente com outros, para o uso mais seguro desse medicamento durante a gestação.

Palavras-chave: Toxina botulínica. Ansiedade. Gestação. Comportamento social.

## **ABSTRACT**

RIBEIRO, G.M. **Gestational exposure of rats to botulinum toxin type-A: evaluation of the social and anxiety-like behaviors of the offspring.** 2024. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Botulinum toxin type-A is utilized for the treatment of various illnesses affecting humans, as well as in aesthetic procedures. However, international and national regulatory agencies within the realm of health categorize botulinum toxin as a Category C risk for pregnancy, rendering its use contraindicated during gestation, and recommended only if the benefit justifies the potential risk to the fetus. Thus, the aim of this study was to investigate the social and anxiety-like behaviors of rat offspring exposed during gestation (5th gestational day) to botulinum toxin type-A (4, 8, or 16 U/kg, intramuscularly). Behavioral tests were conducted on male and female offspring in infancy and adulthood, including play behavior, social interaction, elevated plus maze, spontaneous grooming, and marble burying test. The results showed that gestational exposure of rats to botulinum toxin type-A did not interfere with any of the parameters analyzed in the different behavioral tests. Based on the presented results, it can be concluded that gestational exposure of rats to botulinum toxin type-A did not cause alterations in social and anxiety-like behavior of offspring, both in infancy and adulthood, of both sexes. These findings may contribute, along with others, to the safer use of this medication during pregnancy.

Keywords: Botulinum toxin. Anxiety. Gestation. Social behavior.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Parâmetros do comportamento de brincar da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....26
- Figura 2 – Parâmetros do comportamento de brincar da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....27
- Figura 3 – Parâmetros da interação social da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....28
- Figura 4 – Parâmetros da interação social da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....29
- Figura 5 – Parâmetros do avaliados no labirinto em cruz elevado na infância da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....30
- Figura 6 – Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado realizado na infância da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....31
- Figura 7 – Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado realizado na fase adulta da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina

(NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ . .....	32
Figura 8 – Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado realizado na fase adulta da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ .....	32
Figura 9 – Parâmetros avaliados do <i>grooming</i> espontâneo realizado durante a infância da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ . .....	34
Figura 10 – Parâmetros do <i>grooming</i> espontâneo avaliados durante a infância da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ .....	34
Figura 11 – Parâmetros do <i>grooming</i> espontâneo avaliados na fase adulta da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ .....	35
Figura 12 – Parâmetros do <i>grooming</i> espontâneo avaliados na fase adulta da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ .....	36
Figura 13 – Parâmetros avaliados no <i>marble burying test</i> realizado na infância e na fase adulta da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA, $p>0,05$ . .....	36

Figura 14 – Parâmetros avaliados no *marble burying test* realizado na infância e na fase adulta da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9%– CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ . .....37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 TOXINA BOTULÍNICA DURANTE A GRAVIDEZ .....	16
1.2 RELAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA COM A ANSIEDADE .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 TOXINA BOTULÍNICA TIPO-A.....	20
3.2 ANIMAIS E TRATAMENTO.....	20
3.3 PROCEDIMENTOS.....	21
<b>3.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez</b> .....	21
<b>3.3.2 Nascimento, sexagem e padronização da prole</b> .....	21
<b>3.3.3 Comportamento de brincar</b> .....	21
<b>3.3.4 Interação social</b> .....	22
<b>3.3.5 Labirinto em cruz elevado</b> .....	23
<b>3.3.6 Grooming espontâneo</b> .....	24
<b>3.3.7 Marble burying test</b> .....	24
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>4. RESULTADOS</b> .....	26
4.1 COMPORTAMENTO DE BRINCAR DA PROLE MASCULINA E FEMININA .....	26
4.2 INTERAÇÃO SOCIAL DA PROLE MASCULINA E FEMININA.....	27
4.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DA PROLE MASCULINA E FEMININA .....	30
4.4 GROOMING ESPONTÂNEO DA PROLE MASCULINA E FEMININA.....	33
4.5 MARBLE BURYING TEST DA PROLE MASCULINA E FEMININA.....	36
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

A bactéria patogênica *Clostridium botulinum*, produtora da toxina botulínica, foi identificada em 1895, durante uma investigação sobre um surto de intoxicação alimentar em Ellezelles, na Bélgica (DEVRIESE, 1999), porém seu potencial terapêutico foi inicialmente vislumbrado pelo poeta e físico alemão Justinus Kerner em 1817, onde descreveu corretamente que essa toxina provocava a paralisia dos músculos esqueléticos e afetava a função parassimpática, levando à sugestão de que a toxina poderia ser empregada como um agente terapêutico (ERBGUTH; NAUMANN, 1999).

O *C. botulinum* é uma bactéria anaeróbia, gram-positiva, formadora de esporos e em forma de bastonete, produtora da toxina botulínica, considerada uma das substâncias biológicas mais tóxicas conhecidas no mundo. Essa neurotoxina bloqueia a liberação do neurotransmissor acetilcolina, devido a degradação da sinaptobrevina, o que impede a fusão da vesícula sináptica com a membrana da terminação axônica do neurônio colinérgico; assim, observa-se interferência no reflexo espinal de estiramento através do bloqueio de fibras musculares intrafusais, redução do tono muscular, bem como bloqueio de fibras autonômicas para músculos lisos e glândulas exócrinas (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005; NEPAL; JEON, 2020).

O *C. botulinum* produz oito exotoxinas antigenicamente distinguíveis: A, B, C1, C2, D, E, F e G; todos os sorotipos interferem na transmissão neural bloqueando a liberação de acetilcolina (NIGAM; NIGAM, 2010). Embora todos esses sorotipos inibam a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos colinérgicos, as proteínas-alvo intracelulares, as características de ação e as potências variam substancialmente, sendo o sorotipo A o mais amplamente estudado para fins terapêuticos (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005).

As enfermidades para as quais a toxina botulínica A tem indicação são: distúrbios do movimento – distonia, espasmo hemifacial, tremores, tiques, bruxismo, neuromiotonia –, espasticidade, distúrbios hipersecretórios – hiperidrose, sialorreia, hiperlacrimação, rinorreia –, distúrbios oftálmicos – estrabismo, nistagmo, exotropia, esotropia, entrópio, ptose protetora –, dor – cefaleia tensional, enxaqueca, dor miofascial –, distúrbios do assoalho pélvico e gastrointestinais – acalasia (distúrbio de motilidade esofágica), fissuras anais, espasmos do esfíncter vesical, anismo



(contração paradoxal do músculo puborretal), vaginismo –, aplicações cosméticas – linhas faciais hiperkinéticas, assimetrias faciais –, apraxia de abertura das pálpebras, tétano, fixações perioperatórias em cirurgia ortopédica, etc. (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005; COLHADO; BOEING; ORTEGA, 2009; CHEN et al., 2012.).

No Brasil, atualmente, há algumas marcas de toxina botulínica tipo-A aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora vinculada ao Ministério da Saúde, responsável pela fiscalização, monitoramento e registro de produtos, dentre eles os medicamentos, sendo algumas delas: Botox<sup>®</sup>, produzida pela empresa farmacêutica americana Allergan (*OnaBotulinum Toxin A*); Dysport<sup>®</sup>, produzida pela empresa farmacêutica francesa Ipsen (*AboBotulinum Toxin A*); Xeomin<sup>®</sup>, produzida pela empresa farmacêutica alemã Merz Pharmaceuticals (*IncoBotulinum Toxin A*); Prosigne<sup>®</sup>, produzida pela empresa chinesa Lanzhou Biological Products Institute (*Ianbotulinum toxin A*); Botulift<sup>®</sup>, produzida pelo laboratório sul-coreano Medytox; Botulim<sup>®</sup>, fabricado na Coreia do Sul pelo laboratório Hugel; e Nabota<sup>®</sup>, também produzida na Coreia do Sul pelo laboratório Daewoong Pharmaceutical.

A farmacocinética de doses terapêuticas da toxina botulínica tipo-A foi investigada em modelos *in vivo*, através da aplicação da toxina botulínica no músculo gastrocnêmio de gatos. Essa avaliação cinética evidenciou que a distribuição sistêmica do produto é pequena; isso pode ser explicado pela avidez de ligação entre a toxina e os receptores colinérgicos nos neurônios pré-sinápticos, porém, após a administração pela via intramuscular observou-se lenta difusão no músculo, seguida de rápida metabolização sistêmica e extensa excreção urinária (WIEGAND; ERDMANN; WELLHONER, 1976).

Quando aplicada pela via intramuscular, a quantidade de substância aplicada reduz-se a aproximadamente metade, em um tempo de 10 horas. Nas 24 horas após a aplicação, cerca de 60% da substância é excretada pela urina. A principal via de metabolização ocorre pelas enzimas proteases, enquanto os componentes moleculares transformam-se ao longo de circuitos metabólicos normais (AOKI, 1995).

Os estudos farmacocinéticos e toxicocinéticos *in vivo* são importantes ferramentas na avaliação da segurança das substâncias, visando o uso terapêutico. Nesse sentido, Pirazzini et al. (2017) relataram que existe carência de estudos conclusivos sobre a farmacocinética da toxina botulínica tipo-A nas doses terapêuticas, o que faz que seja contraindicada na gravidez, durante a amamentação

e para crianças com menos de 12 anos. Eventualmente, quando crianças são expostas, o monitoramento cuidadoso é importante, pois pode alterar as funções celulares, como, por exemplo, o crescimento e desenvolvimento de axônios (NEWMAN et al., 2004; MÜNCHAU; BHATIA, 2000).

A *U.S. Food and Drug Administration* (FDA – agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos) enquadra a toxina botulínica na categoria C de risco de gravidez – os estudos em animais têm demonstrado que esses medicamentos podem exercer efeitos teratogênicos ou é tóxico para os embriões, mas não há estudos controlados em mulheres ou não há estudos controlados disponíveis em animais nem em seres humanos – e defende que ela deve ser administrada durante esse período apenas se o benefício justificar o risco potencial para o feto (MORGAN et al., 2006; PIRAZZINI et al., 2017; FDA, 2021).

Essa toxina possui uma cadeia única com peso molecular de 150 kDa (SIMPSON, 1986), que se divide em duas cadeias, sendo uma pesada de 100 kDa e uma leve de 50 kDa, após a ocorrência de uma clivagem proteolítica (ROSSETTO et al., 1995). Moléculas com pesos menores do que 500 Daltons possuem uma transferência incompleta através da placenta, portanto devido a esse peso elevado da toxina, é improvável que ela atravesse a placenta por transporte passivo, porém a possibilidade de atravessar a barreira placentária por transporte ativo não é descartada (PEARCE, 2014). Além disso, apesar de haver número crescente de relatos de que o botulismo, doença neuromuscular grave, causada pela ação da toxina produzida pelo *C. botulinum* – que entra no organismo por meio de ferimentos ou pela ingestão de alimentos contaminados, os quais não têm produção e/ou conservação adequada –, ou o uso terapêutico da toxina não acarreta danos ao feto, não foi realizado nenhum acompanhamento a longo prazo das crianças gerados por mães expostas à toxina durante a gravidez (PEARCE, 2014).

### 1.1 TOXINA BOTULÍNICA DURANTE A GRAVIDEZ

A Allergan Inc., fabricante do Botox®, apresentou resultados de estudos que avaliaram os efeitos da toxina durante a gestação em roedores e coelhos. Roedores fêmeas prenhes expostas as doses de 4, 8 ou 16 U/kg de Botox®, por via intramuscular, 2 vezes durante o período de organogênese, tiveram filhotes com peso

corporal reduzido e diminuição da ossificação esquelética fetal nas duas doses mais altas (ALLERGAN, INC., 2021).

