NATÁLIA RIBEIRO SAMBATTI

VALIDAÇÃO DA CULTURA DE EXPLANTES UTERINOS DE CADELAS EM DIESTRO E ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA

Londrina
2024

NATÁLIA RIBEIRO SAMBATTI

VALIDAÇÃO DA CULTURA DE EXPLANTES UTERINOS DE CADELAS EM DIESTRO E ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profª Drª Maria Isabel Mello Martins.
Coorientadora: Profª Drª Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

N226v Sambatti, Natália Ribeiro .

Validação da Cultura de Explantes Uterinos de Cadelas em Diestro e Alterações Induzidas pela Micotoxina Zearalenona / Natália Ribeiro Sambatti. - Londrina, 2024.
89 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.
Coorientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Cultivo in vitro - Tese. 2. Histologia - Tese. 3. Dano Oxidativo - Tese. 4. Útero - Tese. I. Martins, Maria Isabel Mello. II. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

NATÁLIA RIBEIRO SAMBATTI

VALIDAÇÃO DA CULTURA DE EXPLANTES UTERINOS DE CADELAS EM DIESTRO E ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Profª. Orientadora: Profª Drª Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª. Coorientadora: Profª Drª Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut
Universidade de Uberaba (UNIUBE)

Profa. Dra. Juliana Rubira Gerez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de abril de 2024

Dedico este trabalho a minha orientadora Profª Drª Maria Isabel Mello Martins e coorientadora Profª Drª Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense por me guiarem durante a execução deste projeto. Gratidão eterna!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente na finalização de mais essa etapa tão importante da minha vida profissional. Me proporcionaram força e coragem para enfrentar todos os desafios do mestrado acadêmico.

Aos meus pais, Jair e Aparecida, por sempre estarem presentes do meu lado me apoiando, incentivando, comemorando comigo as pequenas conquistas do dia a dia ou mesmo chorando comigo nos momentos de dificuldade. Não tenho nem palavras para descrever o quanto amo e sou grata a vocês.

Ao meu marido, Vinícius, pelo carinho, paciência, incentivo, consolo, ajuda, enfim, por me dar a certeza de que tenho com quem contar sempre que precisar. Esse último ano do mestrado foi o mais complexo para nós, por ser nosso primeiro ano de casados e por conta da mudança de estado às pressas que fez com que atrasasse um pouco o término dessa etapa tão importante. Cada dia que passa eu fico mais orgulhosa de nós, pois estamos conseguindo segurar muito bem a mão um do outro para enfrentar os desafios diários.

Aos meus queridos amigos do laboratório LARAA: Vinícius, Myrian, Júlia, Bruno, Professora Letícia e Professor Luiz; e do laboratório de anatomia patológica: Bárbara (Lilo) e Luciana pela ajuda recíproca e por tornarem o meu dia a dia mais leve e muito produtivo, sem a colaboração de vocês a concretização desse projeto não seria possível.

À minha professora orientadora Maria Isabel, pela orientação desde o meu terceiro ano da graduação, pela paciência, por me manter firme neste projeto de mestrado (que foi desafiador por estar totalmente fora da minha zona de conforto), por todo o tempo dedicado, por dividir comigo todo o seu conhecimento e experiência. A senhora é muito mais que minha orientadora, é minha amiga, uma pessoa maravilhosa que eu sei que posso sempre contar. Ao longo da execução desse projeto, muita coisa não saiu como o planejado e é claro que era para a senhora que eu ia correndo chorar, porém, ao mesmo tempo, qualquer pequena evolução no estudo ou aprendizado das novas técnicas laboratoriais era uma vitória e é claro que também comemorávamos juntas!

Da mesma forma também agradeço imensamente a minha professora coorientadora Ana Paula, por estar sempre disponível para tirar as minhas dúvidas,

por me mostrar os caminhos a serem seguidos no mundo dos explantes e das micotoxinas, por me estimular a ter um pensamento crítico e por abrir as portas do seu laboratório e de outros nessa universidade para a execução desse projeto de mestrado. Não tenho palavras para descrever a minha gratidão a vocês, professora Maria Isabel e Professora Ana Paula, vocês são inspiração e exemplo de dedicação e carinho pela profissão!

Estendo meus agradecimentos a todos os professores da pós-graduação pelos ensinamentos e ao Laboratório de Farmacologia Vascular-Departamento de Fisiologia, juntamente com o Dr. Fernando Henrique Borges, pela disponibilidade em me ensinar todo o processo de avaliação do estresse oxidativo. Para mim foi muito desafiador as análises que envolvem a avaliação do dano oxidativo e a capacidade antioxidante de um tecido, sem a sua ajuda Fernando, não seria possível a inclusão desses dados tão relevantes do estresse oxidativo nesse estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina e todos os seus funcionários que autorizaram realização deste projeto de pesquisa e disponibilizaram tanto a estrutura física, quanto os materiais cirúrgicos utilizados e permitiram ajustes na escala de utilização das salas de cirurgia quando algum animal teve a necessidade de realização do procedimento em algum dia em específico.

Aos tutores dos animais que se disponibilizaram a trazer seus animais para serem castrados no Hospital Veterinário da UEL. Sem a autorização de vocês e paciência pelas vezes que tiveram de comparecer ao hospital (acompanhamento do ciclo estral, exames pré-operatórios, cirurgia e acompanhamento no pós-operatório), não seria possível o número de animais que eficientemente fizeram parte do projeto de pesquisa.

Por fim e não menos importante, à banca examinadora, pela participação e contribuição científica.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

SAMBATTI, Natália Ribeiro. **Validação da Cultura de Explantes Uterinos de Cadelas em Diestro e Alterações Induzidas pela Micotoxina Zearalenona**. 2024. 89pg. Dissertação (Mestrado em 2024) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

A frequente incidência de problemas uterinos em cadelas demanda estudos aprofundados para compreensão e prevenção dessas afecções. A cultura de explantes surge como uma alternativa ética e eficiente, permitindo procedimentos experimentais mais controlados, realizados em um menor espaço de tempo e com a redução no número de animais em experimentação. Micotoxinas, como a zearalenona, afetam negativamente o desenvolvimento reprodutivo. Contudo, seus efeitos específicos no útero ainda não estão completamente compreendidos. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi padronizar em cadelas um método de cultivo uterino *in vitro*, bem como avaliar os efeitos histológicos e metabólicos, provocados pelo α-zearalenol (α-Zol), metabólito proveniente da zearalenona, no útero de cadelas em diestro, utilizando o modelo *ex vivo*. Dez úteros foram obtidos de cadelas saudáveis, entre um e oito anos, submetidas à ovariohisterectomia na fase estral de diestro. Os explantes uterinos foram obtidos com o auxílio de *punch* de 6mm e posteriormente incubados a 38ºC, em meio de cultivo DMEM enriquecido, sob agitação. Os explantes foram divididos em: controle, α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Após 24 horas de incubação em estufa, uma parte dos explantes foram fixados e processados para a realização do escore lesional e morfometria por meio da histologia e outra parte foi armazenada em freezer a – 80ºC para posterior análise da resposta ao estresse oxidativo. Além disso, parâmetros de homeostasia celular foram avaliados no sobrenadante do meio de cultivo. Os principais achados histológicos nos explantes expostos ao α-Zol foram achatamento do epitélio de revestimento e apoptose do epitélio de revestimento e glandular. Aumento significativo no escore lesional foi observado nos explantes expostos a ambas as concentrações de α-Zol em relação ao controle; o escore lesional não diferiu entre os grupos tratados. Não houve diferença significativa na morfometria entre os tratamentos, bem como na análise do sobrenadante do meio de cultivo. A maior concentração de α-Zol induziu aumento de carbonilação de proteínas e, em ambos os tratamentos ocorreu a oxidação de lipídeos de membranas. Conclui-se que o modelo *ex vivo* utilizado demonstrou efetividade na avaliação da toxicidade induzida pelo metabólito α-Zol em explantes uterinos de cadelas, resultando em alterações histológicas e alteração do estado redox, mesmo na menor concentração de α-Zol (0,68 µM).

Palavras-chave: α-Zearalenol. Cultivo *in vitro*. Ciclo Estral. Histologia. Dano Oxidativo. Útero.

SAMBATTI, Natália Ribeiro. **Validation of Culture of Uterine Explants from Bitches in Diestrus and Alterations Induced by Mycotoxin Zearalenone.** 2024. 89pp. Dissertation (Master's degree in 2024) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

The high incidence of uterine issues in female dogs necessitates in-depth studies to better understand and prevent these conditions. Explant culture presents an ethical and effective alternative, enabling more controlled experimental procedures to be conducted over shorter periods and reducing the number of animals required for experiments. Mycotoxins, such as zearalenone, adversely impact reproductive development; however, their specific effects on the uterus remain insufficiently understood. This study aimed to establish a standardized in vitro uterine culture method for bitches and to assess the histological and metabolic effects of α-zearalenol (α-Zol), a zearalenone metabolite, on the uterus of bitches in diestrus, using an ex vivo model. Ten uteri were obtained from healthy bitches, aged one to eight years, who underwent ovariohysterectomy during the diestrus phase. Uterine explants were created using a 6-mm punch and subsequently incubated at 38°C in an enriched DMEM culture medium with agitation. The explants were divided into three groups: control, low (0.68 μM), and high (3.4 μM) α-Zol concentrations. After 24 hours of incubation, a part of the explants was fixed and processed for histological lesion scoring and morphometry, while another portion was frozen at -80°C for later analysis of oxidative stress response. Additionally, cellular homeostasis parameters were assessed in the culture medium supernatant. The primary histological findings in explants exposed to α-Zol included flattening of the lining epithelium and apoptosis of lining and glandular epithelium. A significant increase in lesion score was observed in explants exposed to both α-Zol concentrations compared to controls, although no difference was noted between treated groups. There was no significant difference in morphometry across treatments, nor in the analysis of the culture medium supernatant. The highest concentration of α-Zol induced an increase in protein carbonylation, and lipid membrane oxidation occurred in both treated groups. In conclusion, the ex vivo model proved effective for evaluating α-Zol-induced toxicity in uterine explants from bitches, demonstrating histological alterations and redox state changes, even at the lowest concentration of α-Zol (0.68 μM).

