USO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A DURANTE A LACTAÇÃO: POSSÍVEIS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DA PROLE MASCULINA DE RATAS WISTAR.

Leonardo Munhoz Quilici e Lorena de Paula Pantaleon

Apoio:PIBIC Mackenzie

RESUMO

A toxina botulínica tipo A (TB-A) é uma neurotoxina amplamente utilizada na prática clínica para o tratamento de condições associadas ao excesso de contração muscular. Entretanto, a segurança de seu uso durante os períodos gestacional e lactacional permanece objeto de debate devido à escassez de dados sobre seus efeitos no desenvolvimento da prole. O presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis impactos da exposição materna à TB-A, administrada por via intramuscular em doses únicas (4, 8 ou 16 U/kg), sobre o desenvolvimento e a atividade locomotora da prole masculina de ratas Wistar. As fêmeas foram expostas durante a lactação (dia de lactação – DL - 2), e com os filhotes machos foram avaliados o desenvolvimento físico e reflexológico e realizados os testes de campo e marcha, em dois períodos diferentes da vida desses animais, logo na infância (dia pós-natal – DPN – 22) e na idade adulta (DPN60), a fim de avaliar os possíveis efeitos toxicológicos e de desenvolvimento à curto e longo prazo. Os resultados obtidos, em conjunto, não mostraram nenhuma diferença significativa em todos os parâmetros analisados, indicando que a TB-A, aplicada durante a lactação, parece ter efeito restrito ao local da aplicação e não é transmitida pelo leite materno, o que poderia interferir no desenvolvimento e aparecimento de características físicas e locomotoras da prole masculina.

Palavras-chave: Desenvolvimento físico, desenvolvimento reflexológico, comportamento animal

ABSTRACT

Botulinum toxin type A (TB-A) is a neurotoxin widely used in clinical practice for the treatment of conditions associated with excessive muscle contraction. However, the safety of its use during pregnancy and lactation remains a matter of debate due to the scarcity of data regarding its effects on offspring development. The present study aimed to investigate the potential impacts of maternal exposure to TB-A, administered intramuscularly as single doses (4, 8, or 16 U/kg), on the development and locomotor activity of male offspring of Wistar rats. The females were exposed during lactation (lactation day – LD – 2), and the male pups were evaluated for physical and reflexological development, as well as performance in open-field and gait tests, at two different stages of their lives: early childhood (postnatal day – PND – 22)

and adulthood (PND60), in order to assess potential short- and long-term toxicological and developmental effects. Overall, the results showed no significant differences in any of the parameters analyzed, indicating that TB-A administered during lactation appears to have effects restricted to the site of administration and is not transferred through breast milk, which could otherwise interfere with the development and the emergence of physical and locomotor characteristics in male offspring.

Keyword: Physical development, reflexological development, animal behavior

1. INTRODUÇÃO

A toxina botulínica (TB) é uma neurotoxina proteolítica de origem bacteriana, produzida pela espécie *Clostridium botulinum*, microrganismo gram-positivo, anaeróbico, esporulado e dotado de motilidade. Trata-se de uma das substâncias mais potentes conhecidas na natureza, cuja estrutura molecular compreende duas cadeias polipeptídicas — uma cadeia pesada (~100 kDa) e outra leve (~50 kDa) — interligadas por pontes dissulfeto. Essa configuração confere à TB a capacidade de atuar seletivamente sobre terminais colinérgicos, onde exerce efeito neuromodulador ao inibir a liberação de acetilcolina (ACo), culminando em bloqueio sináptico e paralisia muscular flácida temporária (CHOWDHURY et al., 2021; ANANDAN; JANKOVIC, 2021).

Desde sua descrição inicial, o interesse médico-científico por essa molécula tem se intensificado, especialmente após a década de 1990, quando seu uso foi amplamente difundido em contextos terapêuticos e estéticos e tornou-se uma ferramenta fundamental em neurologia, reabilitação, urologia e dermatologia. No total, sete sorotipos distintos da TB foram identificados — denominados de A a G — sendo que apenas os sorotipos A e B foram aprovados para uso clínico humano. O sorotipo A, em particular, destaca-se por apresentar eficácia superior e maior duração de ação, sendo amplamente utilizado na prática clínica para distúrbios neuromusculares, cefaleias crônicas, disfunções autonômicas e aplicações, por apresentar baixa imunogenicidade e perfil farmacocinético favorável (WITMANOWSKI; BŁOCHOWIAK, 2020; ALLERGAN, 2023).

O mecanismo de ação da TB envolve sua internalização nos terminais axonais colinérgicos, mediada pela cadeia pesada, seguida pela translocação da cadeia leve para o citoplasma, onde atua como uma metaloprotease de zinco dependente. Tal enzima promove a clivagem seletiva de proteínas do complexo SNARE (*Soluble NSF attachment protein receptor* - "receptor de proteína de ligação NSF solúvel"), conjunto de proteínas essenciais à fusão vesicular e liberação de neurotransmissores, como a SNAP-25 e a sinaptobrevina (VAMP), culminando na interrupção da exocitose de ACo. Essa interrupção do impulso

colinérgico resulta em paralisia muscular localizada e reversível, com duração variável conforme a formulação, dose e local de aplicação (ANANDAN; JANKOVIC, 2021; CHOWDHURY et al., 2021).