A administração diária de Botox® por via intramuscular em ratas prenhes nas doses de 0,125, 0,25, 0,5, 1, 4 ou 8 U/kg ou em coelhos nas doses de 0,063, 0,125, 0,25 ou 0,5 U/kg durante todo o período de organogênese, que dura 12 dias em ratos e 13 em coelhos, resultou em menores pesos corporais fetais e diminuição da ossificação esquelética fetal nas duas doses mais elevadas. Essas doses também causaram toxicidade materna, caracterizada por abortos, partos prematuros e morte materna (ALLERGAN, INC., 2021). Outros resultados apresentados pela Allergan Inc. mostraram que doses intramusculares únicas aplicadas em ratas gestantes (1, 4 ou 16 U/kg) em três diferentes períodos de desenvolvimento (antes da implantação, implantação ou organogênese), não acarretaram nenhum efeito no desenvolvimento fetal (ALLERGAN, INC., 2021).

Em 2004, Newman e colaboradores documentaram o primeiro caso conhecido de uma gestante com distonia cervical idiopática, que recebeu três injeções de toxina botulínica durante a gravidez. As injeções foram administradas nas semanas 15 (200 U), 21 (100 U) e 32 (300 U) da gestação. Ao longo da gestação, o tratamento com a toxina resultou em uma melhora significativa nos sintomas da distonia cervical, que retornavam aproximadamente a cada 3 a 4 meses após cada aplicação. Além disso, nos nove anos seguintes, a paciente engravidou em três ocasiões, recebendo a toxina várias vezes durante cada gravidez. Em todas as três gestações as injeções proporcionaram resultados positivos e a paciente deu luz à bebês saudáveis apesar da falta de avaliações diretas dessas crianças.

Outro relato de caso descreveu uma paciente que recebeu injeções de toxina botulínica durante a gravidez para tratar distonia cervical idiopática dolorosa (ARANDA et al., 2012). Os médicos realizaram a aplicação da toxina uma vez no segundo e outra no terceiro trimestre da gravidez, utilizando as mesmas doses e locais de aplicação padrões de antes da gestação: 40 UI no músculo esternocleidomastoideo esquerdo, 150 UI no músculo esplênio direito e mais 60 UI divididos entre os músculos trapézio direito e elevador da escápula direita. A dose total ao longo da gravidez foi de 500 UI. Durante a 40ª semana de gestação a paciente deu à luz naturalmente a um bebê saudável.

No ano de 2016, Brin e colaboradores compartilharam os resultados de uma série de casos envolvendo mulheres grávidas que receberam injeções locais de toxina

botulínica, por diferentes razões, nos últimos 24 anos. De um total de 137 nascimentos (139 fetos, devido ao nascimento de gêmeos), 110 deles (equivalente a 79,1%) resultaram em bebês nascidos vivos, enquanto 29 deles (equivalente a 20,9%) terminaram em perda fetal, sendo 21 abortos espontâneos e 8 abortos provocados. Dentre os nascidos vivos, 106 deles (equivalente a 96,4%) foram considerados normais, enquanto quatro apresentaram problemas, sendo um com defeito fetal primário, dois com malformações fetais menores e um que apresentou complicações no parto. Nesse mesmo ano, mais seis relatos de casos publicados foram revisados e concluíram que o botulismo clínico não parece ter efeitos adversos diretos relacionados à gravidez ou ao feto (BRIN et al., 2016).

## 1.2 RELAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA COM A ANSIEDADE

O uso da toxina botulínica para gerenciar a ansiedade em seres humanos tem se tornado um conceito em evolução. De acordo com o estudo de Dong et al. (2018), 90 casos de pacientes com espasmo hemifacial e outros 90 casos de pacientes com blefaroespasma essencial benigno submetidos ao tratamento com toxina botulínica apresentaram significativa diminuição de escore na “Escala de Autoavaliação de Ansiedade de Zung” e “Escala de Autoavaliação da Depressão de Zung” em comparação com o escore anterior ao tratamento. Em outro estudo, 25 participantes foram divididos entre dois grupos: 1) participantes que receberam tratamento com toxina botulínica na testa e outras terapias e 2) participantes que não receberam tratamento com toxina botulínica, mas fizeram uso de outras terapias (LEWIS; BOWLER, 2009). Para medir o humor dos participantes, os dois grupos foram submetidos a um questionário que incluía uma cópia do *Irritability-Depression-Anxiety Scale* (IDAS) e como resultado eles observaram que o grupo de participantes que recebeu o tratamento com a toxina na testa apresentaram menores escores de ansiedade e depressão (LEWIS; BOWLER, 2009).

Em um estudo com animais, os camundongos foram divididos em dois grupos, sendo um grupo controle tratado com solução salina e um grupo experimental tratado com 50 U de toxina botulínica. Trinta dias após o tratamento, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. Como resultado desse estudo, os pesquisadores observaram diminuição nos

níveis de comportamento tipo-ansioso dos camundongos tratados com a toxina em relação aos animais do grupo controle (YESUDHAS et al., 2021).

Baseado nas evidências científicas apresentadas, é possível inferir que a toxina botulínica tem potencial de apresentar efeito ansiolítico, porém a literatura científica ainda é muito escassa no que tange aos estudos sobre seus possíveis efeitos ansiolíticos e sobre seu uso durante a gravidez e, principalmente, as consequências na prole.

Considerando que a toxina botulínica tipo-A vem sendo cada vez mais utilizada para o tratamento de distúrbios do movimento que acometem os seres humanos, que há poucos estudos sobre a exposição gestacional e as consequências na prole, tanto a curto quanto a longo prazo, e que estudos farmacocinéticos sugerem que essa toxina possa atravessar a barreira placentária por transporte ativo, podendo causar alterações no desenvolvimento fetal, se faz necessário aprofundar os estudos sobre os possíveis efeitos na prole exposta durante o período gestacional a essa toxina.

## 2 OBJETIVOS

Estudar os comportamentos social e tipo-ansioso das proles masculina e feminina de ratas expostas durante a gestação à toxina botulínica tipo-A, durante o período da infância e idade adulta.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar durante a infância e idade adulta, nas proles masculina e feminina, de ratas expostas durante a gestação à toxina botulínica tipo-A, os comportamentos social e tipo-ansioso por meio dos testes:

- Comportamento de brincar;
- Interação social;
- Labirinto em cruz elevado
- *Grooming* espontâneo;
- *Marble burying test*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 TOXINA BOTULÍNICA TIPO-A

Foi utilizada a toxina botulínica tipo-A comercializada com o nome de Botulim<sup>®</sup>, em frasco-ampola contendo o pó líofilo injetável de 100 U, produzida pelo laboratório sul-coreano Hugel e distribuída no Brasil pela Blau Farmacêutica. A toxina foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e misturada suavemente no próprio frasco para evitar borbulhamento, uma vez que fortes agitações poderiam causar a desnaturação da molécula. Os frascos de Botulim<sup>®</sup> foram armazenados sob refrigeração de 2°C a 8°C.

#### 3.2 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados 11 ratos Wistar provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Esses animais foram acasalados, a fim de se obter 32 ratas prenhas e suas respectivas ninhadas.

Os animais ficaram alojados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalha como substrato e mantidos em uma sala com umidade relativa do ar de 55% ± 10, temperatura controlada (22°C ± 2°C) e ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz acesa às 6 h). Os animais receberam água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

A toxina botulínica tipo-A foi administrada, em dose única, por via intramuscular no músculo gastrocnêmio, no membro pélvico direito da rata no 5º dia de gestação (início do período de organogênese), em volume inferior a 0,3 ml com agulha 25G, nas doses de 4, 8 ou 16 U/kg. O grupo controle recebeu apenas solução fisiológica (NaCl 0,9%), pela mesma via e volume, também no 5º dia gestacional.

Essas doses de toxina botulínica tipo-A foram escolhidas considerando estudos prévios realizados pelo laboratório Allergan Inc., produtor do Botox<sup>®</sup>, conforme comentado na anteriormente.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sob o protocolo de N° 8186301121 e pelo processo CEUA/UPM N° 016-12-2021 e N° 07-11-2022 da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

### 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, um dos machos permaneceu com apenas duas fêmeas. Na manhã seguinte foi feito o esfregaço vaginal das fêmeas para o diagnóstico de prenhez. Esse procedimento consistiu na introdução de um *swab* umedecido com solução salina no orifício vaginal da fêmea para coleta de material. O diagnóstico de prenhez foi considerado positivo quando detectada presença de espermatozoide no esfregaço vaginal após observação em microscopia.

#### 3.3.2 Nascimento, sexagem e padronização da prole

As ratas gestantes foram observadas todos os dias para verificar o nascimento dos filhotes, e estas não foram manipuladas até o dia do nascimento de suas proles; o dia do nascimento foi considerado o dia pós-natal 1 (DPN1). No DPN2 foi realizada a sexagem e a padronização do número de filhotes por fêmea parida para oito e, sempre que possível, foram deixados quatro fêmeas e quatro machos por ninhada. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação ainda no DPN2.

#### 3.3.3 Comportamento de brincar

Para avaliar o comportamento social na infância foi realizado o teste do comportamento de brincar, que ocorreu no DPN30, pois é ao redor deste período (início em torno do DPN15 e atinge o pico por volta do DPN36) que ratos exibem esse comportamento com maior intensidade (PLETNIKOV et al., 1999; VIEIRA; SARTORIO, 2002) e, com o isolamento prévio do animal, há exacerbação dos episódios dessa interação social quando realizada após o término do período de isolamento e o subsequente pareamento de animais (FILE; SETH, 2003).

Assim, no DPN25 os ratos foram mantidos em duas condições de alojamento: isolado (sozinho na caixa moradia, mas na mesma sala com outros animais) ou em grupo (dois animais da mesma ninhada por caixa moradia). Esses animais isolados ou agrupados permaneceram nessas condições até o DPN30.



No DPN30 foi realizado o teste que consiste na introdução de um animal agrupado (intruso) na caixa moradia do animal isolado (residente), tomando-se o cuidado para que os indivíduos possuam pesos similares (diferença de até 10 g). O pareamento foi realizado com animais que receberam o mesmo tratamento, ou seja, controles foram confrontados com controles e experimentais foram confrontados com experimentais.

Imediatamente antes do início do experimento, as caixas de um animal isolado e de uma dupla agrupada foram levadas para a sala de observação comportamental, por 5 minutos, para a aclimatação. Após este período, um intruso foi colocado na caixa de um residente, dando início a filmagem com duração de 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- 1) *pinning* ou comportamento de brincar propriamente dito: frequência com que um animal fica em decúbito dorsal, expondo seu ventre para o outro, que, por sua vez, se posiciona sobre ele;
- 2) rotação-parcial: frequência com que um animal não fazia o *pinning* completo;
- 3) farejar: tempo (em segundos) que o animal passou farejando o outro;
- 4) perseguir: tempo total (em segundos) que um animal passou perseguindo o outro;
- 5) passar sob/sobre: frequência com que um animal passou sobre ou sob o outro.