Keywords: α-Zearalenol. *In vitro* culture. Histology. Oxidative damage. Uterus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Variações características das concentrações hormonais no ciclo estral da espécie canina. Máxima de progesterona cerca do dia 20–30 do diestro com queda lenta quatro a oito semanas, demonstrando a regressão lútea lenta; a ovulação de ovócitos imaturos 48-60 horas após o pico de LH está indicada pela seta pequena preta 20

Figura 2 – Fotomicrografia das camadas do útero na espécie canina na fase estral de diestro. E: Endométrio, M: Miométrio e P: Perimétrio. Coloração HE, aumento de 40x..... 25

Figura 3 – Fotomicrografia do endométrio na espécie canina na fase estral de diestro, com foco no epitélio de revestimento e glandular. Coloração HE, aumento de 400x..... 27

Figura 4 – Fórmula estrutural da Zearalenona (A) e do 17β-Estradiol (B) 36

ARTIGO

Figura 1 – Fluxograma para obtenção dos fragmentos uterinos de cadelas em fase estral de diestro para o cultivo tecidual. A: Útero e ovários após lavagem externa com água Milli-Q. B: Excisão do ligamento largo do útero. C: Posicionamento dos cornos uterinos após incisão transversal em cada corno, acima do ligamento intercornual e abaixo de cada ovário para que fosse possível uma abertura longitudinal. D: *punch* de biópsia estéril de 6mm utilizado para a obtenção dos explantes. E: Aspecto do corno uterino após a retirada dos explantes. F: Placas de cultura de seis poços com os explantes uterinos submersos no meio de cultivo..... 59

Figura 2 – Morfometria do epitélio glandular e do epitélio de revestimento. Microscopia de luz, coloração HE, aumento de 400 x 61

Figura 3 – Perfil citológico vaginal de cadelas na fase estral de diestro. Células coradas pelo método panóptico e observadas em microscopia de luz em 200x (A) e 400 x (B). As setas demonstram células intermediárias e as pontas de setas a presença de neutrófilos, frequentemente observados nessa fase do ciclo estral..... 66

Figura 4 – Edema intersticial (região circulada - A) e achatamento do epitélio de revestimento (setas - B) frequentemente observado no grupo controle de explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro. Coloração HE, barra de 50 µm. 67
Figura 5 – Sinais de apoptose no epitélio de revestimento e glandular observada nos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro expostos ao α-Zol. Coloração HE, barra de 20 µm 68
Figura 6 – Vacuolização citoplasmática do epitélio de revestimento (pontas de setas – figura A) e glandular (seta preta – figura A) e descamação epitelial (seta vermelha – figura B) observados nos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Coloração HE, barra de 20 µm..... 68
Figura 7 – Escore lesional dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,01) 69
Figura 8 – Morfometria do epitélio glandular (A) e de revestimento (B) dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05) 69
Figura 9 – Avaliação do estresse oxidativo nos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,01). A: Dosagem de proteína carbonílica (PC) expresso em nmol PC/ mg de proteína. B: Teste de avaliação dos níveis de lipoperoxidação expresso em nmol TBARS/mg de proteína. C: Dosagem de malondialdeído (MDA) expresso em mmol/mg de proteína 71

Figura 10 – Mensuração da capacidade antioxidante dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05). A: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) expresso em % de inibição/U SOD/mg de proteína. B: Dosagem da atividade da enzima catalase (CAT) expresso em µmol H_2O_2.min^{-1}/mg de proteína. C: Mensuração da glutationa s-transferase (GST) expresso em µmol/min/mg de proteína. D: Teste da capacidade de redução do ferro férrico (FRAP) expresso em mmol Fe^2/L 72

Figura 11 – Análises bioquímicas do meio de cultivo realizadas antes e após 24 horas de cultivo dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro. Valores expressos pela média. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05). Na^+: íon sódio. K^+: íon potássio. Ca^{2+}: íon cálcio. mOsm: osmolaridade. Lac: Lactato. UCFP: teste de determinação quantitativa de proteína total. Glu: Glicose. Cl^-: Cloro .. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore lesional no endométrio de cadelas em fase estral de diestro – classificados pelo tipo de lesão histológica e multiplicados pelo fator de gravidade das lesões 61

Tabela 2 – Frequência de alterações histológicas em explantes uterinos expostos aos diferentes tratamentos – controle 0h (sem incubação), controle 24h, α-Zol em baixa (0,68 μM) e alta (3,4 μM) concentração. 67

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos parâmetros de homeostasia celular do sobrenadante do meio de cultivo controle, meio contendo α-Zol em baixa (0,68 μM) e alta (3,4 μM) concentração. 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cl^{-}	Cloro
CO2	Gás Carbônico
CONTAM	Painel dos Contaminantes da Cadeia Alimentar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E2	17 β-Estradiol
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Poder Antioxidante Redutor Férrico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
Glu	Glicose
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
GSR	Glutationa Redutase
GST	Glutationa S-transferase
HE	Técnica de coloração: Hematoxilina e Eosina
HEC	Hiperplasia Endometrial Cística
K^{+}	Potássio
Lac	Lactato
LARAA	Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida
LH	Hormônio Luteinizante
LOAEL	*Lowest Observed Adverse Effect Level*/nível mais baixo de efeito adverso
MDA	Malondialdeído
mOsm	Osmolaridade

Na^+	Sódio
NBT	Teste de Redução do Tetrazólio Nitroazul
OH	Ovariohisterectomia
P4	Progesterona
PC	Proteína Carbonílica
PCN	Projeto de Controle Populacional de Cães e Gatos
PGF2α	Prostaglandina F2α
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UCFP	Teste de determinação quantitativa de proteína total
UEL	Universidade Estadual de Londrina
ZEA	Zearalenona
α-Zol	α-Zearalenol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 14

2 REFERENCIAL TEÓRICO 16

2.1 GRUPO EXPERIMENTAL – ESPÉCIE CANINA 16
2.1.1 Ciclo Estral das Cadelas 17
2.1.1.1 Proestro 20
2.1.1.2 Estro 21
2.1.1.3 Diestro 22
2.1.1.4 Anestro 24
2.1.2 Histomorfologia Uterina Canina 25
2.1.2.1 Endométrio 26
2.1.2.2 Miométrio 27
2.1.2.3 Perimétrio 28
2.1.3 Alterações Reprodutivas Comuns na Fase Estral de Diestro 28
2.1.3.1 Complexo hiperplasia endometrial cística e piometra 29
2.1.3.2 Pseudociese 30
2.1.3.3 Metrite puerperal 32
2.1.3.4 Neoplasias 32
2.1.3.5 Distúrbios reprodutivos multifatoriais 33

2.2 MICOTOXINAS 33
2.2.1 Zearalenona 36

2.3 MODELO EXPERIMENTAL *EX VIVO* 41
2.3.1 Método *ex vivo* em tecido uterino 43
2.3.2 Estresse Oxidativo e a Reprodução da Fêmea 44

3 JUSTIFICATIVA 47

REFERÊNCIAS 48

4 HIPÓTESES 53

5. OBJETIVOS 53
5.1 OBJETIVO GERAL 53
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 53

6 ARTIGO – ALFA-ZEARALENOL INDUZ TOXICIDADE EM EXPLANTES UTERINOS DE CADELAS EM FASE ESTRAL DE DIESTRO 54

6.1 INTRODUÇÃO 55

6.2 MATERIAL E MÉTODOS 57
6.2.1 Aspecto Ético 57
6.2.2 Seleção dos Animais e Obtenção das Amostras 57
6.2.3 Procedimento Anestésico e Cirúrgico 58
6.2.4 Preparo Tecidual e Cultivo dos Explantes 58
6.2.5 Protocolo de Histomorfologia e Morfometria 60
6.2.6 Análise da Resposta ao Estresse Oxidativo 62
6.2.6.1 Quantificação de dano oxidativo 62
6.2.6.1.1 Proteína Carbonílica (PC) *62*
6.2.6.1.2 Análise da lipoperoxidação *62*
6.2.6.1.3 Análise da Malondialdeido (MDA) *63*
6.2.6.2 Avaliação da capacidade antioxidante 63
6.2.6.2.1 Superóxido Dismutase (SOD) *63*
6.2.6.2.2 Catalase (CAT) *63*
6.2.6.2.3 Glutationa S-transferase (GST) *64*
6.2.6.2.3 Poder antioxidante redutor férrico (FRAP) *64*
6.2.7 Análises Bioquímicas do Meio de Cultivo 64
6.2.8 Análise Estatística 65

6.3 RESULTADOS 65
6.3.1 Fase do Ciclo Estral 65
6.3.2 Análise Histológica 66
6.3.3 Análise da Resposta ao Estresse Oxidativo 70

6.3.3.1 Quantificação de dano oxidativo 70
6.3.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante 71
6.3.4 Análises Bioquímicas do Meio de Cultivo 72

6.4 DISCUSSÃO 74

6.5 CONCLUSÃO 78

6.6 REFERÊNCIAS 78

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 82

ANEXOS 84

1. INTRODUÇÃO GERAL

A incidência de problemas no sistema reprodutor de cadelas, particularmente no útero, se mostra expressiva nos animais que procuram atendimento veterinário, levando a uma constante demanda de estudos para melhor compreensão, profilaxia e tratamento de suas afecções (ANDRADE; TOMA, 2023; BALTHAZAR DA SILVEIRA et al., 2013).

O estudo das alterações no sistema genital feminino deve ser constantemente aprofundado, em virtude das alterações morfofisiológicas decorrentes de influências hormonais, sanitárias e nutricionais (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

O cultivo de explantes, também denominado como método *ex vivo*, tem passado por um processo de aprimoramento baseando-se no cultivo de fragmentos teciduais obtidos por *punch* ou bisturi e posteriormente cultivados em meio de cultura à temperatura semelhante a corporal, se assemelhando a condições *in vivo.* Esse método é utilizado rotineiramente para triagem de eficiência e toxicidade de produtos químicos e medicamentos (BASSO; BRACARENSE, 2013; DOKE; DHAWALE, 2015).

Corriqueiramente questões éticas e operacionais limitam os estudos em animais, dessa forma, o cultivo de tecidos *ex vivo* surge como uma alternativa nos estudos do sistema reprodutor em animais, pois permite que procedimentos experimentais controlados pelo pesquisador sejam realizados em um menor espaço de tempo e com um número reduzido de animais, sem reduzir as repetições experimentais (BASSO; BRACARENSE, 2013; TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

A técnica do cultivo de explantes de tecidos ovariano e intestinal, em combinação com a contaminação forçada por meio de micotoxinas vem sendo trabalhada na área da ciência animal e tem mostrado resultados promissores (DA SILVA et al., 2019; GEREZ et al., 2021; GEREZ; DESTO; BRACARENSE, 2017).