Entretanto, apesar da crescente incorporação da TB em protocolos clínicos, ainda são escassos os estudos que avaliam seus efeitos durante períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e a lactação, infância e adolescência. As poucas evidências disponíveis indicam que a TB pode atravessar barreiras fisiológicas, como a placenta, e ser excretada pelo leite materno, o que levanta preocupações significativas quanto à segurança de seu uso em pacientes em idade reprodutiva (CRUZ et al., 2020). Esse cenário resulta, frequentemente, na suspensão de tratamentos durante a gravidez por precaução, mesmo diante de condições que exigem continuidade terapêutica.

A carência de dados empíricos sobre os riscos ou potenciais efeitos adversos da TB em organismos em desenvolvimento configura um importante problema de pesquisa, cuja abordagem pode contribuir de maneira significativa para o avanço do conhecimento biomédico. A elucidação dos mecanismos de ação da TB durante a lactação, bem como a identificação de possíveis alterações comportamentais resultantes de sua exposição, são imprescindíveis para embasar diretrizes clínicas baseadas em evidências e mitigar incertezas terapêuticas neste contexto, evitando assim que tratamentos crônicos em andamento sejam interrompidos.

Do ponto de vista farmacocinético, fatores como a elevada massa molecular da TB-A, sua estrutura proteica complexa e baixa biodisponibilidade sistêmica após injeção intramuscular sugerem baixo risco de transferência placentária ou excreção pelo leite materno. No entanto, mecanismos como fragmentação proteica ou transporte ativo por proteínas específicas, como a ABCG2/BCRP, ainda não foram descartados, sendo citados como possíveis vias de exposição do neonato (JANK; GUPTA, 2022; CHOWDHURY et al., 2021). A ausência de dados experimentais fidedignos sobre a exposição lactacional exige cautela e investigação aprofundada.

Considerando os possíveis efeitos da exposição gestacional à TB-A sobre parâmetros neurocomportamentais em organismos em desenvolvimento, o presente estudo tem por objetivo investigar possíveis alterações no desenvolvimento físico e reflexológico e atividade locomotora na prole masculina de ratas expostas à TB-A durante a lactação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A TB-A constitui-se como um agente farmacológico de reconhecida eficácia terapêutica, amplamente empregado no manejo de diversas condições clínicas. Entretanto, apesar de sua

consolidada aplicação em múltiplas especialidades médicas, persiste uma lacuna significativa de evidências quanto à segurança de seu uso em contextos fisiológicos específicos, a exemplo do período gravídico-puerperal, notadamente durante a lactação (ANANDAN; JANKOVIC, 2021; CHOWDHURY et al., 2021).

Contudo, o uso do TB-A durante a lactação é tema de debate. A bula técnica do BOTOX®, primeira formulação da TB-A a ser comercializada pela fabricante Allergan Inc. (2023) e aprovada pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), alerta que não há estudos clínicos adequados, tampouco investigações pré-clínicas robustas, que avaliem a excreção da TB-A ou de seus metabólitos por meio do leite materno, seja em humanos, seja em modelos animais. Ademais, não existem dados que elucidem os potenciais efeitos adversos decorrentes da exposição do neonato à substância durante a amamentação, tampouco acerca de sua possível interferência nos eixos neuroendócrinos responsáveis pela lactogênese e pela galactopoiese (ABBVIE, 2023). Isso obriga os profissionais a ponderarem entre a interrupção terapêutica e os potenciais riscos da exposição, em um cenário de lacuna científica importante (CRUZ et al., 2020).

Importante de nota, é que para estudos que visam avaliar efeitos teratogênicos e que podem interferir no desenvolvimento a longo prazo da prole, processos fisiológicos relevantes devem ser considerados, como a transferência de substâncias químicas do organismo materno para o leite, um fenômeno farmacocinético complexo, mediado por mecanismos como difusão passiva e transporte ativo através do epitélio mamário. A difusão passiva é o principal processo envolvido, sendo influenciada por propriedades fisico-químicas das moléculas, tais como peso molecular, lipossolubilidade, grau de ionização e ligação a proteínas plasmáticas. Substâncias de baixo peso molecular, elevada lipossolubilidade e baixa ligação proteica tendem a se difundir com maior facilidade para o leite materno (HALE; ROWE, 2017).

A glândula mamária é um órgão funcionalmente ativo do ponto de vista farmacocinético. Transportadores de efluxo, como a proteína ABCG2/BCRP, desempenham papel fundamental na secreção de xenobióticos para o leite (JANK; GUPTA, 2022). Substâncias de alta lipossolubilidade, baixa ligação proteica e pequeno volume de distribuição são mais propensas à eliminação lactacional. Embora a TB-A possua características físico-químicas que a tornam improvável à excreção significativa, a ausência de estudos que investiguem esse cenário é uma limitação relevante.

Além disso, a composição do leite humano, rica em lipídios e com pH mais ácido que o plasma, pode favorecer a concentração de fármacos lipofílicos e fracamente básicos. Estudos com outros compostos sugerem que tais características bioquímicas são determinantes na

transferência de substâncias para o leite materno (JANK; GUPTA, 2022). Embora a TB-A não tenha sido diretamente implicada nesse tipo de transferência, a escassez de dados experimentais reforça a necessidade de estudos específicos, especialmente quanto ao impacto neurocomportamental na prole.