### **3.3.4 Interação social**

Para avaliar a sociabilidade dos animais na idade adulta foi realizado o teste da interação social (ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2019). Esse teste consistiu na observação do comportamento de uma dupla de animais desconhecidos na arena do campo aberto, realizado a partir do DPN61, levando em conta três parâmetros utilizados na avaliação da sociabilidade na infância (farejar, perseguir e passar sob/sobre). A variação de peso entre esses animais não foi superior a 20 g. Para isso, no primeiro dia, cada animal foi colocado isoladamente no campo aberto por 10 minutos para habituação no aparato. No segundo dia, a dupla de ratos foi colocada no campo aberto por 10 minutos para habituação ao parceiro. No terceiro dia, foi realizado o teste propriamente dito, quando a dupla foi colocada novamente no campo

aberto e o comportamento do animal alvo foi observado e filmado por 10 minutos. Foram observados os seguintes parâmetros:

- 1) tempo (em segundos) de farejar o outro animal da dupla;
- 2) tempo (em segundos) de perseguir o outro animal da dupla;
- 3) quantidade de vezes que um animal passou sob/sobre o outro animal da dupla;
- 4) tempo total de interação social: corresponde a soma entre o tempo de farejar e o tempo de perseguir, em segundos.

### 3.3.5 Labirinto em cruz elevado

O Labirinto em cruz elevado, utilizado para avaliar o comportamento tipicamente ansioso dos roedores, foi realizado no DPN22, período referente a fase infantil, e no DPN60, período referente a fase adulta. Esse teste é fundamentado na aversão desses animais a espaços abertos (PELLOW et al., 1985).

O aparato possui um formato de cruz, sendo composto por dois braços abertos opostos, com dimensões de 50 x 10 cm, dois braços fechados opostos, com dimensões de 50 x 10 x 40 cm e uma plataforma central medindo 10 x 10 cm. Os braços são posicionados a um ângulo de 90°, enquanto o aparato fica a uma altura de 50 cm em relação ao solo (HOGG, 1996).

Os animais foram colocados no centro do aparato e o comportamento foi gravado durante 5 minutos para a posterior quantificação dos parâmetros:

- 1) Frequência de entradas nos braços abertos;
- 2) Frequência de entradas nos braços fechados;
- 3) Tempo (em segundos) de permanência nos braços fechados;
- 4) Tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos;
- 5) Frequência de *head-dipping*: número de vezes em que o animal estica a cabeça para fora do aparato;
- 6) Frequência da avaliação de risco: número de vezes em que o animal estica o corpo para farejar outra área, sem sair daquela na qual se encontra.

### 3.3.6 *Grooming* espontâneo

O *grooming* é o comportamento de autolimpeza, comum e inato em espécies de roedores. É descrito como um padrão-fixo de ação com função primária de higiene e cuidados da pele e pelos, sendo que um roedor passa de 30 a 50% do seu tempo acordado realizando *grooming* (KALUEFF et al., 2007). O *grooming* tem se mostrado uma alternativa para a avaliação do comportamento tipo-ansioso (KALUEFF et al., 2007).

Para avaliação do *grooming* espontâneo, foi utilizada uma caixa de acrílico, medindo 30 x 30 x 30 cm. Nos dois dias anteriores ao dia do teste, cada animal foi colocado no aparato por 5 minutos para habituação. No terceiro dia, os animais foram colocados no aparato por 15 minutos. A gravação do *grooming* espontâneo foi realizada nos DPN24, representando o período da infância, e no DPN62, representando o período adulto, para a posterior análise dos resultados. Os parâmetros observados foram:

- 1) - Latência para o primeiro *grooming*;
- 2) Tempo (em segundos) de *grooming*;
- 3) Frequência de *grooming*.

### 3.3.7 *Marble burying test*

O “teste de esconder esferas” (*marble-burying test*) tem sido utilizado em estudos com roedores para detectar compostos com efeitos ansiolíticos (POLING; CLEARY; MONAGHAN, 1981; NICOLAS; KOLB; PRINSSEN, 2006) e também na avaliação dos efeitos ansiogênicos do estresse ao longo do tempo (KEDIA; CHATTARJI, 2014). Esse teste é baseado no comportamento característico dos roedores, tanto em seu habitat natural quanto em condições de laboratório, que é o chamado de enterramento defensivo: cobrir as fontes localizadas de estímulo aversivo ou perigo potencial (esferas de vidro) com a maravalha que cobre o chão da caixa (NICOLAS; KOLB; PRINSSEN, 2006). Acrescenta-se, ainda, que o comportamento de cavar é inato em roedores e em laboratório pode ser usado para avaliar o comportamento tipo-ansioso, uma vez que, segundo Deacon (2006), os ratos enterram as esferas ou porque estas promovem um comportamento tipo-ansioso ou porque estão hiperativos e/ou “obsessivos-compulsivos”.

Para avaliar o comportamento tipo-ansioso nos animais tratados com toxina botulínica tipo-A, caixas idênticas a caixa moradia foram preenchidas com uma camada de maravalha e foram distribuídas 20 esferas de vidro maciço dispostas paralela e perpendicularmente por toda a caixa. Logo após esse procedimento os animais foram introduzidos nessas caixas e, depois de 30 minutos, foram devolvidos para a caixa moradia para a contabilização de quantas bolinhas foram, ao menos, 2/3 enterradas. Esse teste ocorreu nos DPN24 e DPN62. Os dados obtidos foram tabulados para posteriormente serem submetidos à análise estatística.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 8<sup>®</sup> (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homoscedasticidade dos dados. Para os dados paramétricos foram utilizados ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett. O nível de significância para todas as análises foi de  $p < 0,05$ .

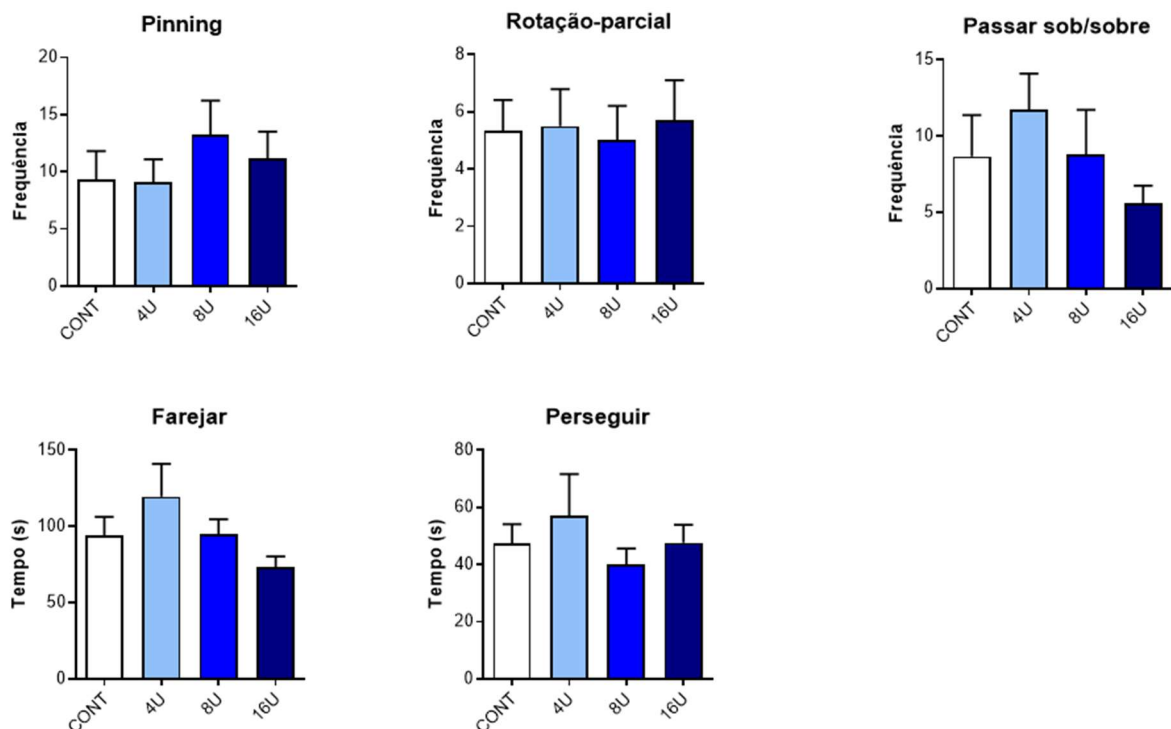
## 4. RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos nas avaliações dos comportamentos social e tipo-ansioso da prole masculina e feminina, nos períodos da infância e fase adulta, de ratas expostas durante a gestação à toxina botulínica tipo-A.

### 4.1 COMPORTAMENTO DE BRINCAR DA PROLE MASCULINA E FEMININA

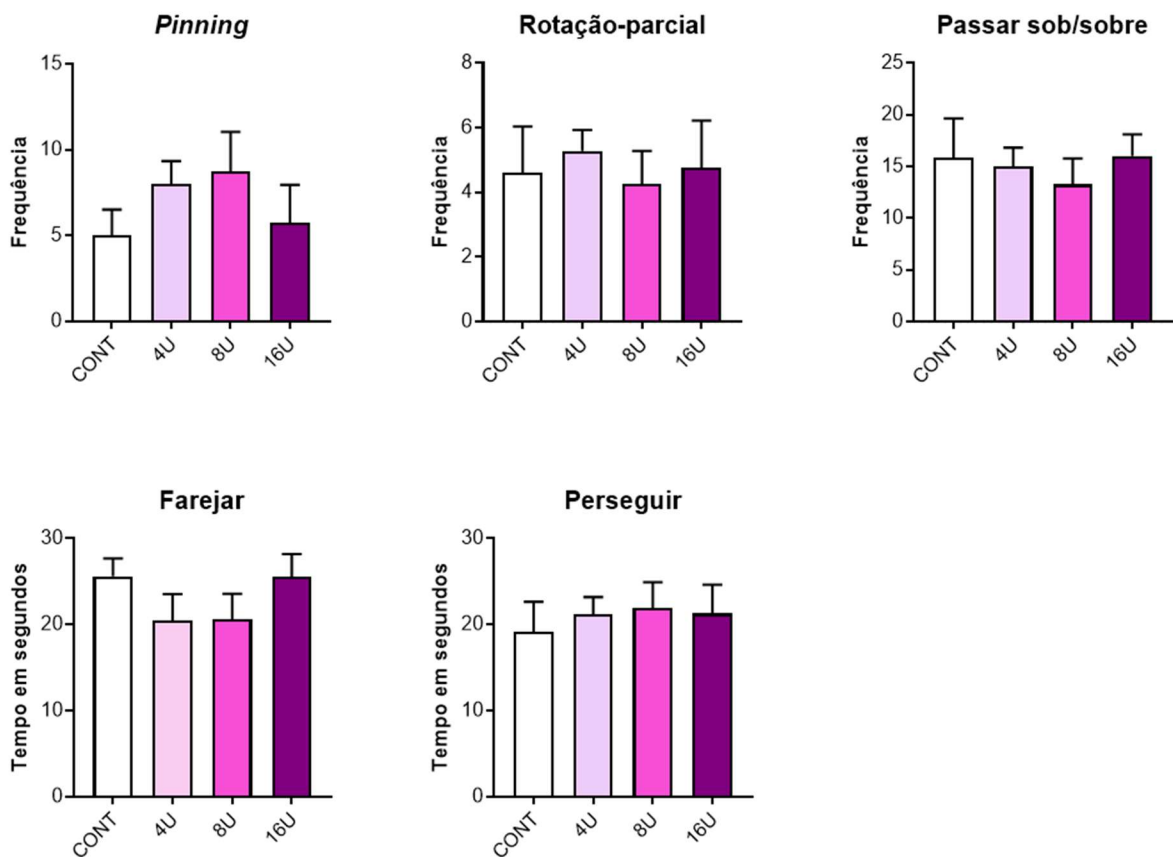
A Figura 1 apresenta os resultados do teste que avaliou o comportamento de brincar, no DPN30, da prole masculina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: frequência de *pinning* ( $F(3,25)=0,2212$ ;  $p>0,05$ ); frequência de rotação parcial ( $F(3,25)=0,1170$ ;  $p>0,05$ ); passar sob ou sobre ( $F(3,25)=1,105$ ;  $p>0,05$ ); tempo de farejar ( $F(3,25)=1,793$ ;  $p>0,05$ ) e tempo de perseguir ( $F(3,25)=0,5676$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 1 – Parâmetros do comportamento de brincar da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



A Figura 2 apresenta os resultados do teste que avaliou o comportamento de brincar, no DPN 30, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: *pinning* ( $F(3,24)=0,7427$ ;  $p>0,05$ ); rotação-parcial ( $F(3,24)=0,1364$ ;  $p>0,05$ ); passar sob/sobre ( $F(3,24)=0,2741$ ;  $p>0,05$ ); farejar ( $F(3,24)=1,018$ ;  $p>0,05$ ) e perseguir ( $F(3,24)=0,1179$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 2 – Parâmetros do comportamento de brincar da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .