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas por fungos filamentosos, com efeitos tóxicos em diversos órgãos de animais e humanos (KNUTSEN et al., 2017). São contaminantes presentes principalmente em produtos vegetais, que por sua vez, são amplamente utilizados na formulação de rações para alimentação animal. Tais micotoxinas são potenciais causadoras de alterações histológicas, patológicas e hormonais (ESCRIVÁ; FONT;

MANYES, 2015; GEREZ et al., 2021).

Alguns autores relatam preocupação, a longo prazo, referente ao consumo de rações, pois a ingestão crônica de micotoxinas presentes em algumas rações pode levar a efeitos tóxicos intensificados pela ação sinérgica de diferentes micotoxinas (GRANDI et al., 2019; MACÍAS-MONTES et al., 2020).

A micotoxina Zearalenona (ZEA) tem a capacidade de mimetizar o comportamento do hormônio sexual esteroidal endógeno 17β-estradiol. Ao ligar-se aos receptores estrogênicos, resulta em alterações reprodutivas como: redução na taxa de ovulação, com menor incidência de partos; prolongamento do ciclo estral; ocorrência de eritema e edema vulvar; modificações macroscópicas e microscópicas no útero e nos ovários; além de variações nos níveis sanguíneos de estrógeno e progesterona. Esses efeitos foram associados à ingestão de alimentos contaminados com ZEA em diferentes espécies, sendo os cães considerados uma das espécies mais sensíveis (ALSHANNAQ; YU, 2017a; KNUTSEN et al., 2017). Desta forma, é de grande importância, conduzir estudos sobre os efeitos desta micotoxina no órgão reprodutivo primário, útero, nessa espécie.

A literatura disponível é escassa sobre a técnica do cultivo de explantes para o tecido uterino de cadelas, e a fim de trazer maiores informações técnico-científicas tanto para a validação da metodologia nesta espécie, como para investigar potenciais causadores de afecções uterinas por meio da exposição a micotoxina ZEA, pesquisas devem ser conduzidas. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade do método de cultivo *ex vivo* para tecido uterino de cadelas e determinar os efeitos histológicos e metabólicos do α-Zearalenol, metabólito proveniente da micotoxina zearalenona, em explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro, por meio do método *ex vivo*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GRUPO EXPERIMENTAL – ESPÉCIE CANINA

O modelo canino em pesquisas laboratoriais é considerado um dos mais adequados por diversos fatores e já é utilizado há algum tempo em estudos farmacológicos e toxicológicos. Por razões sociais não é o modelo mais utilizado, porém é um dos mais interessantes para investigação de aspectos comparativos da fisiologia reprodutiva em outros mamíferos, com possibilidade de adaptação da pesquisa translacional com seres humanos (KOWALEWSKI, 2018).

Na oncologia comparada, os cães são excelentes modelos experimentais, pelo fato de serem animais de porte relativamente grande, possuírem um sistema imunológico competente e por conviverem no mesmo ambiente que os seres humanos. Em estudos com melanoma e carcinomas cutâneos foi observado que os cães desenvolvem neoplasias em um tempo relativamente mais curto em comparação ao homem e demonstraram semelhanças genéticas, moleculares, epidemiológicas e histopatológicas. A pesquisa na espécie canina proporciona vantagens para o avanço e descoberta de novas terapias, aprimoramento das existentes, ajustes de doses, além da capacidade de avaliar a eficácia e a toxicidade a longo prazo de certas substâncias, beneficiando ambas as espécies (LIMA et al., 2022).

A procura por serviços especializados na área da reprodução tem crescido consideravelmente e o interesse social e econômico justifica a demanda em assimilar as particularidades reprodutivas dos cães, visto que muitas alterações clínicas dessa espécie não estão bem compreendidas, como por exemplo, a insuficiência do corpo lúteo e o complexo hiperplasia endometrial cística (KOWALEWSKI, 2018).

A fertilização *in vitro* de oócitos que amadureceram *in vivo* já foi relatada em cães, porém a eficácia ainda é limitada em relação a maturação oocitária *in vitro* após a ovulação. Assim, os cães podem ser considerados modelos de pesquisas na reprodução para espécies de canídeos ameaçados de extinção, com intuito de aprimorar e desenvolver técnicas de reprodução assistida (KOWALEWSKI, 2018).

2.1.1 Ciclo Estral das Cadelas

As cadelas são classificadas como monoéstricas, preferencialmente não sazonais e apresentam características reprodutivas distintas que as diferenciam de outras espécies. O ciclo sexual é longo se comparado com outras fêmeas domésticas, exibindo variações raciais e individuais quanto a duração de cada fase do ciclo estral (CONCANNON, 2011; JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001; KOWALEWSKI, 2018).

As fêmeas geralmente iniciam a vida reprodutiva entre dois e três meses após atingirem o tamanho corporal de adulto. Isso significa que a idade de início pode variar de acordo com a raça, porte e características individuais. Desta forma, cadelas de pequeno porte, iniciam o ciclo reprodutivo antes das de grande porte. No entanto, de modo geral, o primeiro cio ocorre entre seis e 24 meses de idade (ALVES; COVIZZI, 2015; KOWALEWSKI, 2018).

O interestro (período entre os cios) ocorre com intervalos de cinco a 12 meses, com média de seis meses, desta forma, as cadelas podem ter de um a três ciclos estrais por ano, a depender da raça, tamanho corporal, variação individual e condições ambientais nas quais a cadela vive. Se comparado com outras espécies domésticas, o ciclo estral das cadelas é considerado longo (ALVES; COVIZZI, 2015; CONCANNON, 2011).

Diferente de outras espécies de mamíferos, a fêmea canina (CONCANNON, 2011; KOWALEWSKI, 2018):

1. Libera um oócito imaturo e essa maturação ocorre após cerca de dois dias da ovulação nas tubas uterinas;
2. Tem um aumento pré-ovulatório da produção folicular de progesterona que culmina com o aumento de progesterona sérica;
3. Apresenta uma fase lútea longa tanto em cadelas gestantes quanto não gestantes, com aumento mamário detectável em algumas cadelas;
4. Não produz esteroides na placenta e, portanto, é totalmente dependente do corpo lúteo para a manutenção da gestação.
5. O corpo lúteo demora mais para atingir a completa capacidade de secreção de progesterona (15 a 30 dias pós-ovulação);

6. Apresenta anestro obrigatório longo, entre as fases sexualmente ativas de repouso ou quiescência ovariana.

Apesar dessas características únicas do ciclo reprodutivo da cadela, os mecanismos endócrinos do ciclo estral não são diferentes dos outros mamíferos, em que a ovulação ocorre após o pico do hormônio luteinizante (LH), por exemplo (CONCANNON, 2011).

As cadelas e outros canídeos, como mencionado anteriormente, são uma exceção dentre outras espécies, pois os oócitos imaturos são ovulados no estágio primário e, portanto, necessitam de mais dois a três dias para maturação no oviduto, para alcançar o estágio de oócitos secundários considerados férteis. A retomada da meiose e a finalização da divisão é estimulada pelo pico pré-ovulatório de LH. Tal fato dificulta substancialmente a aplicação de técnicas de inseminação artificial, visto que as informações sobre os requisitos para o término da meiose do oócito *in vitro* é escasso, ao contrário dos bovinos e equinos por exemplo (KOWALEWSKI, 2018).

O ciclo estral das cadelas inclui quatro fases distintas: proestro, estro, diestro e anestro. O diagnóstico e acompanhamento de cada fase pode ser realizado com base nos aspectos comportamentais, sinais clínicos, citologia vaginal, vaginoscopia, dosagem sérica de progesterona, e ultrassonografia reprodutiva, principalmente dos ovários (ALVES; COVIZZI, 2015; JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

A citologia vaginal é um exame de fácil aplicação e subutilizado para detecção da fase estral e de algumas afecções do sistema genital. É um exame bem preciso quando realizado de forma seriada, associado ao histórico reprodutivo e exame físico da fêmea. A citologia é executada por meio da colheita de células epiteliais vaginais, células inflamatórias e secreções com auxílio de uma escova ginecológica ou *swab*. O material é depositado em uma lâmina, corado e depois analisado por microscopia óptica. Tal exame permite analisar o tipo de secreção vaginal e as células da mucosa vaginal identificando se a fêmea se encontra em uma condição fisiológica ou patológica e sob influência do estrógeno ou não (KUSTRITZ, 2020; RECKERS et al., 2022).

É possível a identificação de diferentes células epiteliais vaginais na microscopia óptica: as células parabasais que estão sempre presentes no canal

vaginal, são pequenas e arredondadas, com baixa relação entre núcleo e citoplasma, são células que ficam acima da membrana basal; as células intermediárias são mais superficiais se comparado às anteriores e nem sempre estão presentes no canal vaginal. São um pouco maiores que as parabasais, com a relação núcleo/citoplasma mais proeminente; as células superficiais são identificadas nas fases do ciclo estral em que há o aumento de estrógeno, momento em que as células parabasais aumentam sua divisão celular, e iniciam a apoptose. São células grandes, irregulares e com elevada relação núcleo/citoplasma, além disso, quando o núcleo não está visível essas células são denominadas de cornificadas. Neutrófilos, hemácias e bactérias também podem ser observadas em uma citologia vaginal (KUSTRITZ, 2020).