Diante dessa dinâmica fisiológica de passagem de substâncias para o leite materno, torna-se imprescindível investigar a farmacocinética e o potencial toxicológico de compostos administrados durante a lactação. No caso da TB-A, ainda que sua biodisponibilidade sistêmica após administração intramuscular seja limitada, a inexistência de evidências sobre sua excreção lactacional e seus possíveis efeitos sobre o neonato impõe a necessidade de estudos específicos que garantam sua segurança nesse contexto (HALE, 2019).

A TB, por ser uma proteína exógena com ação neuroespecífica, demanda estudo especial quanto ao seu impacto em cérebros em desenvolvimento. Alterações na neurotransmissão durante períodos críticos podem comprometer circuitos funcionais permanentes. Assim, torna-se imperativo investigar não apenas a presença da substância no leite, mas também seus efeitos comportamentais e neuroquímicos na prole (CRUZ et al., 2020).

Estudos pré-clínicos conduzidos com rigor metodológico são capazes de fornecer dados fidedignos sobre parâmetros locomotores, resposta reflexa, expressão gênica e plasticidade sináptica. Essas variáveis são cruciais para o entendimento das possíveis alterações induzidas pela exposição perinatal a compostos farmacologicamente ativos como o TB-A (ANANDAN; JANKOVIC, 2021).

Dessa forma, o presente projeto se insere em um campo essencial da toxicologia do desenvolvimento e da farmacologia. Ao empregar modelo animal validado, o estudo buscou responder a questões críticas relacionadas à segurança da TB-A na lactação (OECD, 2023; CRUZ et al., 2020).

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento Experimental

No dia de lactação (DL) 2, 32 ratas Wistar lactantes foram separadas em 4 grupos iguais (N=8/ por grupo), sendo três experimentais e um controle. As ratas dos grupos experimentais receberam 4, 8 ou 16 U/kg de TB-A, por via intramuscular. As ratas do grupo controle receberam, pela mesma via, 0,3 ml de solução salina (NaCl 0,9%). As doses de TB-A foram escolhidas baseadas em estudos prévios realizados pela principal indústria farmacêutica fabricante da formulação comercial (ALLERGAN, INC.; 2023). A via de administração intramuscular foi escolhida para atender as diretrizes da *Organization for Economic Co-*

operation and Development (OECD), que recomenda o uso da via mais relevante para a exposição humana (OECD, 2023). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie, sob protocolo de número 07-11-202207-11-2022.

3.2 Padronização das Ninhadas

No DPN2 foi feita a padronização do número de filhotes da ninhada para 8, sempre que possível, foram deixados 4 fêmeas e 4 machos. Para o presente estudo, foram utilizados somente os parâmetros coletados dos filhotes machos.

3.3 Desenvolvimento Físico

Cada animal da prole foi pesado durante o período de lactação - DPN2 ao 21 - para cálculo do ganho de peso. Foi, também, avaliado diariamente - DPN2 ao 40 - o desenvolvimento físico de toda a prole (UDO et al. 2014; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2024), em que foi considerado o dia do aparecimento dos parâmetros: 1) descolamento da orelha; 2) aparecimento de pelos; 3) erupção dos dentes incisivos; 4) abertura dos olhos; 5) andar adulto: quando o filhote anda sem encostar o ventre no chão; 6) descida dos testículos.

3.4 Desenvolvimento Reflexológico

Foi avaliado diariamente - DPN2 ao 21 - o desenvolvimento reflexológico dos filhotes (UDO et al., 2014; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2024), em que foi considerado o dia do aparecimento dos parâmetros: 1) Preensão palmar: o coxim plantar das patas anteriores foi tocado com a ponta de um clipe e o animal responde fechando a pata; 2) Endireitamento postural: o animal foi colocado em decúbito dorsal e retorno do corpo para a posição de decúbito ventral; 3) Geotaxia negativa: quando o animal, ao ser colocado em uma rampa com inclinação de 45º com a cabeça direcionada para baixo, retorna para a posição ascendente; 4) Sobressalto: quando animal apresentou tremor generalizado ao ser exposto a um estalo, indicando abertura do ducto auditivo.

3.5 Campo Aberto

O teste do campo aberto é um dos testes mais utilizados para avaliação da atividade geral, motora e exploratória, pois se baseia em características inatas aos roedores, no conflito entre curiosidade e medo de ambientes novos e abertos (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). O aparato utilizado consiste em uma arena circular com 90 cm de diâmetro, circundado por uma parede de 50 cm de altura, com o chão da arena demarcado por linhas pretas formando 12 quadrantes de áreas semelhantes (SANDINI et al., 2014). Os animais foram colocados no centro do aparato e, durante 5 min, foram avaliados os parâmetros: 1) Frequência de locomoção: foi considerada uma unidade de locomoção quando o animal adentrou com as

quatro patas em um quadrante; 2) Frequência de levantar: foi considerada uma unidade de levantar quando o animal se apoiou sobre as patas traseiras, ficando com o tronco ereto; 3) Tempo de grooming: tempo, em segundos, que o animal realiza o ato de auto-limpeza; 4) Tempo de imobilidade: tempo, em segundos, em que o animal permanece imóvel. Este teste foi realizado ao final do período de infância, no DPN 22, e no início da idade adulta, no DPN 61.