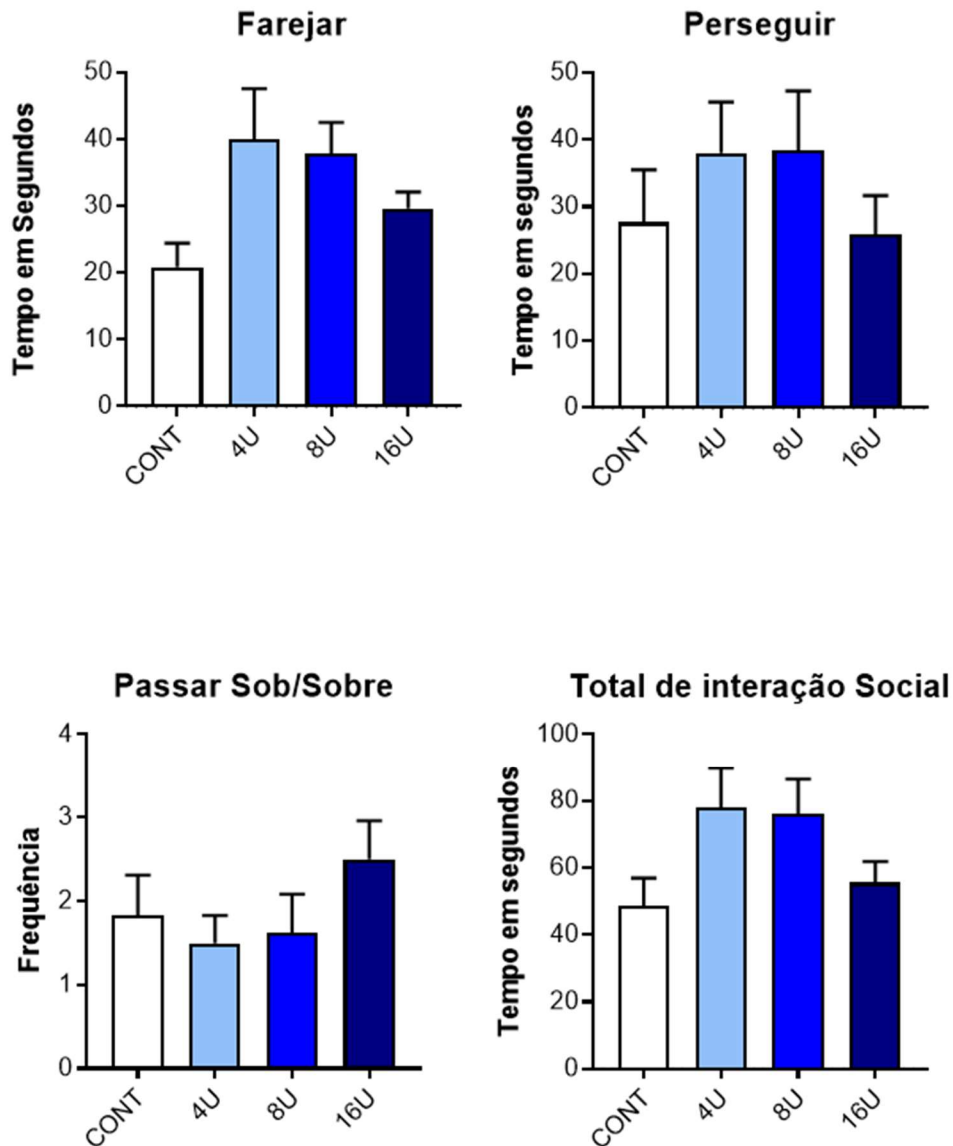


#### 4.2 INTERAÇÃO SOCIAL DA PROLE MASCULINA E FEMININA

A Figura 3 apresenta os resultados do teste que avaliou a interação social, no DPN 61, da prole masculina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: farejar ( $F(3,26)=2,580$ ;  $p>0,05$ ); perseguir ( $F(3,26)=0,7584$ ;  $p>0,05$ ); total

de interação social ( $F(3,26)=2,235$ ;  $p>0,05$ ) e passar sob/sobre ( $F(3,26)=0,8100$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 3 – Parâmetros da interação social da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .

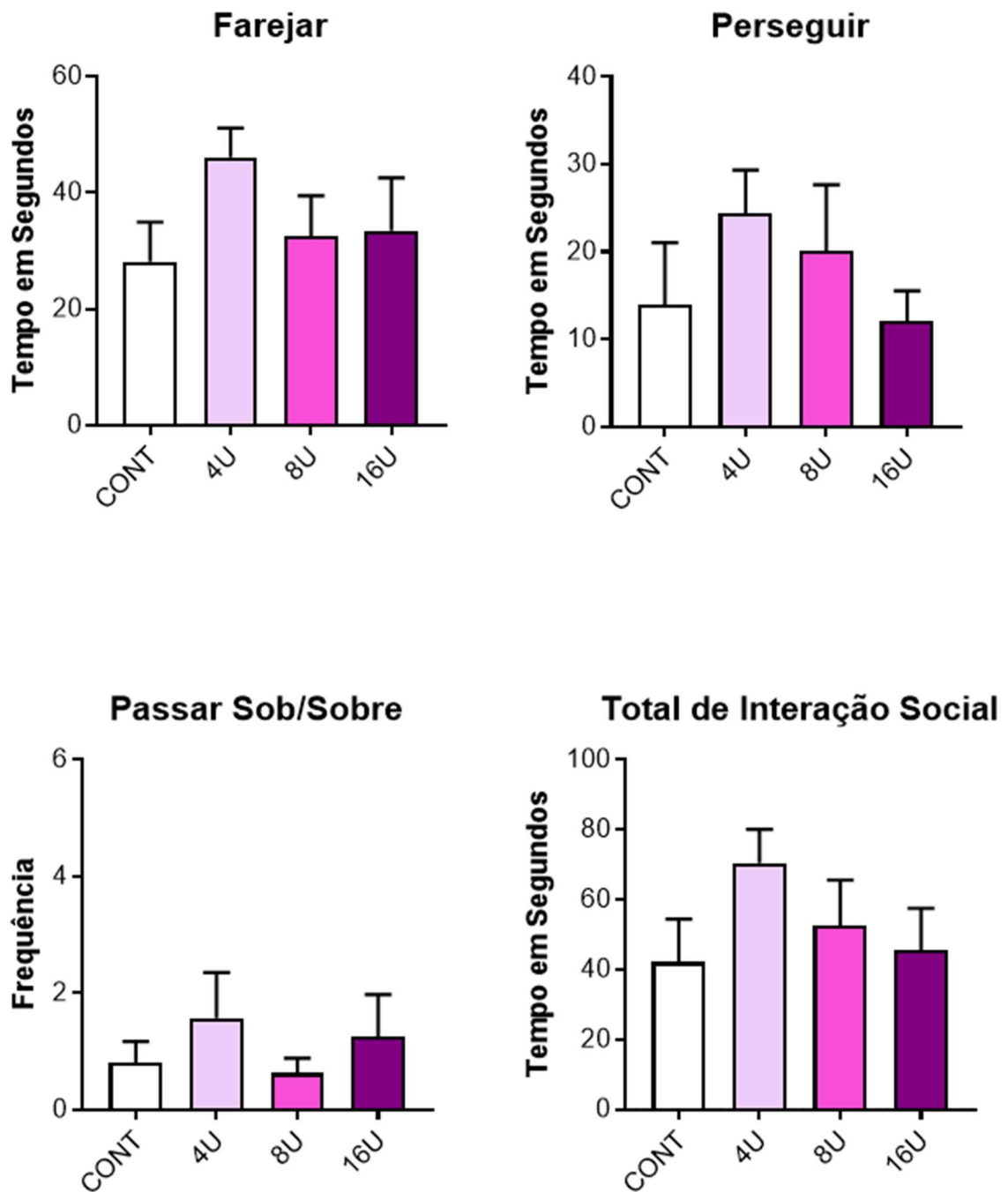


A Figura 4 apresenta os resultados do teste que avaliou a interação social, no DPN 61, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: farejar ( $F(3,24)=0,9972$ ;  $p>0,05$ ); perseguir ( $F(3,24)=0,9368$ ;  $p>0,05$ );



passar sob/sobre ( $F(3,24)=0,5129$ ;  $p>0,05$ ) e total de interação social ( $F(3,24)=1,048$ ;  $p>0,05$ ).

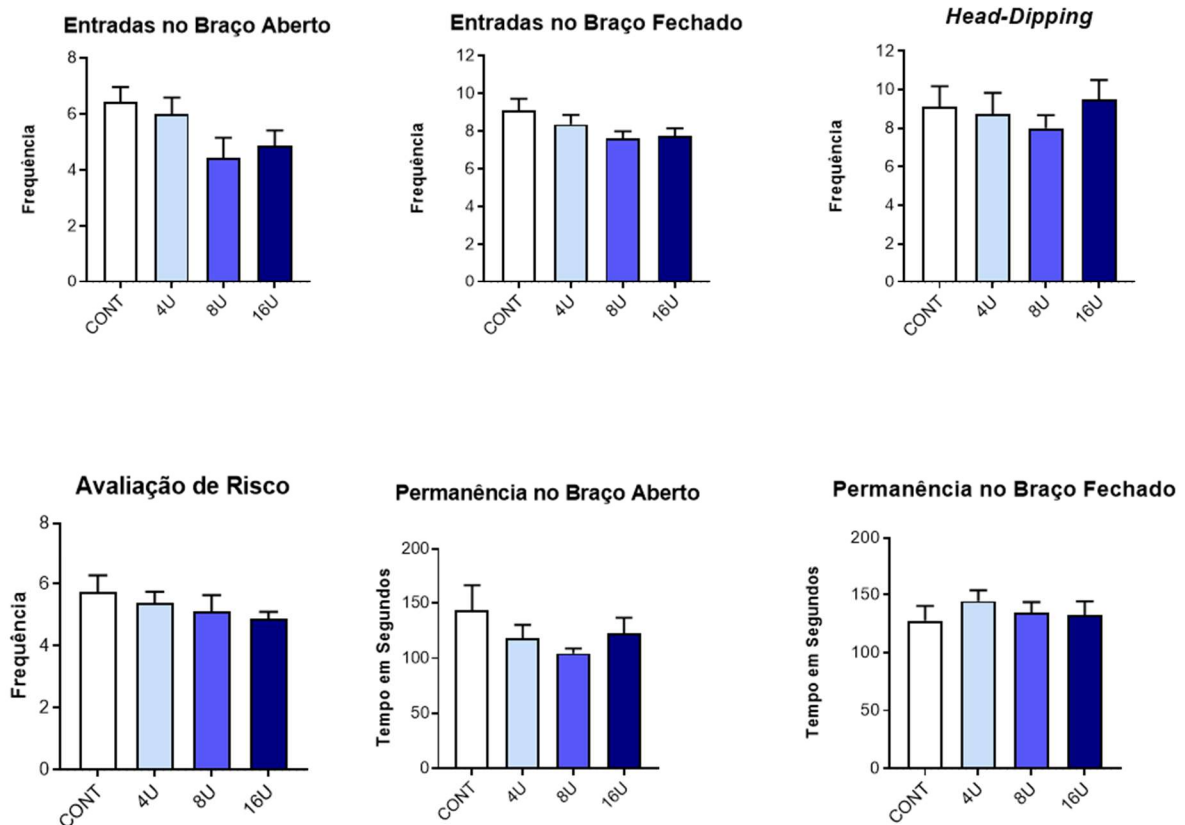
Figura 4 – Parâmetros da interação social da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



### 4.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DA PROLE MASCULINA E FEMININA

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado, realizado no DPN22, da prole masculina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: entradas no braço aberto ( $F(3,32)=2,385$ ;  $p>0,05$ ); entradas no braço fechado ( $F(3,28)=2,031$ ;  $p>0,05$ ); *head-hipping* ( $F(3,28)=0,4326$ ;  $p>0,05$ ); avaliação de risco ( $F(3,28)=0,7589$ ;  $p>0,05$ ); permanência no braço aberto ( $F(3,28)=1,142$ ;  $p>0,05$ ); e permanência no braço fechado ( $F(3,28)=0,4240$ ;  $p>0,05$ ).