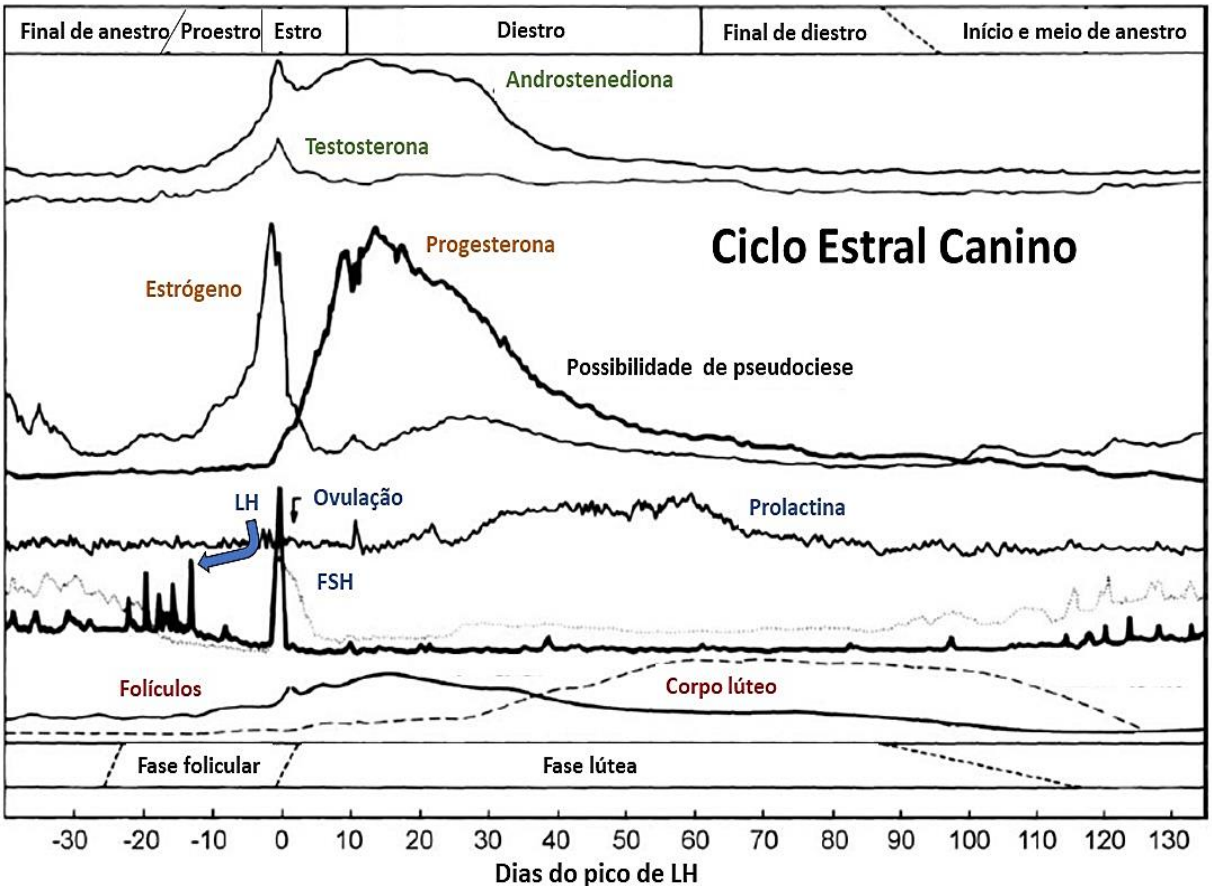
A vaginoscopia é um procedimento útil para analisar alterações na mucosa vaginal conforme a fase estral, a origem de corrimentos vaginais e como auxiliar na detecção e localização de problemas intravaginais como neoplasias e anormalidades congênitas. Esse exame é caracterizado pela sua rapidez, facilidade de realização com o equipamento específico e por não causar traumas. Além disso, a inseminação intrauterina é passível de ser efetuada com o auxílio do vaginoscópio para a realização do cateterismo transcervical (LÉVY, 2016).

Um estudo em larga escala definiu o perfil sérico normal de progesterona durante o período de cio com 1300 cadelas de diversas raças, idades e pesos corporais a fim de determinar com precisão o momento ideal de inseminação. Baseando-se nos eventos que abrangem o pico de LH e a ovulação após dois a três dias, a concentração média de progesterona no dia do pico de LH foi de 2,7 ± 0,6 ng/ml e no momento da ovulação foi de 4,8 ± 0,9 ng/ml em dois dias após o pico de LH e 7,2 ± 1,3 ng/ml três dias após o mesmo pico. Não houve distinção nos perfis de progesterona de cadelas com diferentes pesos corporais (HOLLINSHEAD; HANLON, 2019).

O exame ultrassonográfico do sistema genital feminino permite a avaliação de processos fisiológicos da cadela, como ovulação, gestação e de afecções reprodutivas como cistos ovarianos, piometra e metrite. Modificações nas estruturas reprodutivas são observadas a depender da fase estral e devem ser distinguidas com cautela por meio da compreensão do ciclo estral e da realização deste exame de forma seriada, para que não haja interpretações errôneas (DAVIDSON; BAKER, 2009).

Devido ao fato das atividades gonadais serem cíclicas, diferentes características morfológicas e funcionais são observadas nos órgãos femininos. Essa ciclicidade é influenciada e regulada por hormônios esteroides (demonstrados na Figura 1) que interligam a ação hormonal entre hipotálamo, hipófise, gônadas e útero (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

Figura 1 – Variações características das concentrações hormonais no ciclo estral da espécie canina. Máxima de progesterona cerca do dia 20–30 do diestro com queda lenta quatro a oito semanas, demonstrando a regressão lútea lenta; a ovulação de ovócitos imaturos 48-60 horas após o pico de LH está indicada pela seta pequena preta.



Fonte: Adaptado de Concannon (2011).

2.1.1.1 Proestro

O proestro tem duração média de 5 a 20 dias (CONCANNON, 2011) e é a fase na qual a fêmea inicia os sinais clínicos e comportamentos de cio, como vulva edemaciada, presença de secreção vaginal serosanguinolenta e atração de machos, porém sem que a fêmea permita a cópula. Esses sinais aparecem devido ao

aumento das concentrações séricas de estrógeno pelo crescimento folicular. Além disso, o aumento do estrógeno provoca modificações no epitélio vaginal e sua descamação (ALVES; COVIZZI, 2015).

Na citologia vaginal, o início desta fase é caracterizado por presença de hemácias e de tipos celulares com grande variação na forma e no tamanho nuclear que, ao se aproximar da fase subsequente, vão se tornando mais homogêneas e anucleadas. Portanto, no final desta fase o predomínio é de células vaginais do tipo superficiais (KUSTRITZ, 2020; RECKERS et al., 2022).

Na vaginoscopia, o canal vaginal encontra-se com coloração rósea, espessado e com pregas arredondadas da mucosa pelo edema (ALVES; COVIZZI, 2015; LÉVY, 2016).

A dosagem de progesterona sérica no início desta fase tem valores menores do que < 1,0ng/mL e ao redor de 2,7 ± 0,6 ng/mL no dia do pico do LH (HOLLINSHEAD; HANLON, 2019). Já o estrógeno começa a declinar à medida que a progesterona aumenta, o que reflete na maturação folicular, que ocorre antes da ovulação (ALVES; COVIZZI, 2015).

Ao exame ultrassonográfico, a superfície do ovário pode estar irregular e com a presença de múltiplas estruturas císticas foliculares anecoicas de até 1 cm que vão aumentando ao longo dos dias e ficam com as paredes distintas e com fluido anecoico no centro com realce distal. Já o útero apresenta-se mais espesso devido à atuação do estrógeno nas glândulas endometriais e com discreta quantidade de líquido intraluminal (DAVIDSON; BAKER, 2009).

2.1.1.2 Estro

O estro tem duração média de 5 a 15 dias (CONCANNON, 2011). Nesta fase a cadela está receptiva à cópula, a vulva se torna flácida, há redução ou ausência de secreção vaginal. Fase em que acontece a ovulação, maturação oocitária e fertilização (ALVES; COVIZZI, 2015).

Na citologia vaginal pode-se observar mais da metade das células vaginais queratinizadas e anucleadas, chamadas de células do tipo superficiais (KUSTRITZ, 2020).

Na vaginoscopia a mucosa vaginal se apresenta com pregas muito angulosas tornando-se enrugadas devido à redução do edema presente na fase

anterior, crenadas e mais pálidas. Pode-se observar secreção mucoide de colorações variando de vermelho claro, amarelo ou transparente (LÉVY, 2016).

O estro é demarcado pela redução nos níveis de estrógeno e elevação da progesterona (CONCANNON, 2011). A dosagem de progesterona, no início, a partir de 2,7 ± 0,6 ng/mL, que corresponde ao pico de LH até 25ng/mL no fim desta fase (HOLLINSHEAD; HANLON, 2019). O aumento gradual da progesterona ocorre pela luteinização pré-ovulatória dos folículos persistentes até o aumento de LH (ALVES; COVIZZI, 2015). A ovulação ocorre quanto a progesterona alcança os níveis séricos de 4,8 ± 0.9 ng/mL e 7,2 ±1,3 ng/mL no segundo e terceiro dia após o pico de LH (HOLLINSHEAD; HANLON, 2019).

Pelo exame ultrassonográfico é possível reconhecer o dia da ovulação mediante a observação do folículo colapsado ou corpo lúteo. Antes da ovulação os folículos ovarianos são identificados como estruturas císticas anecoicas ou hipoecoicas com contorno e repletas de líquido que se modificam rapidamente para corpos hemorrágicos isoecoicos a hiperecoicos durante a ovulação e após se tornam opacos e sem contornos definidos. Já o útero, assim como no proestro, apresenta-se mais espesso e com discreta quantidade de líquido intraluminal (DAVIDSON; BAKER, 2009; TSUCHIDA et al., 2022).

2.1.1.3 Diestro

O diestro tem duração média de 50 a 80 dias (CONCANNON, 2011). É considerado a fase da refratariedade da fêmea às atividades reprodutivas, portanto, a fêmea não apresenta mais nenhum interesse pelo macho, a vulva reduz de tamanho e pode-se observar a presença de secreção vaginal de coloração clara no início dessa fase (ALVES; COVIZZI, 2015).

Pela ação do LH, as células da granulosa e da teca interna sofrem luteinização e ocupam a área de hemorragia do corpo hemorrágico criando o corpo lúteo, que é desenvolvido logo após a ovulação. A secreção de progesterona provém das células luteínicas que compõem o corpo lúteo (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

A regressão do corpo lúteo é lenta e progressiva nas cadelas não gestantes e ocorre de forma rápida no pré-parto, e está relacionada a mudanças na estrutura e função das células esteroidogênicas e a processos de remodelamento no

parênquima do corpo lúteo (KOWALEWSKI, 2018; LUZ et al., 2006). Cerca de 35 dias após a ovulação, a degeneração já pode ser observada nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso com presença de vacúolos intracitoplasmáticos. A função esteroidogênica se torna mais lenta e há redução na expressão de fatores luteotróficos (KOWALEWSKI, 2018).