3.6 Teste da Marcha:

Para avaliar a coordenação motora no teste de marcha foi utilizada uma caixa com 30 cm de comprimento, 10 cm de largura, com parede de 15 cm de altura. Foram coletados registros diretos da marcha do animal, por meio das pegadas das patas dos membros pélvicos (pintadas com tinta preta), deixadas sobre o papel de filtro colocado sobre o chão do aparato (PINTO et al., 2015). A seguir, conforme descrito por PANTALEON et al. (2023), foram avaliados os parâmetros: 1) Comprimento da passada: distância entre duas pegadas da mesma pata. 2) Comprimento do passo: largura entre os membros direito e esquerdo; 3) Extensão dos dedos: distância entre o primeiro e quinto dedo em um mesmo pé; 4) Extensão dos pés: distância entre o dedo médio e o calcanhar em um mesmo pé; 5) Simetria: comprimento do passo dividido pelo comprimento da passada deve ser igual a 0,5; 6) Distância entre os pés: distância entre os dois pés em um mesmo passo; 7) Área da passada: distância entre os dois pés em um mesmo passo. Para os parâmetros bilaterais – comprimento da passada, extensão dos dedos, extensão dos pés e simetria – foram coletados os valores dos lados direito e esquerdo. Este teste foi realizado ao final do período de infância, no DPN22, e no início da idade adulta, no DPN60.

3.7 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 11® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homocedasticidade dos dados. Para os dados paramétricos foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, quando houve 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. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns. O nível de significância para todas as análises foi considerado $p<0,05$.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

A TB-A, além do seu emprego em procedimentos estéticos, tem sido indicada para tratamento de várias condições na medicina moderna em que existe excesso de contrações

musculares involuntárias, secreções excessivas e dor. Por outro lado, há poucos estudos utilizando modelos animais que avaliem os efeitos da exposição a essa substância em períodos críticos do desenvolvimento animal, como a lactação e na prole lactante, o que faz com que tratamentos clínicos com TB sejam contraindicados nesses períodos. Desta maneira, o presente trabalho visou avaliar os efeitos da exposição da prole masculina de ratas à TB-A durante a lactação, a fim contribuir para o uso mais eficaz e seguro dessa medicação, evitando que tratamentos sejam interrompidos e/ou adiados durante a gestação e a lactação.

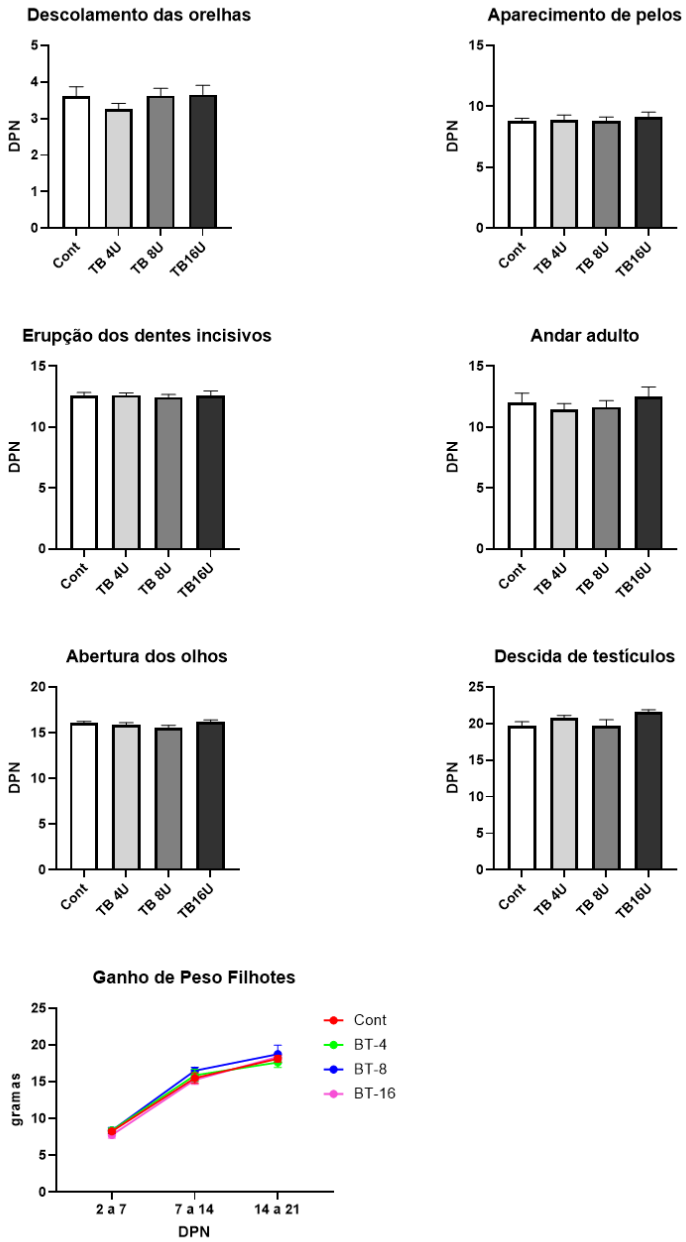
Assim, neste estudo, com os filhotes machos de ratas expostas a uma formulação comercial de TB-A durante a lactação, foi avaliado o desenvolvimento físico e reflexológico e atividade locomotora, por meio dos testes de campo aberto e da marcha, tanto na infância quanto na idade adulta.

O desenvolvimento físico e reflexológico de infantis pode ser prejudicado ou retardado por moléculas xenobióticas, principalmente quando a progenitora é exposta a elas nos períodos gestacional e lactacional, podendo causar, nos filhotes, déficits comportamentais e físico-anatômicas, incluindo alterações motoras e de coordenação (CAMARGO et al., 2017). Assim, a fim de garantir a segurança e eficácia de tais moléculas, estudos e análises de toxicologia do desenvolvimento devem ser realizadas em estudos de fase pré-clínica.