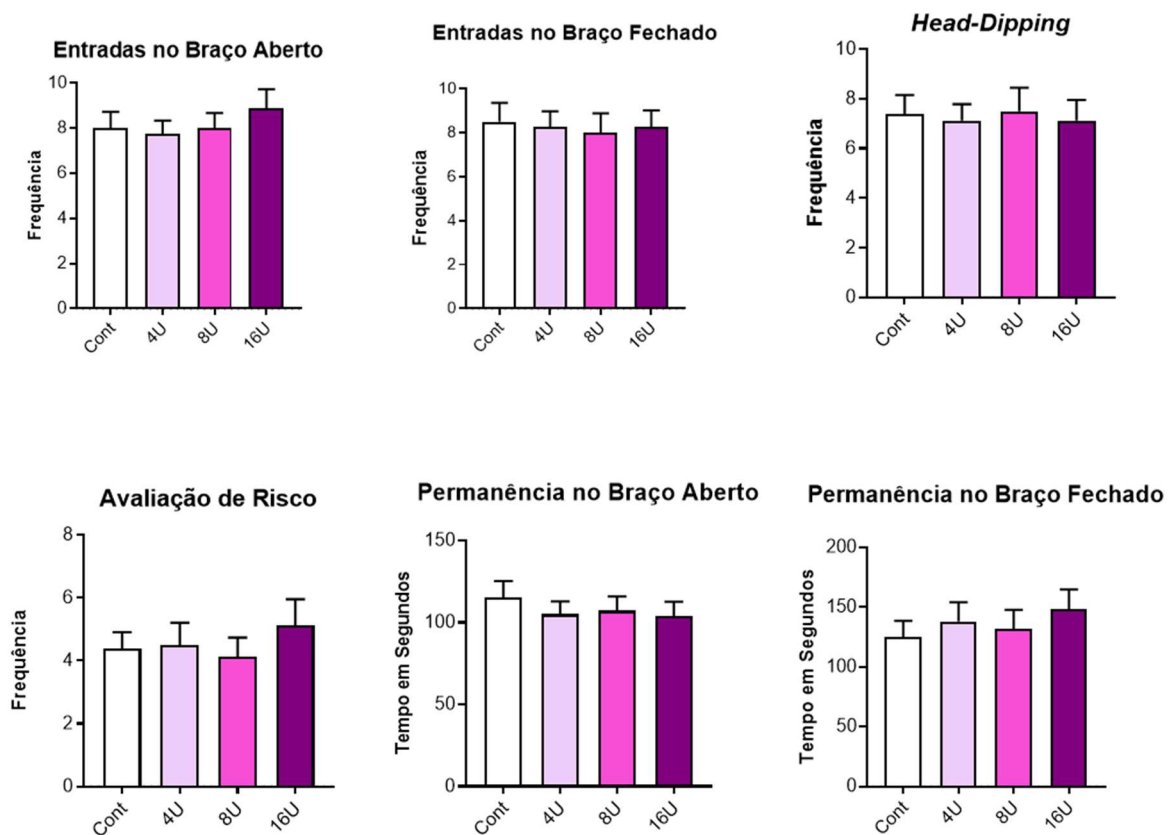
Figura 5 – Parâmetros do avaliados no labirinto em cruz elevado na infância da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



A Figura 6 apresenta os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado, realizado no DPN22, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA

de uma via não mostrou diferenças significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: entradas no braço aberto ( $F(3,28)=0,4687$ ;  $p>0,05$ ); entradas no braço fechado ( $F(3,28)=0,0626$ ;  $p>0,05$ ); *head-dipping* ( $F(3,28)=0,0533$ ;  $p>0,05$ ); avaliação de risco ( $F(3,28)=0,3912$ ;  $p>0,05$ ); permanência no braço aberto ( $F(3,28)=0,3075$ ;  $p>0,05$ ); e permanência no braço fechado ( $F(3,28)=0,3913$ ;  $p>0,05$ ).

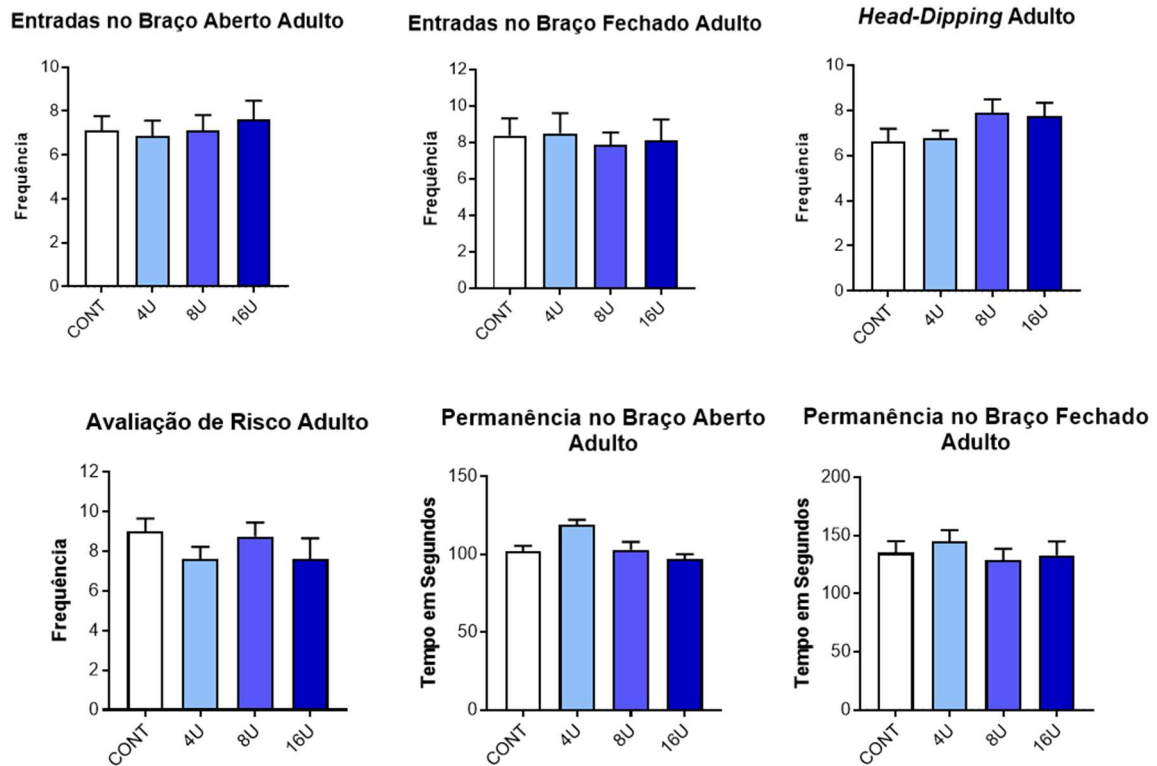
Figura 6 – Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado realizado na infância da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



A Figura 7 apresenta os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado, realizado no DPN60, da prole masculina oriunda de ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: entradas no braço aberto ( $F(3,28)=0,1903$ ;  $p>0,05$ ); entradas no braço fechado ( $F(3,28)=0,0798$ ;  $p>0,05$ ); *head-dipping* ( $F(3,28)=1,455$ ;

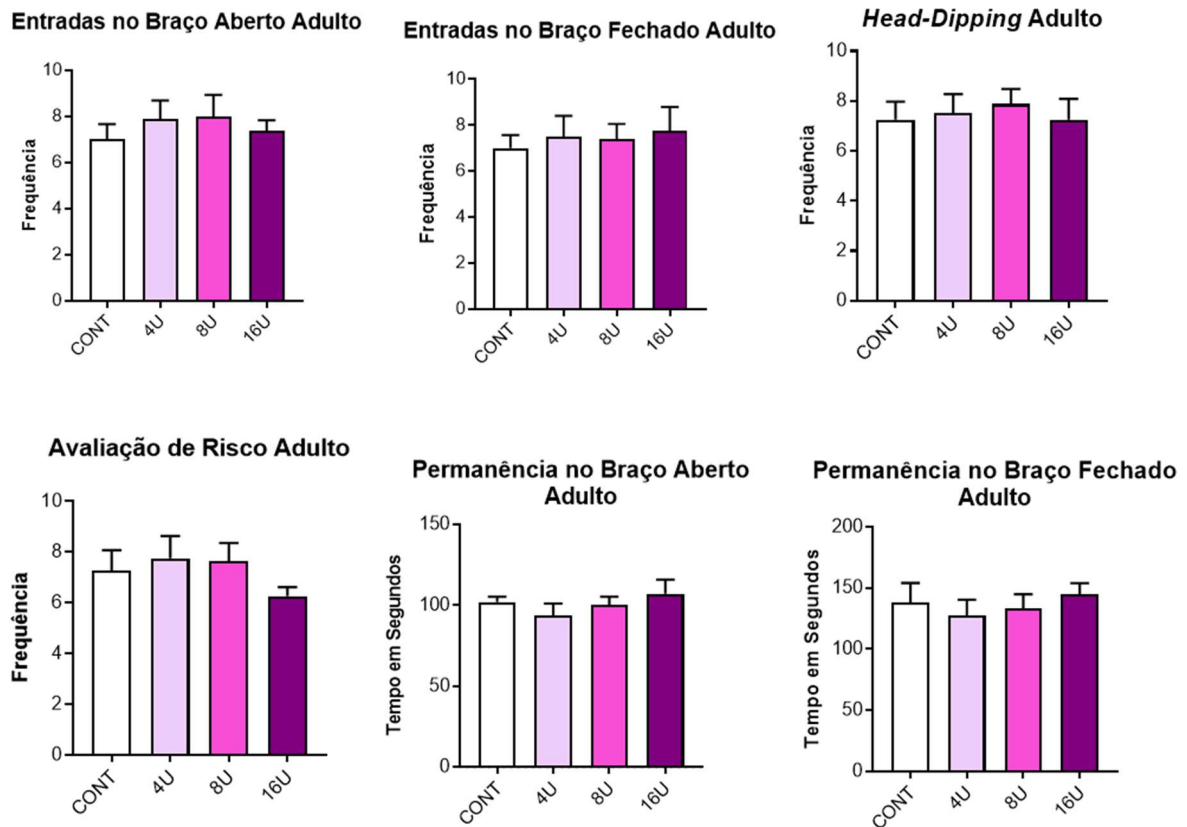
$p > 0,05$ ); avaliação de risco ( $F(3,28)=0,9067$ ;  $p > 0,05$ ); permanência no braço aberto ( $F(3,28)=5,921$ ;  $p > 0,05$ ); e permanência no braço fechado ( $F(3,28)=0,4467$ ;  $p > 0,05$ ).