Mesmo na ausência de gestação há uma preparação do útero para receber um possível concepto até que ocorra a implantação e placentação. A progesterona inibe a divisão celular e leva a mudanças morfológicas nas glândulas endometriais, desenvolvendo hipertrofia glandular, aumento da vascularização do estroma uterino e aumento do glicogênio no interior das células epiteliais uterinas. Além disso, também ocorre o aumento da glândula mamária com ou sem galactorreia, mesmo nas cadelas não gestantes, condição conhecida por pseudogestação ou pseudociese manifesta (ALVES; COVIZZI, 2015).

Na citologia vaginal as células presentes se modificam repentinamente de queratinizadas para não queratinizadas, com o aparecimento de polimorfonucleares e células espumosas fagocitando leucócitos. Há predomínio de células vaginais do tipo intermediárias pequenas e parabasais nesta fase (KUSTRITZ, 2020; RECKERS et al., 2022).

Na vaginoscopia as pregas vaginais encontram-se planas ou arredondadas. Já a mucosa aparenta estar mais fina e com coloração variando de vermelho claro a rosa-acinzentado. Além disso, pode-se observar secreção mucoide a acastanhada em pequena quantidade nas paredes vaginais (LÉVY, 2016).

A concentração sérica de progesterona, no início aumenta de 15–80 ng/mL e reduz lentamente para abaixo de 1ng/mL no final da fase (CONCANNON, 2011). A concentração de estrógeno se mantém baixa durante todo o diestro, com exceção das fêmeas prenhes em que há um pequeno aumento previamente ao parto (ALVES; COVIZZI, 2015).

Pelo exame ultrassonográfico os ovários podem se apresentar lobulares e os corpos lúteos como estruturas hipoecoicas de tamanhos variados. Já o útero se encontra na sua forma mais espessa se comparado as outras fases estrais, com desenvolvimento das glândulas endometriais pela ação da progesterona (DAVIDSON; BAKER, 2009).

Sabe-se que a regulação hormonal dos processos reprodutivos específicos das cadelas, que envolve períodos longos de ação da progesterona e

prolactina e alta sensibilidade aos estímulos estrogênicos endógenos e/ou exógenos (CONCANNON, 2011), desempenham uma função significativa na etiopatogenia de grande parte das afecções (vide o tópico 3.1.3 de Alterações Reprodutivas Comuns na Fase Estral de Diestro) que se desenvolvem nesta fase estral.

A utilização de hormônios para contracepção ou como tratamento de certos distúrbios nesta fase também pode contribuir para o desenvolvimento de alterações uterinas, ovarianas, mamárias e distúrbios sistêmicos (QUEIROGA et al., 2009; STOPA et al., 2014).

2.1.1.4 Anestro

O anestro, também conhecido como fase interestral, tem duração média de 80 a 240 e é caracterizado pela ausência de atividade reprodutiva, período em que ocorre a involução uterina e reparo endometrial (ALVES; COVIZZI, 2015; CONCANNON, 2011). O anestro é considerado fisiológico em algumas espécies, como no caso da cadela (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

Nesta fase a fêmea não apresenta sinais estrais, não está receptiva a cópula, não atrai machos, a vulva se apresenta em seu tamanho anatômico menor e sem secreção (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

A citologia vaginal do anestro revela pequena quantidade de células, principalmente células parabasais, ou pequenos grupos de células, todas não queratinizadas, raros neutrófilos e discreta quantidade de bactérias da microbiota vaginal (ALVES; COVIZZI, 2015; KUSTRITZ, 2020).

Na vaginoscopia, caso seja observado pregas da mucosa vaginal, estas estarão planas, a mucosa se encontra fina, com coloração rósea e aparência seca (ALVES; COVIZZI, 2015; LÉVY, 2016).

Durante toda a fase de anestro, os hormônios sexuais se encontram em concentrações séricas basais. Aumento ocasional de estrógeno, sem sinais clínicos, já foram observados semanas antes do começo do proestro. Há um aumento moderado do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e pulsos secundários de LH ao longo desta fase. Já os níveis de progesterona sérica ficam abaixo de 1ng/mL (ALVES; COVIZZI, 2015; CONCANNON, 2011).

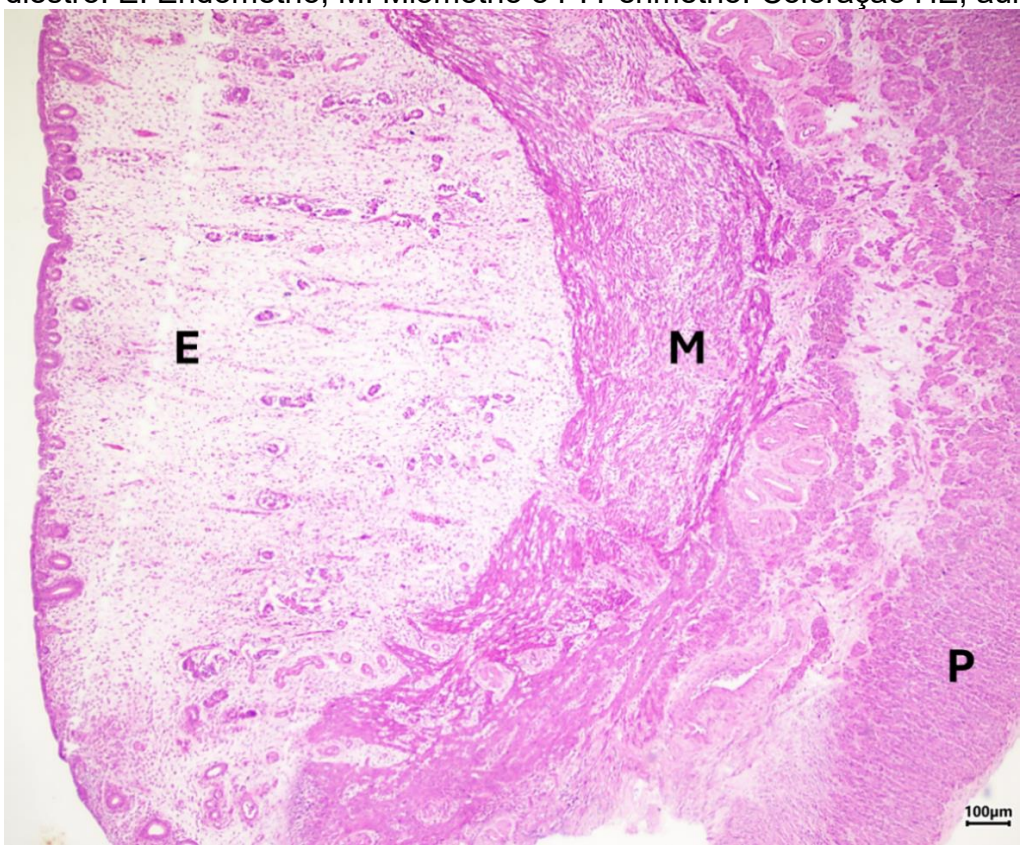
Pelo exame ultrassonográfico, nesta fase do ciclo estral os ovários apresentam-se ovalados e com ecogenicidade parecido com o córtex renal. Já o corpo

do útero aparenta-se plano, sem conteúdo líquido intraluminal e sem modificações endometriais (DAVIDSON; BAKER, 2009).

2.1.2 Histomorfologia Uterina Canina

O sistema genital feminino das cadelas é constituído basicamente por dois ovários, duas tubas uterinas segmentadas em istmo, ampola e infundíbulo, útero, cérvix – ou colo uterino, vagina e vulva. O útero é composto de um corpo uterino e dois cornos uterinos, sua parede é relativamente espessa e formada por três camadas distintas: endométrio, miométrio e perimétrio, como demonstrado na Figura 2 (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

Figura 2 – Fotomicrografia das camadas do útero na espécie canina na fase estral de diestro. E: Endométrio, M: Miométrio e P: Perimétrio. Coloração HE, aumento de 40x.



Fonte: o próprio autor.

As mudanças histológicas no útero estão associadas a ação hormonal nas distintas fases do ciclo estral. Durante o proestro, sob a influência do estrogênio, observa-se secreção vaginal hemorrágica resultante da diapedese eritrocitária pelo endométrio e da ruptura capilar sub-epitelial; vulva hipertrofiada; cérvix dilatada;

endométrio espessado; aumento da atividade das glândulas endometriais; e crescimento dos ductos e túbulos da glândula mamária (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

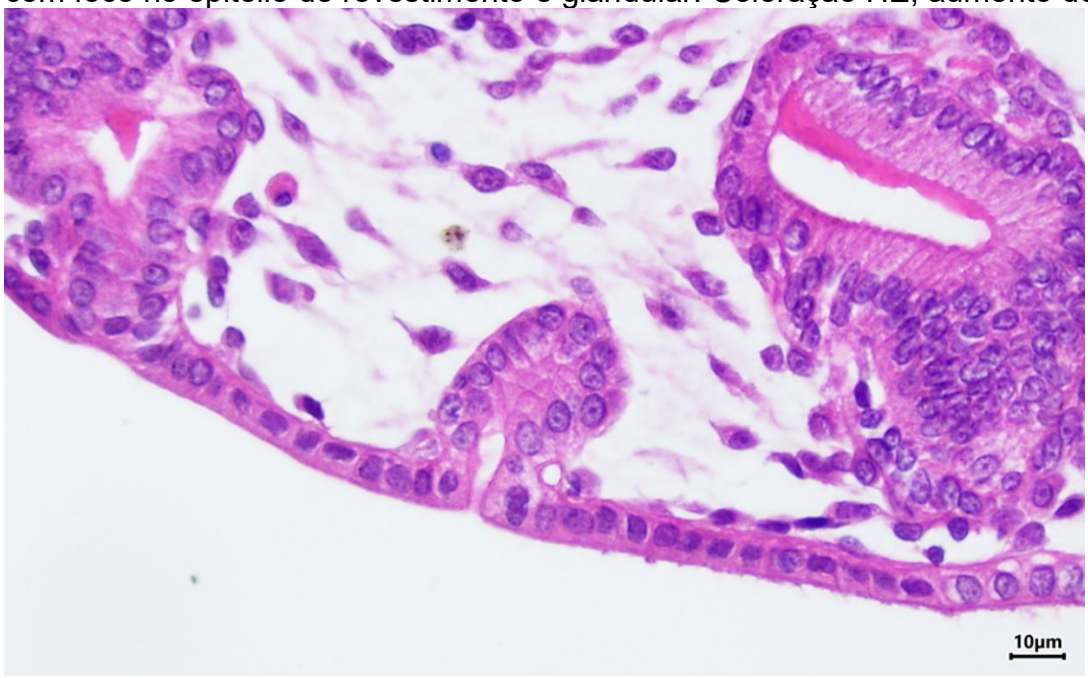
À medida que o período fértil se aproxima e o estro se inicia, a preparação do útero torna-se evidente, com proliferação das células endometriais, redução do sangramento e aumento da atividade glandular endometrial. Com o término do estro, o endométrio passa por alterações graduais e o ciclo se completa quando o útero involui por completo (ALVES; COVIZZI, 2015; GALABOVA et al., 2003; SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