O desenvolvimento físico consiste na avaliação do aparecimento de componentes e estruturas anatômicas e locomotoras, parâmetros estes que se correlacionam com o correto suporte nutricional materno e crescimento adequado dos filhotes (ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2024).

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos pela análise do desenvolvimento físico da prole masculina de ratas expostas a TB-A no DL2 por via intramuscular. Para o parâmetro de “ganho de peso”, a ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais comparado ao grupo controle. Já nos demais parâmetros, avaliados por ANOVA de uma via, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Figura 1: Parâmetros do Desenvolvimento Físico realizado pela prole masculina de ratas Wistar tratadas por Toxina Botulínica Tipo A em diferentes doses (4, 8, 16 U/Kg) por via intramuscular no DL2. São apresentadas as respectivas médias e erros padrões (N=8 animais/grupo).



p>0,05. ANOVA de uma via e ANOVA de duas vias.

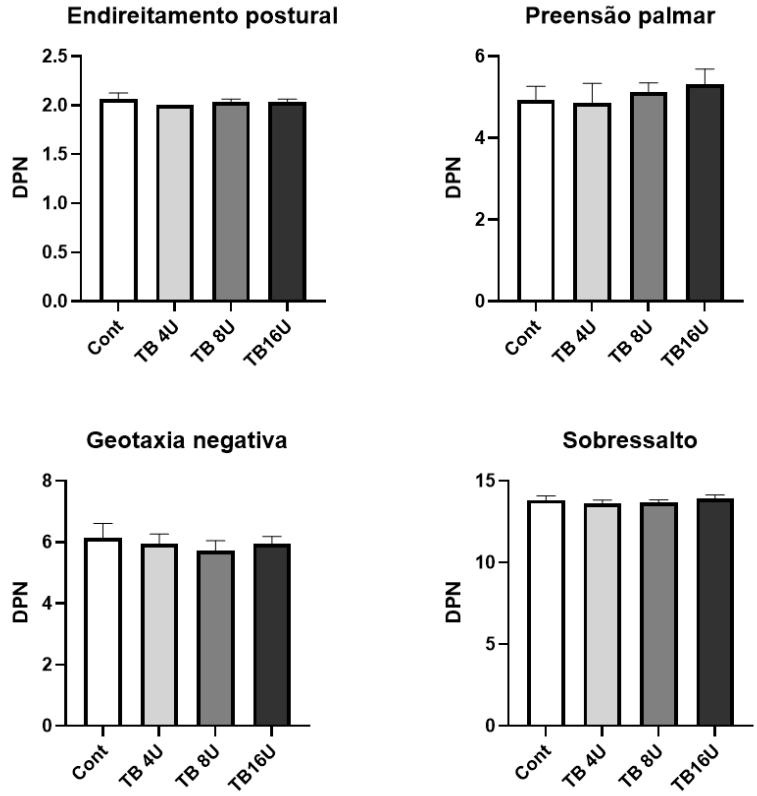
O desenvolvimento reflexológico consiste no aparecimento de reflexos relacionados à propriocepção e maturação sensorial e que, em conjunto, vão conferindo gradativamente maior autonomia e capacidade de sobrevivência aos filhotes.

De acordo com Sandini et al. (2015) o reflexo da preensão palmar - o único que é perdido durante o desenvolvimento - depende da integridade do Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). Os reflexos de endireitamento postural e geotaxia negativa estão correlacionados a propriocepção e ao desenvolvimento dos sistemas vestibular e

musculoesquelético, além de ser um indicativo da correta atividade cerebelar. Já o reflexo de sobressalto ocorre pelo estímulo coclear, indicando maturação do nervo trigêmeo e, também, do sistema vestibular.

A Figura 2 apresenta os resultados obtidos pela análise do desenvolvimento reflexológico da prole masculina de ratas expostas a TB-A no DL2 por via intramuscular. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa em todos os parâmetros analisados.

Figura 2: Parâmetros do Desenvolvimento Reflexológico realizado pela prole masculina de ratas Wistar tratadas por Toxina Botulínica Tipo A em diferentes doses (4, 8, 16 U/Kg) por via intramuscular no DL2. São apresentadas as respectivas médias e erros padrões (N=8 animais/grupo).



p>0,05. ANOVA de uma via.

Os resultados do desenvolvimento físico e reflexológico, demonstram que a TB-A administrada na mães no início da lactação não alterou, em nenhum dos parâmetros, o desenvolvimento e sobrevida da prole masculina, favorecendo a hipótese de que esta molécula não consiga atravessar a barreira mamária e ser excretada pelo leite, o que poderia causar déficits no neurocomportamentais na prole, fator que é corroborado principalmente pelo aparecimento correto de características locomotoras, que poderiam ser as principais alteradas pela TB-A, considerando o seu mecanismo de ação.

Além da análise do aparecimento de componentes físicos e reflexos, também foram realizadas avaliações comportamentais relacionadas à atividade locomotora, em dois períodos de vida diferentes desses animais, para mensurar a extensão/duração dos possíveis efeitos adversos ou o intervalo até o aparecimento deles, bem como possíveis efeitos de toxicidade.

O teste do campo aberto é um dos principais testes para avaliação da emocionalidade, atividade motora e ansiedade em roedores (RICCI et al., 2024; PRUT). Esse teste traz informações relevantes em relação à atividade exploratória e emocionalidade, baseando-se em comportamentos inatos dessa classe de animais, tais como medo de ambientes grandes, abertos, iluminados e desconhecidos (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015; LA-VU et al., 2020).