Figura 7 – Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado realizado na fase adulta da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p > 0,05$ .



A Figura 8 apresenta os resultados do obtidos no labirinto em cruz elevado, realizado no DPN60, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: entradas no braço aberto ( $F(3,28)=0,1903$ ;  $p > 0,05$ ); entradas no braço fechado ( $F(3,28)=0,0798$ ;  $p > 0,05$ ); *head-dipping* ( $F(3,28)=1,455$ ;  $p > 0,05$ ); avaliação de risco ( $F(3,28)=0,9067$ ;  $p > 0,05$ ); permanência no braço aberto ( $F(3,28)=5,921$ ;  $p > 0,05$ ); e permanência no braço fechado ( $F(3,28)=0,4467$ ;  $p > 0,05$ ).

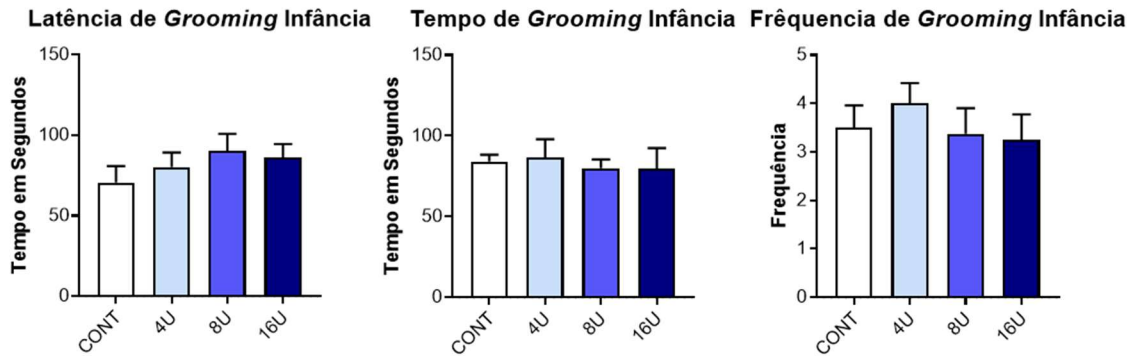
Figura 8 – Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado realizado na fase adulta da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p > 0,05$ .



#### 4.4 GROOMING ESPONTÂNEO DA PROLE MASCULINA E FEMININA

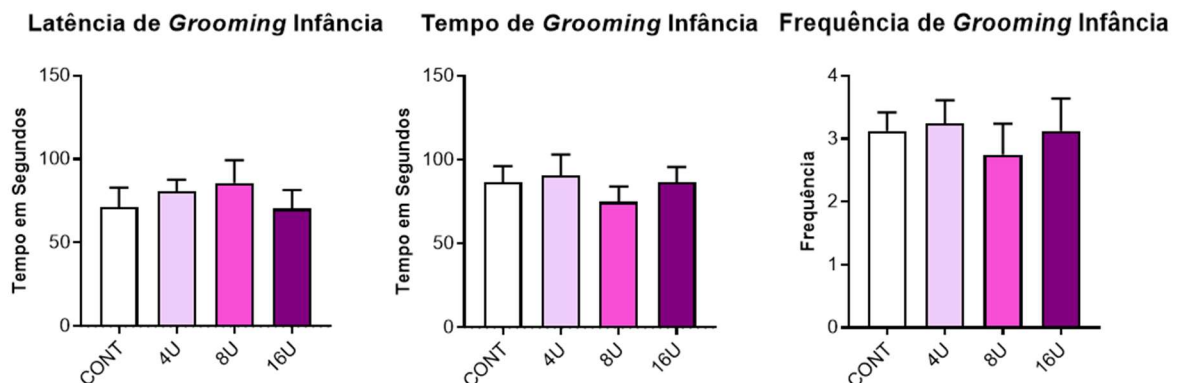
A Figura 9 apresenta os resultados da avaliação do *grooming* espontâneo, avaliado no DPN24, da prole masculina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência de *Grooming* ( $F(3,27)=0,800$ ;  $p>0,05$ ); tempo de *grooming* ( $F(3,28)=0,1289$ ;  $p>0,05$ ); frequência de *grooming* ( $F(3,28)=0,4536$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 9 – Parâmetros avaliados do *grooming* espontâneo realizado durante a infância da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



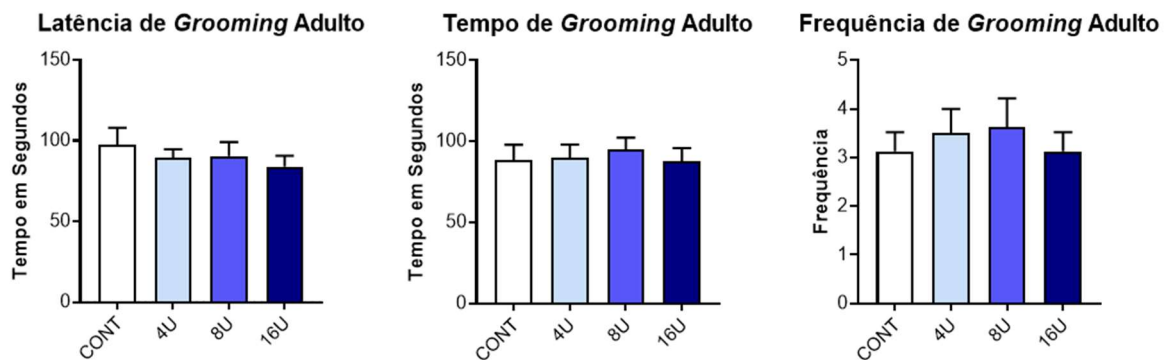
A Figura 10 apresenta os resultados da avaliação do *grooming* espontâneo, realizado no DPN24, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência de *grooming* ( $F(3,27)=0,800$ ;  $p>0,05$ ); tempo de *grooming* ( $F(3,28)=0,1289$ ;  $p>0,05$ ); frequência de *grooming* ( $F(3,28)=0,4536$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 10 – Parâmetros do *grooming* espontâneo avaliados durante a infância da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



A Figura 11 apresenta os resultados da avaliação do *grooming* espontâneo, realizado no DPN62, da prole masculina oriunda das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não apresentou diferença nos parâmetros: latência de *grooming* ( $F(3,28)=0,4482$ ;  $p>0,05$ ); tempo de *grooming* ( $F(3,28)=0,1558$ ;  $p>0,05$ ); frequência de *grooming* ( $F(3,28)=0,2881$ ;  $p>0,05$ ).

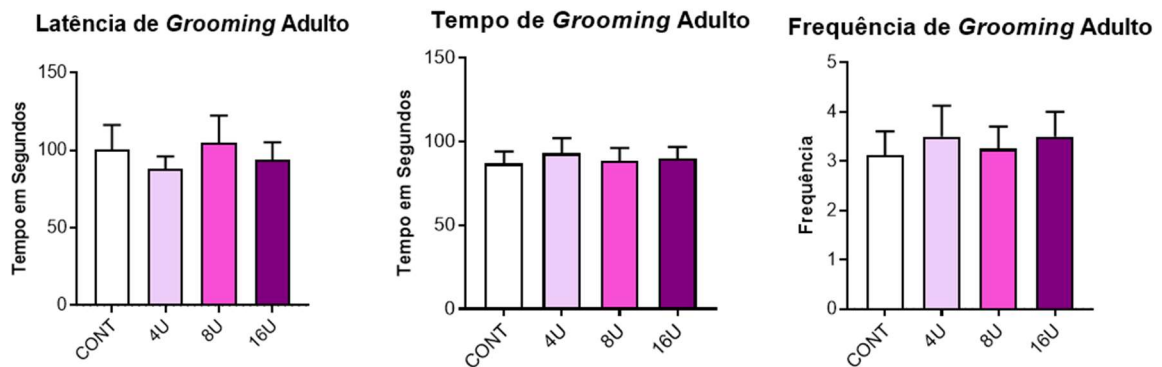
Figura 11 – Parâmetros do *grooming* espontâneo avaliados na fase adulta da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



A Figura 12 apresenta os resultados da avaliação do *grooming* espontâneo, realizada no DPN62, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência de *grooming* ( $F(3,28)=0,2765$ ;  $p>0,05$ ); tempo de *grooming* ( $F(3,28)=0,1083$ ;  $p>0,05$ ); frequência de *grooming* ( $F(3,28)=0,1304$ ;  $p>0,05$ ).



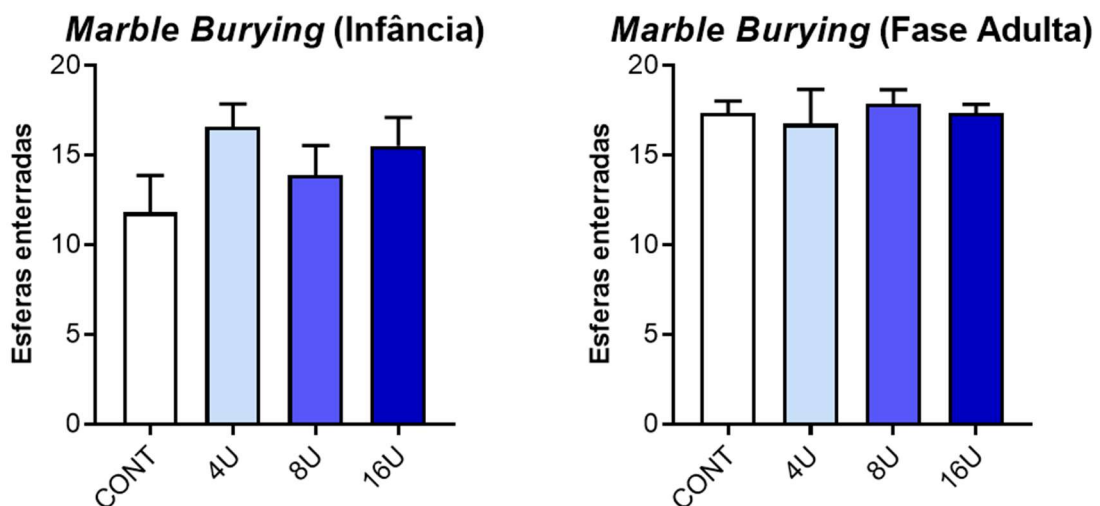
Figura 12 – Parâmetros do *grooming* espontâneo avaliados na fase adulta da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