2.1.2.1 Endométrio

O endométrio reveste a cavidade do útero e pode ser dividido em duas camadas, basal e funcional, as quais não podem ser claramente delimitadas em termos morfológicos. A camada basal, localizada profundamente e adjacente ao miométrio, é composta por tecido conjuntivo e pela porção inicial das glândulas uterinas. Já a camada funcional é composta pelo resto de tecido conjuntivo da lâmina própria, a porção final e desembocadura das glândulas, bem como o epitélio de revestimento. A camada funcional passa por mudanças significativas durante a fase cíclica do animal, enquanto a camada basal permanece praticamente inalterada (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

Tal camada é revestida por um epitélio luminal e uma lâmina própria, com grande quantidade de glândulas endometriais, tubulares simples, que eventualmente se ramificam até próximo ao miométrio. O epitélio de revestimento do endométrio é formado por células ciliadas e secretoras, simples e colunar, como demonstrado na Figura 3. Já o epitélio glandular, apesar de semelhante ao de revestimento, as células ciliadas são raras (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

Figura 3 – Fotomicrografia do endométrio na espécie canina na fase estral de diestro, com foco no epitélio de revestimento e glandular. Coloração HE, aumento de 400x.



Fonte: o próprio autor.

As glândulas endometriais sofrem influência dos hormônios esteroides advindos dos ovários, ao passo que o estrógeno promove a proliferação glandular e a progesterona induz a secreção glandular. Além disso, é na camada endometrial que ocorre a implantação embrionária, criando a base uterina da placenta por meio de mudanças funcionais e estruturais do tecido também mediante a influência endócrina do ovário (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

2.1.2.2 Miométrio

O miométrio é a camada uterina mais espessa, formado por quatro feixes de fibras musculares lisas não tão delimitadas e separadas pelo tecido conjuntivo. As fibras da primeira e quarta camadas se encontram ajustadas longitudinalmente e paralelas ao eixo longo uterino. Os vasos sanguíneos mais calibrosos se encontram entremeados as camadas centrais (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

É constituído por duas camadas de músculo liso e assim como o endométrio, responde a estímulos hormonais. Sob ação estrogênica, por exemplo, aumenta sua contratilidade, enquanto sob ação da progesterona reduz a contratilidade (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

No período gestacional o miométrio com hipertrofia de suas células se torna hiperplásico. Certas células musculares lisas desenvolvem a capacidade de secretar proteínas e sintetizar colágeno. Depois do parto ocorre involução uterina por meio da degeneração de determinadas células musculares lisas, diminuição no tamanho de algumas e degradação enzimática de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

2.1.2.3 Perimétrio

O perimétrio representa a camada mais externa do útero, é constituído por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e fibras nervosas. Externamente, é revestido por mesotélio peritonial e a depender da região uterina há uma camada adventícia, constituída de tecido conjuntivo sem revestimento mesotelial. Histologicamente, a camada circular interna é formada por fibras musculares lisas e fibras colágenas, enquanto a externa por fibras musculares lisas longitudinais, fibras colágenas e tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018; SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

2.1.3 Alterações Reprodutivas Comuns na Fase Estral de Diestro

Alterações reprodutivas em cadelas são multifatoriais, abrangendo desde alterações de caráter genético, como os distúrbios do desenvolvimento sexual, até influências decorrentes de aspectos nutricionais e do estado sanitário. Além disso, há afecções associadas a infecções bacterianas e influências hormonais (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

Os índices mitóticos no estroma endometrial, nos vasos sanguíneos e no epitélio de revestimento atingem seu ponto máximo pela interferência estrogênica no proestro e diminui em seguida. Enquanto isso o epitélio glandular basal atinge seu ápice no estro e diestro por atuação inicial da progesterona. Sabe-se que afecções no útero e mamas são mais frequentes na espécie canina, provavelmente em decorrência da sensibilidade natural à progesterona na fase estral de diestro e ao uso deste hormônio exógeno para evitar gestações indesejadas (CONCANNON, 2011).

O caráter subclínico de certas doenças torna desafiante a detecção precoce, pois podem evoluir de maneiras diversas. Algumas enfermidades podem

resultar apenas na redução da fertilidade da cadela, passando despercebido pelo tutor e até mesmo por profissionais veterinários. No entanto, em situações mais graves, os sintomas podem intensificar-se, agravando o quadro do animal e, em casos extremos, levando ao óbito, como observado em situações de piometra (SANTOS; NASCIMENTO; EDWARDS, 2016).

As complicações uterinas e ovarianas em cadelas em decorrência da administração de hormônios são amplamente conhecidas. No entanto, uma causa frequentemente subestimada para várias condições reprodutivas, pode ocorrer em consequência da ingestão de micotoxinas, com destaque para a micotoxina ZEA, por meio da alimentação (GAJĘCKA et al., 2008).

2.1.3.1 Complexo hiperplasia endometrial cística e piometra

A hiperplasia endometrial cística (HEC) é caracterizada pelo aumento da espessura do endométrio com presença de estruturas anecoicas focais notadas na parede do útero correspondente as glândulas císticas dilatadas e tortuosas (DAVIDSON; BAKER, 2009).

Tanto a progesterona endógena, proveniente do corpo lúteo, quanto a progesterona exógena, tem a capacidade de induzir o desenvolvimento de hiperplasia endometrial grave, podendo evoluir para a HEC. Esta condição é passível de contaminação com bactérias oportunistas, resultando na manifestação clínica conhecida como piometra (CONCANNON, 2011).

A piometra acontece durante ou logo após o diestro e é mais frequente em cadelas e gatas nulíparas, idosas e/ou que passaram por tratamento com progestágenos exógenos. A piometra pode ser de cérvix aberta ou fechada, sendo que na primeira é observado secreção vaginal e são capazes de apresentar ou não sinais clínicos de doença sistêmica como anorexia, poliúria e polidipsia. O corrimento vaginal é purulento e fétido, com grande quantidade de neutrófilos degenerados. As fêmeas com essa condição clínica terão, na maioria dos casos, leucocitose com presença e/ou aumento de neutrófilos imaturos. O diagnóstico é realizado por meio de ultrassom abdominal, onde é observado aumento do útero com acúmulo de líquido intrauterino (KUSTRITZ, 2020).

Cadelas diagnosticadas com piometra necessitam de cuidados intensivos e imediatos devido a possibilidade de sepse e consequentemente, risco de

vida se não tratada com urgência. Reconhecer de forma precoce e aplicar o tratamento adequado são determinantes para um prognóstico favorável na cadela acometida (HAGMAN, 2017).

A piometra é desencadeada por influências hormonais, visto que o útero é estimulado por hormônios, torna-se susceptível à infecção por bactérias oportunistas durante a fase de diestro. O elevado nível de progesterona nesta fase do ciclo estral é o fator principal para o desenvolvimento da afecção (HAGMAN, 2017).

O acúmulo de líquido intrauterino pode representar hidrometra, mucometra, hemometra ou piometra, sendo complexa a diferenciação dessas afecções, porém, a ecogenicidade do conteúdo no lúmen pode sugerir celularidade e colaborar para o diagnóstico diferencial em conjunto com os sinais clínicos e exames hematológicos (DAVIDSON; BAKER, 2009). Desta forma, o desenvolvimento de novos métodos para diferenciar a piometra de outras afecções no útero se faz necessário, principalmente as doenças não relacionadas a infecção bacteriana, para restringir o uso indiscriminado de antibióticos (HAGMAN, 2017).

Um dos diagnósticos diferenciais desta afecção é a vaginite, que pode ser descartada com o auxílio do exame de vaginoscopia, em que será possível a visualização da origem da secreção purulenta. No caso da piometra a secreção se projetará da abertura da cérvix para a vagina e a mucosa vaginal estará sem sinais de inflamação (LÉVY, 2016).

A ocorrência de piometra é rara em países em que a realização da esterilização cirúrgica ocorre de forma rotineira. Embora a ovariohisterectomia permaneça como o tratamento de escolha, considerado mais seguro e eficaz, novos protocolos para tratamento médico foram testados e apresentaram-se como alternativas promissoras (HAGMAN, 2017).

2.1.3.2 Pseudociese

Pseudociese, também conhecida como pseudogestação, gestação psicológica, falsa gestação ou lactação nervosa é uma síndrome que envolve sinais clínicos como se a cadela estivesse no pré, peri e pós-parto. Ocorre de seis a 14 semanas após a fase de estro e está intimamente relacionada as concentrações e a sensibilidade de cada cadela à progesterona e prolactina (APPARÍCIO; ALVES; VICENTE, 2015).

Dentre os sinais clínicos mais comuns, a cadela tende a ficar mais inquieta, busca por locais mais quietos, podem fazer ninhos com cobertas, adotar objetos e defendê-los como se fossem seus filhotes, além de apresentarem hiperplasia mamária com galactorreia. Tais sinais podem cessar de duas a quatro semanas, ter duração equivalente à de uma gestação normal ou mesmo ultrapassar esse tempo (APPARÍCIO; ALVES; VICENTE, 2015; KOWALEWSKI, 2018).

Fisiologicamente, a exposição contínua ao estrógeno e a progesterona em cada ciclo estral implica no aumento das mamas que pode ser perceptível pela palpação. A condição clínica de pseudociese manifesta abrange uma resposta mamária exacerbada, por vezes galactorreia e pode estar acompanhada de mudanças comportamentais que se assemelham a de uma fêmea no terço final de gestação (CONCANNON, 2011).

A realização de ovariectomia ou ovariohisterectomia durante o diestro pode levar a ocorrência de pseudociese manifesta (CONCANNON, 2011), observada de três a quatro dias após a remoção das gônadas dessa cadela na fase lútea (APPARÍCIO; ALVES; VICENTE, 2015).