Nesse teste, a locomoção relaciona-se com a atividade motora geral e exploração horizontal do animal no ambiente, podendo atuar como um fator ansiogênico, considerando que o centro do aparato é um local mais aversivo, já a periferia promove a sensação de maior segurança devido a presença de um objeto sólido. O ato de levantar está relacionado à exploração vertical do local para observação do horizonte (HABR et al., 2011; VALVASSORI et al., 2017).

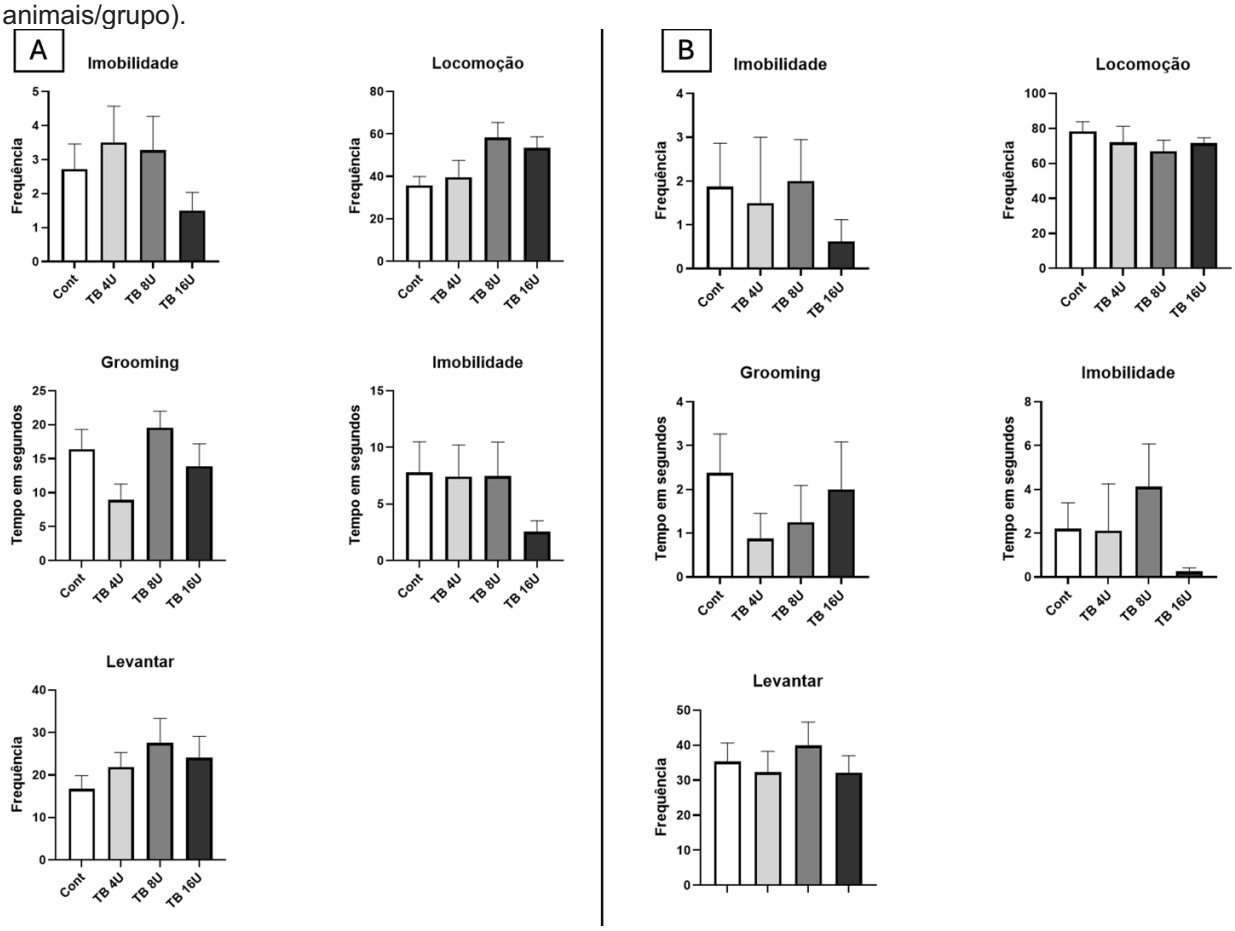
Tanto a locomoção, como o levantar, exibido no campo aberto são parâmetros relacionados à atividade inata exploratória do animal quando este é exposto a um ambiente novo, este mesmo ambiente que pode atuar inibindo a curiosidade de exploração em decorrência da neofobia (PRUT; BELZUNG, 2003).

Já os comportamentos de *grooming* (autolimpeza) e a imobilidade, quando realizados de forma exacerbada, podem indicar aumento do medo e do comportamento tipo-ansioso (VALVASSORI et al., 2017).

Esses parâmetros, de alguma maneira dependem da integridade musculoesquelética dos animais para que possam ocorrer de maneira adequada e, portanto, podem ser alterados pela exposição à TB-A.

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos pela análise do teste do campo aberto da prole masculina de ratas expostas a TB-A no DL2 por via intramuscular, no DPN22 (Figura 3A) e DPN60 (Figura 3B). A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas nos parâmetros analisados em ambas as datas.