#### 4.5 MARBLE BURYING TEST DA PROLE MASCULINA E FEMININA

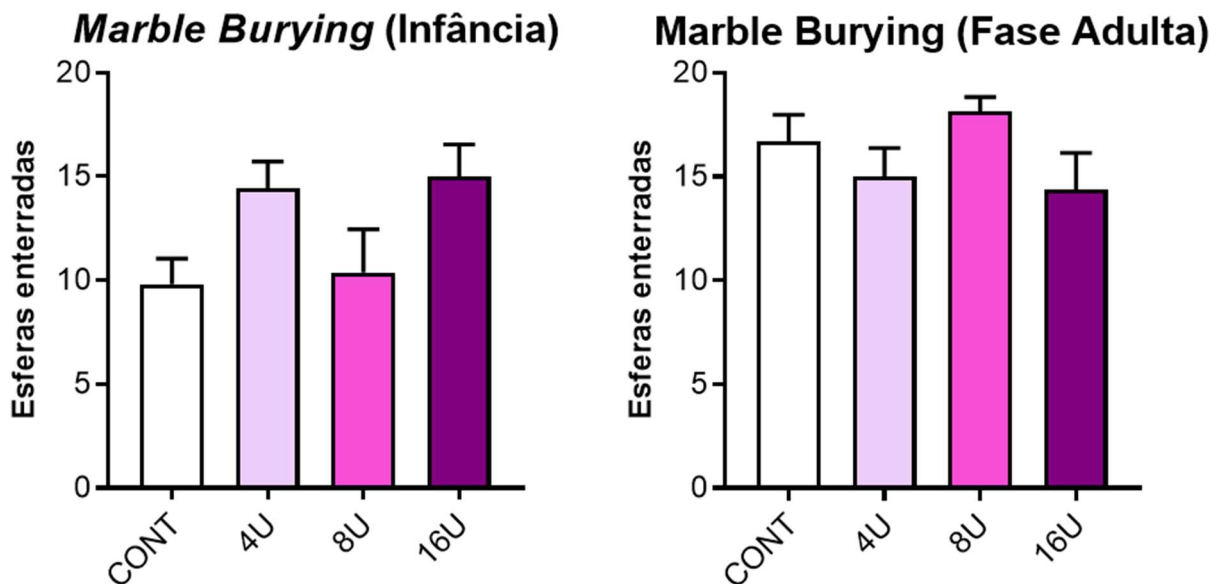
A Figura 13 apresenta os resultados do *marble burying test*, realizados no DPN24 e DPN62, da prole masculina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: esferas enterradas (Infância) ( $F(3,24)=1,342$ ;  $p>0,05$ ) e esferas enterradas (Fase Adulta) ( $F(3,28)=0,1709$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 13 – Parâmetros avaliados no *marble burying test* realizado na infância e na fase adulta da prole masculina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9% – CONT) ou toxina botulínica (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



A Figura 14 apresenta os resultados do *marble burying test*, realizado no DPN24 e DPN62, da prole feminina das ratas tratadas com solução salina (NaCl 0,9%) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg), por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: esferas enterradas (Infância) ( $F(3,24)= 1,342$ ;  $p>0,05$ ) e esferas enterradas (Fase Adulta) ( $F(3,28)=0,1709$ ;  $p>0,05$ ).

Figura 14 – Parâmetros avaliados no *marble burying test* realizado na infância e na fase adulta da prole feminina oriunda de ratas tratadas no 5º dia gestacional com solução salina (NaCl 0,9%– CONT) ou toxina botulínica tipo-A (4, 8 ou 16 U/kg – respectivamente, 4U, 8U ou 16U), por via intramuscular. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrões. N=8 animais por grupo. ANOVA,  $p>0,05$ .



## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados os comportamentos social e tipo-ansioso da prole de ratas gestantes expostas à toxina botulínica tipo-A, não sendo constatado alterações na manifestação desses comportamentos das proles masculina e feminina, tanto na infância quanto na idade adulta.

A ansiedade é a sensação precursora de momentos de perigo real ou até mesmo de perigos imaginários, caracterizada por sensações físicas desconfortáveis, como aceleração dos batimentos cardíacos, transpiração, sensação de pressão no tórax e outros sintomas similares. É relativamente comum a confusão entre ansiedade e medo, uma vez que ambos compartilham de mecanismos e sintomas semelhantes, porém, uma distinção fundamental entre os dois é que o medo frequentemente possui uma causa identificável, enquanto a ansiedade pode ser uma preocupação mais abrangente sem uma causa específica (STEIMER, 2002).

Ao longo da história, uma ampla gama de espécies animais tem sido empregada em testes comportamentais, porém os roedores têm sido consistentemente os mais utilizados, uma vez que são mamíferos de fácil alojamento e reprodução. Com o passar do tempo, houve o desenvolvimento contínuo dos testes comportamentais em roedores, resultando em uma diversidade de mais de 100 testes em uso na contemporaneidade (HÄNELL; MARKLUND, 2014).

Dentre esses testes estão o Teste da Interação Social, feito com os animais na fase adulta, e o Teste do Comportamento de Brincar, feito com os animais no período da infância. O Teste da Interação Social surgiu como o primeiro teste animal de ansiedade que procurou utilizar fontes etiologicamente relevantes e empregar uma forma natural de comportamento como medida dependente, trazendo menos desconforto para os animais por não necessitar de privação de água ou comida, choques elétricos e treinamentos intensivos, além de ser o primeiro teste animal capaz de detectar tanto aumentos quanto reduções na ansiedade (FILE; SETH, 2003).

Em um estudo, Bowen e colaboradores (2011) realizaram uma pesquisa onde 48 ratos Wistar foram divididos em dois grupos, sendo 24 animais tratados diariamente durante 10 dias, por via intraperitoneal, com 1 mg/kg de ocitocina e os outros 24 animais tratados da mesma forma e pelo mesmo período com 1 ml/kg de solução salina, constituindo o grupo controle. Para alcançarem os objetivos propostos,

os pesquisadores realizaram alguns testes, dentre eles, o “Teste de Emergência” (*Emergence test*), a fim de constatar efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos, e o Teste da Interação Social, para medir a sociabilidade dos animais. Como resultado, eles obtiveram que a exposição repetida à ocitocina exógena diminuiu o comportamento tipo-ansioso dos animais e aumentou a interação social entre eles, uma vez que os dois comportamentos possuem uma forte relação entre si.

Outro estudo, protagonizado por Irvine e colaboradores (2001), demonstrou que a nicotina autoadministrada em ratos Wistar possui um efeito ansiogênico, por conta de uma redução nas interações sociais durante o Teste da Interação Social. No trabalho de Green e colaboradores (2013), ratos Long-evans machos que passaram pelo estresse de instabilidade social durante o período equivalente a adolescência apresentaram um comportamento tipo-ansioso maior em relação aos animais controle, além de uma diminuição das interações sociais durante a fase adulta.

No presente estudo, a prole de ratas gestantes tratadas com toxina botulínica tipo-A promoveu alterações no teste de interação social, tanto na infância quanto na idade adulta, quando comparado ao grupo controle. Isso indica que a toxina botulínica tipo-A não foi capaz de alterar a sociabilidade, tampouco o comportamento tipo-ansioso dos animais, a curto ou longo prazo.

Além dos testes de sociabilidade, o Teste do Labirinto em Cruz Elevado também é muito utilizado para constatar mudanças no comportamento tipo-ansioso dos roedores. É, provavelmente, o mais conhecido dos modelos animais de ansiedade na atualidade, por oferecer um excelente exemplo de modelo baseado no estudo do comportamento incondicionado ou espontâneo (RODGERS; DALVI, 1997). Ao discorrer sobre as virtudes do Labirinto em Cruz Elevado, Pellow e colaboradores (1985) observaram que: 1) o teste é prático, simples e não exige equipamentos muito caros; 2) é baseado no comportamento espontâneo, evitando, portanto, treinamentos prolongados, a necessidade de privação de alimentos e água e o uso de estímulos nocivos; 3) é capaz de detectar os efeitos ansiolíticos agudos de medicamentos benzodiazepínicos; e 4) é sensível às manipulações bidirecionais da ansiedade. Dadas essas características, o Labirinto em Cruz Elevado pode oferecer numerosas vantagens tanto na triagem de medicamentos de rotina, como a toxina botulínica aqui avaliada, quanto aos mecanismos envolvidos no comportamento tipo-ansioso.

Utilizando o Labirinto em Cruz Elevado, Holzmann e seus colegas (2012), conseguiram constatar que injeções intraestriatais bilaterais de toxina botulínica tipo-A na área ventrolateral do corpo estriado dorsal ratos Wistar, produziram uma redução do comportamento tipo-ansioso, uma vez que os animais que receberam as injeções tiveram um aumento na frequência de entradas no braço aberto do labirinto em relação aos animais do grupo controle. Em outro estudo, Chen e colaboradores (2021), constataram que injeções faciais de toxina botulínica tipo-A atenuaram o comportamento tipo-ansioso induzido por uma lesão por constrição crônica da porção distal do nervo infraorbital em camundongos C57BL/6J.

No presente trabalho, a toxina botulínica tipo-A foi aplicada nas ratas gestantes e essa exposição não afetou o comportamento tipo-ansioso da prole no Teste do Labirinto em Cruz Elevado, tanto na infância quanto na fase adulta, de ambos os sexos. Essa divergência de resultados pode ser devido às diferenças de protocolos utilizados entre os estudos, considerando que Holzmann et al. (2012) e Chen et al. (2021) trataram animais adultos diretamente com a toxina botulínica tipo-A, enquanto neste estudo a exposição da prole à toxina ocorreu de forma indireta, durante a gestação.

Como alternativa aos testes apresentados anteriormente, existem também os testes do *Grooming* Espontâneo e o *Marble Burying Test*. O *grooming* é um comportamento inato e evolutivamente antigo, que pode ser observado em diversos animais (BOLLES, 1960; SACHS, 1988). Além de sua finalidade primária de cuidado corporal e higiene, possui a função de estimulação da pele, termorregulação, quimiocomunicação, interação social e redução do estresse (TERRY, 1970; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). A regulação do *grooming* pode ser influenciada por diversas regiões cerebrais, como o hipotálamo (ROELING et al., 1993; KRUK et al., 1998), por diversos agente endógenos e hormônios (SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992), além de drogas psicotrópicas (BARROS et al., 1994). De forma semelhante, o *Marble Burying Test* também se refere a um comportamento inato dos roedores, o “enterrar defensivo”. Esse é um comportamento dos roedores onde eles enterram objetos ou outros estímulos, sendo eles aversivos ou não, com movimentos alternados de empurrar com as patas dianteiras e movimentos de cavar com a cabeça. Juntamente com a demonstração de que medicamentos ansiolíticos eficazes podem potencialmente suprimir esses dois comportamentos inatos, o *grooming* e o

comportamento de enterrar têm sido amplamente utilizados como modelos para o comportamento tipo-ansioso de roedores (DE BOER; KOOLHAAS, 2003).

Kalueff e Tuohimaa (2005), demonstraram que considerar a sequência comportamental do *grooming* ao invés de suas medidas gerais, pode ser uma maneira efetiva de medir efeitos ansiogênicos e ansiolíticos induzidos farmacologicamente, uma vez que camundongos C57BL/6 que foram tratados com diazepam ou pentilenetetrazol não apresentaram alterações nas medidas de atividade de *grooming*, mas apresentaram uma redução nas transições incorretas, no caso dos animais tratados com diazepam, e um aumento nas transições incorretas no caso dos animais tratados com pentilenetetrazol, sugerindo um efeito ansiolítico e um efeito ansiogênico, respectivamente. Já Kedia e Chattarji (2014), constataram que o *Marble Burying Test* é um bom modelo para caracterizar o aumento do comportamento tipo-ansioso desencadeado por um episódio único de estresse agudo por imobilização em camundongos C57BL/6, mesmo dez dias após os animais passarem pelo estresse. Neste trabalho, o *Marble Burying test* e o teste do *Grooming* Espontâneo não detectaram alterações comportamentais na prole das ratas gestantes expostas à toxina botulínica tipo-A.