Nas cadelas gestantes há um processo imune agudo de luteólise previamente ao parto, conduzido pela prostaglandina F2α, já nas cadelas com pseudociese, a regressão do corpo lúteo é prolongada e parece ser um processo degenerativo passivo no desenvolvimento do corpo *albicans* sem envolvimento imune agudo. Aparentemente é modulado por diversos fatores metabólicos, parácrinos e possivelmente autócrinos, porém ao que tudo indica, destituído de princípio luteolítico ativo, indicado pela ausência de apoptose (KOWALEWSKI, 2018).

A remoção da progesterona com a utilização de anti-progestágenos promove a luteólise, e consequentemente a resolução mais rápida desta condição considerada autolimitante. Tal fato pode estar relacionado a uma indução do sistema imune com uma resposta mais fraca que a luteólise natural, supressão da proliferação celular e da atividade do corpo lúteo (APPARÍCIO; ALVES; VICENTE, 2015; KOWALEWSKI, 2018).

O tutor deve ser informado sobre a possibilidade de recorrência nas próximas fases lúteas, devendo-se sugerir a ovariohisterectomia assim que houver a resolução do quadro. A utilização de cone protetor ou roupa cirúrgica enquanto a cadela estiver com essa síndrome é importante para evitar lambedura e aumento do estímulo da secreção láctea (APPARÍCIO; ALVES; VICENTE, 2015).

2.1.3.3 Metrite puerperal

A metrite se desenvolve no pós-parto mais frequentemente em cadelas do que gatas. Na maioria das vezes há histórico de distocia ou retenção fetal ou placentária. A fêmea apresenta corrimento vulvar purulento e fétido. A citologia consiste na presença de células epiteliais vaginais características de diestro e uma secreção inflamatória com neutrófilos degenerados (KUSTRITZ, 2020).

Essa condição pode ser mais claramente distinguida do aumento uterino fisiológico no pós-parto pela ausência de uma redução progressiva do conteúdo intrauterino e na espessura dos cornos uterinos (DAVIDSON; BAKER, 2009).

Os sinais clínicos e alterações laboratoriais são semelhantes às de uma cadela com piometra. A metrite aguda é identificada pelas características proeminentes de secreção vaginal anormal, com aspecto purulento ou piosanguinolento, juntamente com sinais sistêmicos evidentes no pós-parto. Por outro lado, a fase crônica é subclínica e geralmente associada a quadros de infertilidade. Em ambos os casos, a opção preferencial de tratamento é a cirurgia de ovariohisterectomia (APPARÍCIO; ALVES; VICENTE, 2015).

Caso seja uma cadela com fins reprodutivos e o tutor opte pelo tratamento médico da metrite, com a utilização de prostaglandinas, inibidores de progesterona e antiprolactina, deve-se monitorar a evolução do quadro por meio de avaliações ultrassonográficas seriadas do conteúdo intrauterino e espessura dos cornos, em conjunto com os exames hematológicos e parâmetros clínicos (DAVIDSON; BAKER, 2009).

2.1.3.4 Neoplasias

As neoplasias uterinas ocorrem com baixa frequência em cadelas. Normalmente são assintomáticas e diagnosticadas durante o procedimento de ovariohisterectomia eletiva, celiotomia exploratória ou no exame *post mortem*. Alguns autores especulam sobre o fato da administração exógena de estrógeno e progesterona predispor o surgimento de certos tumores (MACENTE; GUTIERREZ; MOTHEO, 2015).

Os tumores mamários são os mais frequentes nas cadelas e sua

incidência aumenta com utilização de progestágenos exógenos comumente utilizados como contraceptivos. A razão para isso reside no fato de que o desenvolvimento desses tumores serem dependentes de hormônios (FERNANDES; DE NARDI, 2015). Um estudo indicou que as neoplasias malignas apresentam concentrações mais elevadas de progesterona e de fator de crescimento epidérmico nos tecidos, sugerindo um possível mecanismo que sensibiliza as células neoplásicas aos efeitos proliferativos e angiogênicos do fator de crescimento epidérmico (QUEIROGA et al., 2009).

2.1.3.5 Distúrbios reprodutivos multifatoriais

A exposição crônica a micotoxinas, em especial a micotoxina ZEA por meio de dieta contaminada pode levar a desregulação dos hormônios reprodutivos e consequentemente distúrbios ovarianos e uterinos (GAJĘCKA; ZIELONKA; GAJĘCKI, 2015; STOPA et al., 2014).

Os efeitos estrogênicos da ZEA em diferentes espécies animais e humana incluem infertilidade ou fertilidade reduzida, abortos, retenção placentária, redução no tamanho de ninhadas, natimortos, cistos ovarianos, aumento uterino, pseudociese, hiperplasia/prolapso vaginal, vaginite, edema de vulva e hiperplasia mamária (ROPEJKO; TWARUŻEK, 2021).

2.2 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de fungos filamentosos, de baixo peso molecular, formadas a partir de diversas espécies de fungos micotoxigênicos. A exposição às micotoxinas se dá por meio da ingestão de alimentos contaminados, inalação ou contato direto (JANIK et al., 2020).

Cerca de 400 micotoxinas com potencial toxigênico são produzidas por mais de 100 tipos de fungos, aquelas produzidas por fungos micotoxigênicos recebem maior atenção devido ao seu potencial carcinogênico. Em animais, o consumo de cereais contaminados afeta principalmente órgãos como o fígado, o pulmão e os rins, podendo resultar em lesões cutâneas e até câncer em humanos, representando riscos significativos para ambas as espécies (DEEPA; SREENIVASA, 2019).

Em virtude às chuvas constantes, práticas agrícolas inadequadas e condições desfavoráveis na fase de cultivo, colheita ou armazenamento, os fungos se tornaram um problema inevitável para a agricultura mundial, pecuária, economia e saúde global, levando a prejuízos no rendimento e qualidade das culturas. Inúmeros fungos contaminam os cereais, tornando-os impróprios para consumo e podendo causar toxicidade aguda ou crônica (ALSHANNAQ; YU, 2017a; DEEPA; SREENIVASA, 2019).

Os cereais são cultivados em abundância mundialmente já que fornecem energia e proteína para humanos e animais. Cereais como arroz, milho e trigo são consumidos diariamente, sejam eles puros ou processados, como na fabricação de pães, biscoitos e bebidas (DEEPA; SREENIVASA, 2019). Adicionalmente, ao consumirem alimentos contaminados com micotoxinas, os animais podem acumular essas substâncias em seus tecidos, resultando na contaminação dos produtos de origem animal, como ovos, leite ou carne (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Atualmente, a utilização de rações comerciais como base alimentar para cães e gatos se torna uma prática comum em todo o mundo. Esta escolha é motivada pela facilidade, economia e, ao mesmo tempo atender as necessidades nutricionais desses animais ao longo de suas vidas. Por esta razão e pela preocupação dos tutores com a segurança alimentar dos *pets*, a contaminação por micotoxinas se configura como um problema já conhecido (GRANDI et al., 2019).

No estudo conduzido por Macías-Montes et al (2020), foi realizada a quantificação de diversas micotoxinas encontradas em rações de cães e gatos comercializadas na Europa. Em todas as marcas analisadas, independentemente do valor comercializado, foram encontradas diferentes proporções de micotoxinas. Porém, praticamente todas em doses relativamente baixas. Diante deste cenário, os autores recomendaram a realização de novas pesquisas para investigar os potenciais efeitos adversos à saúde dos animais de estimação associados a exposição crônica de baixas doses de micotoxinas combinadas.

A administração prolongada de alimentos contendo ZEA tem o potencial de interferir na regulação hormonal dos processos reprodutivos e induzir alterações histológicas no tecido uterino (STOPA et al., 2014).

Dependendo da dose e da duração da exposição, as micotoxinas causam danos à saúde humana e animal podendo inclusive resultar em óbito. Entre os efeitos mais comuns estão a nefrotoxicidade, a hepatotoxicidade,

imunossupressão, carcinogenicidade e teratogenicidade (JANIK et al., 2020).

Dentre os principais representantes das micotoxinas causadoras de problemas para a saúde global, têm-se aflatoxinas, ocratoxina A, toxina T-2, desoxinivalenol, patulina e ZEA (JANIK et al., 2020). A presença de Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), Ocratoxina A, T-2 e HT-2, Desoxinivalenol, ZEA e Fumonisinas (B1 e B2) foi detectada com frequência em um estudo realizado nas rações para cães e gatos comercializadas na Europa (MACÍAS-MONTES et al., 2020).

No estudo conduzido por Grandi et al (2019), foi observada uma ocorrência frequente de micotoxinas em amostras de rações destinadas a cães e gatos, destacando-se a combinação de ZEA, desoxinivalenol e fumonisinas. Neste contexto, a presença conjunta dessas micotoxinas é frequentemente atribuída a capacidade de várias estirpes de *Fusarium*, encontrados nos cereais, de produzirem tanto ZEA quanto tricotecenos, como o desoxinivalenol (GRANDI et al., 2019).

Um estudo conduzido com ratos verificou o potencial de um ligante de micotoxinas em interromper certos efeitos reprodutivos da ZEA. Foram necessários mais de 2 mg/camundongo/dia de ligantes para que se mantivesse a quantidade considerada normal de folículos primários, secundários, terciários, folículos de Graaf e o número de corpos lúteos no ovário das fêmeas de camundongos desafiadas com a micotoxina. Contudo, os autores sugeriram o desenvolvimento de mais pesquisas sobre o potencial dos ligantes de micotoxinas na fisiologia e patologia ovariana, placentária, quanto ao número de fetos e concentrações hormonais (SAMIK; SAFITRI, 2017).

Apesar de uma variedade de estudos que exploram estratégias envolvendo métodos químicos, físicos e biológicos para reduzir a proliferação de fungos micotoxigênicos e a produção de micotoxinas na pré e pós-colheita, a erradicação de alimentos e rações contaminados ainda não foi solucionada de forma satisfatória. Métodos de biocontrole e o gerenciamento podem ajudar na preservação dos cereais armazenados com redução das perdas de qualidade e quantidade (DEEPA; SREENIVASA, 2019).

Referências quanto a toxicidade, seja aguda ou crônica, para animais de estimação são escassas (MACÍAS-MONTES et al., 2020). Para proteção da saúde humana e animal, é necessário um empenho constante na prevenção da proliferação fúngica a campo e descontaminação de alimentos (JANIK et al., 2020).