Figura 3: Parâmetros do teste do campo aberto realizados pela prole masculina de ratas Wistar tratadas por Toxina Botulínica Tipo A em diferentes doses (4, 8, 16 U/Kg) por via intramuscular no DL2, no DPN22 (A) e DPN60 (B). São apresentadas as respectivas médias e erros padrões (N=8 animais/grupo).



p>0,05. ANOVA de uma via.

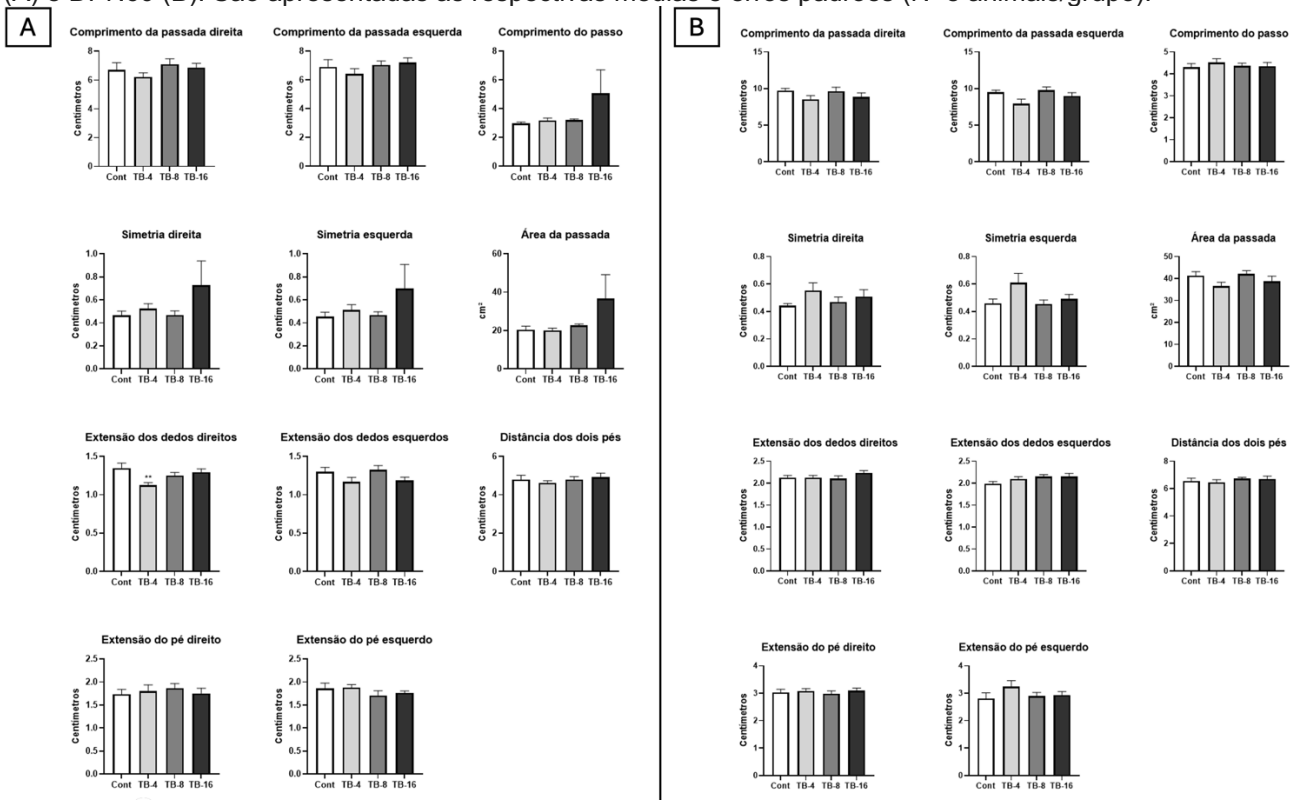
Para a execução da marcha, os roedores utilizam os quatro membros para caminhar e manter o equilíbrio, aspectos locomotores que são coordenados pelo SNC sobre a musculatura esquelética através da junção neuromuscular. Portanto, o comprometimento em um único aspecto da via motora pode interferir na realização de certos movimentos (PANTALEON et al., 2023).

Por ser dependente da musculatura esquelética, o padrão da marcha pode ser modificado mediante a exposição de TB-A, considerando, ainda, que essa molécula pode ter uma distribuição sistêmica e atuar em tecidos distantes daqueles em que houve a exposição (WERTMAN et al., 2019). Neste trabalho, em específico, a análise da marcha apresentou maior relevância, considerando que as células-alvo da TB-A são as fibras musculares esqueléticas.

A Figura 4 apresenta os resultados obtidos pela análise do teste da marcha da prole masculina de ratas expostas a TB-A no DL2 por via intramuscular, no DPN22 (Figura 4A) e DPN60 (Figura 4B). A ANOVA de uma via mostrou que animais tratados com a menor dose

de TB-A (TB-4) apresentaram diminuição na extensão dos dedos direitos no DPN22 (F(3,28)=4,009; p=0,0171). Para os demais parâmetros não houve diferença significativa em ambas as datas de análise.

Figura 4: Parâmetros do teste da marcha realizados pela prole masculina de ratas Wistar tratadas por Toxina Botulínica Tipo A em diferentes doses (4, 8, 16 U/Kg) por via intramuscular no DL2, no DPN22 (A) e DPN60 (B). São apresentadas as respectivas médias e erros padrões (N=8 animais/grupo).



p>0,05. ANOVA de uma via.