Por fim, é válido relatar que a literatura referente aos estudos utilizando a toxina botulínica durante a gravidez é escassa, sendo composta predominantemente por estudos de caso e não havendo muitos estudos controlados (CARDON; BRANDON; CERRATI, 2021). Bodkin e colaboradores (2005) descreveram dois pacientes que receberam tratamento com toxina botulínica tipo-A no primeiro trimestre da gravidez. Esses pacientes sofriam de distonia cervical e receberam tratamentos regulares com a toxina por 3 anos. A primeira paciente era uma mulher de 38 anos que recebeu 200U da toxina com 2 semanas de gestação e não recebeu mais injeções durante a gravidez. A paciente relatou ter dado à luz um bebê saudável. A segunda paciente, uma mulher de 39 anos, recebeu 500U da toxina com quatro semanas de gestação. Uma ultrassonografia realizada 2 semanas após a exposição à toxina revelou uma gravidez gemelar de 10 semanas sem batimentos cardíacos. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação causal entre o tratamento com a toxina e o óbito fetal devido a outros fatores, como um histórico de aborto espontâneo da paciente.

Em outro estudo, Morgan e colaboradores, em 2006, realizaram uma pesquisa com 900 médicos que utilizavam a toxina botulínica tipo-A para determinar suas

experiências com a administração da toxina durante a gravidez. Apenas 396 dos questionários foram devolvidos e dentre esses, somente 12 médicos haviam utilizado a toxina em pacientes gestantes. No total, 16 mulheres receberam 1,25 a 300U da toxina para tratar distonia cervical, estrabismo, blefaroespamo, distonia dos membros, distonia oromandibular e disfonia espasmódica. Das 19 gestações totais, uma foi encerrada medicamente e outra resultou em aborto espontâneo, como já fora relatado anteriormente no estudo de Bodkin et al. (2005). As outras 17 gestações foram relatadas como tendo sido concluídas sem complicações e sem a necessidade de cuidados pós-natais especiais para os bebês.

Assim, considerando os achados da literatura relacionados com experimentos realizados em animais e aqueles obtidos de dados coletados da prática clínica com seres humanos, é possível constatar a escassez de estudos envolvendo a utilização da toxina botulínica tipo-A durante a gravidez, sendo necessários mais informações que embasem o seu uso com maior segurança.

Em suma, é possível concluir que a toxina botulínica tipo-A possui potencial de apresentar efeitos ansiolíticos e que os testes empregados no presente trabalho são eficazes na avaliação do comportamento tipo-ansioso. Acrescenta-se, ainda, que, quando analisados em conjunto, os resultados deste trabalho mostram que a exposição de ratas gestantes à toxina botulínica tipo-A não causou efeitos na prole, no que tange ao comportamento social e tipo-ansioso.

## **6. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que a exposição gestacional de ratas à toxina botulínica tipo-A não causou alterações no comportamento social e tipo-ansioso da prole, tanto na infância quanto na idade adulta, de ambos os sexos. Esses resultados podem contribuir, juntamente com outros, para o uso mais seguro desse medicamento durante a gestação.

## 7. REFERÊNCIAS

- 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: 26 set 2023.
- AOKI, K.R. Pharmacology of BOTOX (B)(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.
- ARANDA, M.A.; HERRANZ, A.; DEL VAL, J.; BELLIDO S.; GARCÍA-RUIZ P. Botulinum toxin A during pregnancy, still a debate. **European Journal of Neurology**. 2012;19:e81–2.
- BARROS, H.M.T.; TANNHAUSER S.L.; TANNHAUSER M.A.L.; TANNHAUSER M. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacology & toxicology**, v. 74, n. 4-5, p. 339-344, 1994.
- BODKIN, C.L.; MAURER, K.B.; WSZOLEK, Z.K. Botulinum toxin type A therapy during pregnancy. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 20, n. 8, p. 1081-2; author reply 1082, 2005.
- BOLLES, R.C. Grooming behavior in the rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 53, n. 3, p. 306, 1960.
- BOWEN, M.T.; CARSON D.S; SPIRO A.; ARNOLD J.C.; MCGREGOR I.S. Adolescent oxytocin exposure causes persistent reductions in anxiety and alcohol consumption and enhances sociability in rats. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27237, 2011.
- BRIN, M.F.; KIRBY R.S.; SLAVOTINEK A.; MILLER-MESSANA M.A.; PARKER L.; YUSHMANOVA I.; YANG H. Pregnancy outcomes following exposure to onabotulinumtoxinA. **pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 25, n. 2, p. 179-187, 2016.
- CARDON, B.R.; SMITH, M.E.; CERRATI, E.W. Case series of botulinum toxin administered to pregnant patients and review of the literature. **Facial Plastic Surgery & Aesthetic Medicine**, v. 23, n. 3, p. 187-190, 2021.
- CHEN, Z.P.; MORRIS JR J.G.; RODRIGUEZ R.L.; SHUKLA A.W.; TAPIA-NUÑEZ J.; OKUN M.S. Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 11. p. 1196-222, 2012.
- CHEN, W.J.; NIU J.Q.; CHEN Y.T.; DENG W.J.; XU Y.Y.; LIU J.; LUO W.F.; LIU T. Unilateral facial injection of Botulinum neurotoxin A attenuates bilateral trigeminal neuropathic pain and anxiety-like behaviors through inhibition of TLR2-mediated neuroinflammation in mice. **The Journal of Headache and Pain**, v. 22, n. 1, p. 38, 2021.
- COLHADO, O.C.G.; BOEING, M.; ORTEGA, L.B. Toxina botulínica no tratamento da dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 59, n. 3, p. 366-381, 2009.
- DEACON, R.M.J. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 122-124, 2006.



DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 145-161, 2003.

DEVRIESE, P.P. On the discovery of Clostridium botulinum. *Journal of the History of the Neurosciences*, v. 8, n. 1, p. 43-50, 1999.

DONG, H.; FAN, S.; LUO, Y.; PENG B. Botulinum toxin relieves anxiety and depression in patients with hemifacial spasm and blepharospasm. **Neuropsychiatric disease and treatment**, p. 33-36, 2018.

DRESSLER, D.; SABERI, F.A.; BARBOSA, E.R. Botulinum toxin: mechanisms of action. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 180-185, 2005.

ERBGUTH, F.J.; NAUMANN, M. Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786–1862) and the “sausage poison”. **Neurology**, v. 53, n. 8, p. 1850-1850, 1999.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interactions test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 35-53, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **BOTOX® Cosmetic (Boe-Tox) (onabotulinumtoxinA) for injection**. 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/77359/download>>. Acesso em: 27 set 2023.

GREEN, M.R.; BARNES, B; MCCORMICK, C.M. Social instability stress in adolescence increases anxiety and reduces social interactions in adulthood in male Long–Evans rats. **Developmental psychobiology**, v. 55, n. 8, p. 849-859, 2013.

HÄNELL, A; MARKLUND, N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 252, 2014.

HOGG, S.A. review of validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 21-30, 1996.

HOLZMANN, C.; DRÄGER D., MIX E.; HAWLITSCHKA A; ANTIPOVA V.; BENECKE R., WREE A. Effects of intrastriatal botulinum neurotoxin A on the behavior of Wistar rats. **Behavioural brain research**, v. 234, n. 1, p. 107-116, 2012.

IRVINE, E.E.; BAGNALASTA M; MARCON C.; MOTTA C.; TESSARI M.; FILE S.E.; CHIAMULERA C. Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 315-320, 2001.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal of neuroscience methods**, v. 143, n. 2, p. 169-177, 2005.

KALUEFF, A.V.; ALDRIDGE J.W.; LAPORTE J.L.; MURPHY D.L.; TUOHIMAA P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nature protocols**, v. 2, n. 10, p. 2538-2544, 2007.

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **Journal of neuroscience methods**, v. 233, p. 150-154, 2014.

KRUK, M.R.; WESTPHAL K.G.C.; VAN ERP A.M.M.; VAN ASPEREREN J.; CAVE B.J.; SLATER E.; DE KONING J.; HALLER J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and

behavioural regulation in grooming and aggression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 163-177, 1998.

LEWIS, M.B.; BOWLER, P.J. Botulinum toxin cosmetic therapy correlates with a more positive mood. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 8, n. 1, p. 24-26, 2009.

MORGAN, J.C.; IYER, S.S.; MOSER, E.T.; SINGER C.; SETHI K.D. Botulinum Toxin A During Pregnancy: A Survey of Treating Physicians. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 77, p. 117-119, 2006.

MÜNCHAU, A.; BHATIA, K.P. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. **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.

NEWMAN, W.J.; DAVIS, T.L.; PADALIYA, B.B.; COVINGTON C.D.; GILL C.E.; ABRAMOVITCH A.I.; CHARLES P.D. Botulinum Toxin Type A Therapy During Pregnancy. **MOVEMENT DISORDERS**, V. 19, P. 1384-1385, 2004.

NIGAM, P.K.; NIGAM, A. Botulinum toxin. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 1. p. 8-14, 2010.

NICOLAS, L.B.; KOLB, Y. PRINSEN, E.P. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **European Journal of Pharmacology**. v. 547, n. 1-3, p. 106-115, 2006.

PEARCE, C.S. Can I Treat this Pregnant Patient with Botulinum Toxin?. **Practical Neurology**, v. 14, n.1, p. 32-32, 2014.

PELLOW, S.; CHOPIN. P.; FILE, S.E.; BRILEY, M.R.; Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 347, p. 424-437, 1985.

PIRAZZINI, M.; ROSSETTO, O.; ELEOPRA, R.; MONTECUCCO C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 200-235, 2017.

PLETNIKOV, M.V.; RUBIN, S.A.; VASUDEVAN, K.; MORAN, T.H.; CARBONE, K.M. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. **Behavioral Brain Research**, v. 100, n. 1, p. 43-50, 1999.

POLING, A.; CLEARY, J.; MONAGHAN, M. Burying by rats in response to aversive and nonaversive stimuli. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**. v. 35, n. 1, p. 31-44, 1981.

RODGERS, R. J.; DALVI, Allan. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

ROELING, T.A.P.; VEENING J.G.; PETERS J.P.W.; VERMELIS M.E.J.; NIEUWENHUYIS R. Efferent connections of the hypothalamic "grooming area" in the rat. **Neuroscience**, v. 56, n. 1, p. 199-225, 1993.

ROSSETTO, O.; DELOYE F.; POULAIN B.; PELLIZZARI R.; SCHIAVO G.; MONTECUCCO C. The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. **Journal of Physiology-Paris**, v. 89, n. 1, p. 43-50, 1995.

SACHS, B.D. The development of grooming and its expression in adult animals. **Ann NY Acad Sci**, v. 525, n. 1, p. 1-17, 1988.

SIMPSON, L.L. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 427-453, 1986.

SPRUIJT, B.M.; VAN HOOFF, J.A; GISPEN, W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological reviews**, v. 72, n. 3, p. 825-852, 1992.

STEIMER, T. The biology of fear-and anxiety-related behaviors. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231-249, 2002.

TERRY, R.L. Primate grooming as a tension reduction mechanism. **The Journal of psychology**, v. 76, n. 1, p. 129-136, 1970.

VIEIRA, M.L.; SARTORIO, R. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira em duas espécies de roedores. **Estudos de Psicologia**, v. 7, n. 1, p. 189-196, 2002.

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.

YESUDHAS, A.; RADHAKRISHNAN R.K.; SUKESH A.; RAVICHANDRAN S.; MANICKAM N.; KANDASAMY M. BOTOX® counteracts the innate anxiety-related behaviours in correlation with increased activities of key antioxidant enzymes in the hippocampus of ageing experimental mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 569, p. 54-60, 2021.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; CAMUSSO, J.R.; ARNOLD, A.J.T.; RIBEIRO, M.O.; FUKUSHIMA, A.R.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S.; RICCI, E.L. Avaliação comportamental do impacto de diferentes tipos de substratos para gaiolas no bem-estar de ratos de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (RSBCAL)**, v. 7, n. 2, p. 87-97, 2019.