O aumento na extensão dos pés e dos dedos está relacionado a um mecanismo compensatório para manutenção do equilíbrio e da postura sobre as quatro patas. Contudo diferenças nesses parâmetros só foram observadas no grupo experimental exposto a menor dose, TB-4, e apenas no DPN22, ou seja, foi uma alteração pontual e transitória, que não foi mais observada no DPN60, idade em que os ratos já são considerados adultos, e que, portanto, não demonstra ser uma alteração fisiologicamente relevante (CHOUDHURY et al., 2021; YAMAMOTO et al., 2019; PANTALEON et al., 2023).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados e tomados em conjunto mostraram que a administração dose única de TB-A (4, 8 ou 16U/kg) na lactação não causou alterações no desenvolvimento físico e reflexológico da prole masculina e, apesar do mecanismos de ação bem conhecido desta molécula, não houve interferência nos parâmetros relacionados à atividade locomotora

dos animais, analisados a curto e longo prazo, corroborando com a ideia de que a TB-A parece ter um efeito restrito ao seu local de aplicação e de não ser excretada pelo leite materno, sendo, portanto, segura para lactantes.

6 REFERÊNCIAS

ANANDAN, C.; JANKOVIC, J. Botulinum Toxin in Movement Disorders: An Update. **Toxins**, v. 13, n.1, 2021.

ALLERGAN, INC. **BOTOX® (onabutulinumtoxinA) for injection, for intramuscular, intradetrusor, or intradermal use.** 2023. 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: 12 mar 2024.

CHOUDHURY, S.; BAKER, M.R.; CHATTERJEE, S.; KUMAR, H. Botulinum Toxin: An Update on Pharmacology and Newer Products in Development. **Toxins**, v. 13, n. 1, 2021.

CRUZ, A.I.; LIMA, J.M.C.S.R.; ARAÚJO, L.F.; SILVA, M.S.; LIMA, P.C.C.S.R.; FERREIRA, R.V.V.L. The use of botulinum toxin in pregnant lactating women: literature review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.

HABR, S.F.; BERNARDI, M.M.; CONCEIÇÃO, I.M.; FREITAS, T.A.; FELICIO, L.F. Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, n.1, p.115-121, 2011.

HALE, T.W. Drugs and Breast Milk: Safety and Pharmacokinetics. **Texas Tech University Health Sciences Center**, 2019.

HALE, T.W.; ROWE, H.E. Medications and Mothers' Milk: A Manual of Lactational Pharmacology. **Springer Publishing Company**, 2017.

JANK, B.; GUPTA, R. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and its role in drug transport across the mammary gland. **Pharmaceutical Research**, v. 39, n. 2, p. 123–131, 2022.

LA-VU, M.; TOBIAS, B.C.; SCHUETTE, P.J.; ADHIKARI, A. To Approach or Avoid: An Introductory Overview of the Study of Anxiety Using Rodent Assays. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT**. Test Guideline 414: Prenatal developmental toxicity study**. Paris, OECD, 2023. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070820-en.pdf?expires=1695067584&id=id&accname=guest&checksum=DE14536DE2969AE7FD9F6DC0F5D08BFE>. Acesso em: 25 abr 2025.

PANTALEON, L.P.; FUKUSHIMA, A.R.; MOREIRA, N.; DE-PAULA, L.R.; RIBEIRO, G.; PEÑA-MUNOZ, J.W.; FARIA, B.P.P.; MENDONÇA, M.; ABREU, G.R.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; DELORENZI, J.C.B.; WAZIRY, P.A.F.; SPINOSA, H.S.; RICCI, E.L. Physiological gait test: an effective method for analyzing balance, locomotion, and neuromuscular disorders in rats and a comparison to the elevated beam test. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences**, v. 60, 2023.

PINTO, W.B.C.; SOUZA, P.V.S.; KO, G.M. Avaliação da marcha normal e patológica no camundongo. **Revista Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 3, n. 1, p. 45-51, 2015.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RICCI, E.L.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; PANTALEON, L.P.; DE-PAULA, L.R.; RIBEIRO, G.M.; ABREU, G.R.; MUÑOZ, J.W.P.; MENDONÇA, M.; FUKUSHIMA, A.R.; SPINOSA, H.S. Peripubertal exposure of atrazine cause decrease in exploratory activity, deficits in sociability and few alterations on brain monoaminergic systems of rats. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 483, p. 116819, 2024.

SANDINI, M.S.; UDO, M.S.B.; REIS-SILVA, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavior development of offspring rats. **International Journal of Development Neuroscience**, 2014.

SEIBENHENER, M.L.; WOOTEN, M.C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 96, 2015.

UDO, M.S.B.; SANDINI, T.M.; REIS, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, M.M. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 27-33, 2014.

VALVASSORI, S.S.; VARELA, R.B.; QUEVEDO, J. **Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression**. In: CONN, P.M. Animal Models for the Study of Human Disease. Massachusetts: Academic Press, 2017. p. 991-1001.

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.

WITMANOWSK, H.; BŁOCHOWIAK, K. The whole truth about botulinum toxin – a review. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 37, n. 6, 853-861.

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.; RICCI, E.L.; SPINOSA, H.S. Ketamine causes poor maternal care in rats with postpartum depression and leads to few behavioral and neurochemical alterations on male offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 459, p. 114799, 2024.

Contatos: leonardoquilici06@gmail.com e lorena.pantaleon@mackenzie.br