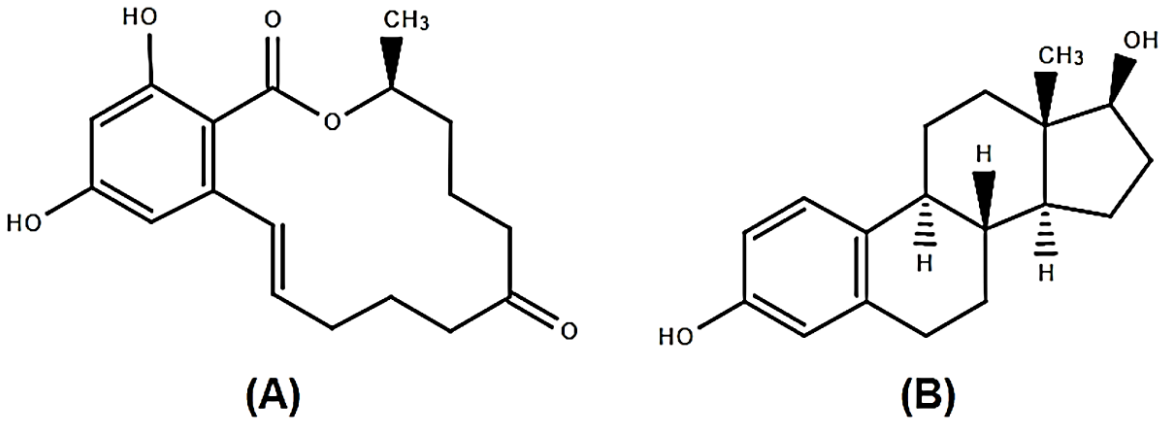
2.2.1 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica não esteroidal, produzida por espécies de fungos do gênero *Fusarium* spp. como: *F. graminearum, F. cerealis, F. culmorum* e *F. equiseti*. Dentre as fontes de contaminação da ZEA têm-se cereais como milho, cevada, aveia, sorgo e trigo, e especiarias como leite e cerveja, presentes na maioria das rações animais e alimentação humana ao redor do mundo (DEEPA; SREENIVASA, 2019; JANIK et al., 2020; KNUTSEN et al., 2017).

Essa toxina pode ser sintetizada durante o processamento de alimentos, durante o cultivo, colheita e/ou armazenamento. Quimicamente (Figura 4A), é um macrólideo, compreendendo uma lactona de 14 membros, fundida para 1,3-dihidroxibenzeno, tal estrutura apresenta similaridade com o estrogênio endógeno 17β-estradiol (E2) - Figura 4B (JANIK et al., 2020).

Devido ao fato de ZEA ter atividade semelhante ao estrogênio e ser capaz de se ligar competitivamente aos receptores relacionados, como consequência, essa micotoxina causa efeitos estrogênicos e induz distúrbios reprodutivos em humanos e animais (ALSHANNAQ; YU, 2017; JANIK et al., 2020).

Figura 4 – Fórmula estrutural da Zearalenona (A) e do 17β-Estradiol (B)



Fonte: BULGARU et al., (2021).

A ZEA é resistente à luz ultravioleta e tem alta estabilidade a altas temperaturas, porém, sua produção é acelerada em condições de baixas temperaturas e com alta umidade (ALSHANNAQ; YU, 2017).

O metabólito α-Zearalenol (α-Zol) é caracterizado por uma alta afinidade pelos receptores de estrogênio e é mais tóxico que o β-Zearalenol (β-Zol).

A forma β tem afinidade muito menor pelos receptores de estrogênio e, portanto, é praticamente inofensivo (JANIK et al., 2020).

ZEA e os seus metabólitos são eliminados lentamente dos tecidos pela circulação entero-hepática. A transferência para o leite é baixa de forma que a exposição do homem aos produtos de origem animal é menor se comparado a exposição direta pelos grãos contaminados (ROPEJKO; TWARUŻEK, 2021).

Os suínos são considerados os animais mais suscetíveis dentre todos os animais domésticos. No entanto, os cães também são considerados uma espécie sensível a esses efeitos. Após uma solicitação da Comissão Europeia, o painel da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), responsável pela avaliação de contaminantes na cadeia alimentar (CONTAM) analisou o potencial de risco à saúde animal decorrente da presença de ZEA em alimentos destinados aos animais. Com base em estudos experimentais na espécie canina, o painel CONTAM estabeleceu um LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level* / nível mais baixo de efeito adverso observado) de 25 µg/kg de peso corporal (cadelas adultas), uma dose que produziria lesões no miométrio e no endométrio (KNUTSEN et al., 2017).

A Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) periodicamente cria manuais que são considerados referência para as indústrias brasileiras que produzem *pet food*. Na versão mais recente do Manual Pet Food Brasil, os limites máximos tolerados de ZEA se mantiveram iguais aos da versão anterior de 2019. Seguindo a recomendação da União Europeia de nº 2013/165, tal manual estabeleceu o limite máximo de ZEA de 200ppb para animais de estimação adultos, o que é o equivalente a 0,2mg/kg (0,68 µM) e 100ppb para filhotes, 0,1 mg/kg (0,34 µM) (ABINPET, 2019, ABINPET, 2024).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classificou a micotoxina ZEA como uma substância do Grupo 3 - não cancerígena para humanos (ROPEJKO; TWARUŻEK, 2021). Entretanto, ZEA é um desregulador endócrino reconhecido e que recentemente apontou para a possibilidade de poder atuar em doses baixas como promotor do câncer de mama e de outras neoplasias hormônio-dependentes por si só ou em combinação com outros desreguladores endócrinos (KOWALEWSKI, 2018).

Alguns autores sugerem que o consumo de alimentos contendo milho, pode estar associado a um aumento na incidência de puberdade precoce em crianças, pois um estudo demonstrou elevados níveis de ZEA no sangue de crianças

acometidas. Considerando que o milho e seus derivados têm uma maior probabilidade de contaminação por ZEA, esta substância pode ser uma das causas potenciais da puberdade precoce (MASSART et al., 2008). Além disso, a presença de ZEA já foi detectada no endométrio de mulheres com distúrbios reprodutivos, indicando uma possível relação com efeitos estrogênicos (RAI; DAS; TRIPATHI, 2020).

Outros efeitos a longo prazo, como a ruptura de eritrócitos devido ao estresse oxidativo ou alterações reprodutivas, também têm sido relacionados à exposição a baixas doses de ZEA (GAJĘCKA; ZIELONKA; GAJĘCKI, 2015; KNUTSEN et al., 2017).

Nos mamíferos, a ZEA pode ocasionar a morte de oócitos nos folículos e inibir a ovulação. Além disso, ela impede a secreção de hormônios esteroides, perturbando a resposta estrogênica no período pré-ovulatório, e reprime a maturação dos folículos ovarianos. A ZEA também induz alterações na metilação do DNA e na expressão de genes associados a receptores nucleares e vias metabólicas, como IGF1, HK2, PXR e PPARγ, em linhas celulares de câncer mamário (JANIK et al., 2020).

O estudo de Gajecka et al. (2012), em que foi administrado doses baixas de ZEA para marrãs durante 48 dias, sugere que os efeitos da ZEA no útero podem ser prejudiciais à saúde quando o nível de estrogênios endógenos é baixo, porém há uma dose extra dos exógenos, resultantes de interações sinérgicas que levam à estimulação estrogênica exorbitante.

Doses baixas de ZEA administradas a marrãs induziram hiperestrogenismo experimental e estimularam a proliferação de tecidos da parede uterina, com elevações nos valores do índice de proliferação. A hiperemia uterina e inchaço do útero foi observado, além de hiperplasia atípica que pode ser interpretada como uma resposta fisiológica do útero a um alto nível de estímulos estrogênicos endógenos e/ou exógenos (GAJECKA et al., 2012). Portanto, já está claro de que ZEA provoca mudanças substanciais no sistema reprodutivo de animais produção, de laboratório e domésticos, resultando em infertilidade, aumento vulvar e uterino, reabsorções embrionárias e atrofia dos ovários (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Na espécie canina, grande parte das informações advém de pesquisas de Gajecka e colaboradores (GAJĘCKA et al., 2013; STOPA et al., 2014), que avaliaram os efeitos da exposição crônica de ZEA nos alimentos fornecidos a cadelas, por meio de parâmetros reprodutivos. ZEA foi fornecida diariamente na dose

de 25 ou 50 µg/kg de peso corporal por 100 dias, o que equivale a 1,7 ou 3,5 mg de ZEA/kg de alimento, assumindo o peso de 25 kg/cadela e 360 g de ração. Cada grupo foi composto por três cadelas sem raça definida, de 1 a 3 anos de idade, em fase de anestro, que foram submetidas à ovariohisterectomia ao final do experimento. Amostras de úteros foram obtidos de todos os grupos tratados e lesões degenerativas do miométrio e endométrio, incluindo aumento e atrofia das glândulas endometriais com edema e extravasamento foram observadas (GAJĘCKA et al., 2013; KNUTSEN et al., 2017; STOPA et al., 2014).

Outra pesquisa também com a dose de 25 ou 50 µg/kg de peso corpóreo administrada por 100 dias foi realizado com cadelas adultas na fase estral de anestro. Semanalmente foram analisados os níveis de ZEA, progesterona e 17β-estradiol. Níveis de ZEA foram observados após meia hora da ingestão e durante todo o experimento, sendo que os níveis mais altos foram observados dentro da sexta e nona semana, o que coincidiu com a ocorrência de distúrbios hormonais com alterações nos níveis séricos de estrógeno e progesterona a depender da dose administrada. Um fato interessante foi de que a menor dose modificou os níveis hormonais de maneira que os valores foram similares aos de cadelas com hiperplasia endometrial cística. Enquanto em doses mais altas levou a alterações hormonais normalmente constatadas na piometra espontânea (GAJĘCKA et al., 2008).

A absorção rápida da micotoxina ZEA ocorre após a ingestão, sendo inicialmente metabolizada pelo trato gastrointestinal e pelos hepatócitos (ROGOWSKA et al., 2019). Níveis sanguíneos mensuráveis desta micotoxina já foram detectados em caninos expostos por via oral, com evidências de uma maior produção do metabólico α-Zol do que de β-Zol, amostras de sangue colhidas semanalmente revelaram até 100% de prevalência do metabólico α-Zol (GAJĘCKA et al., 2013; KNUTSEN et al., 2017).

O Painel CONTAM estabeleceu que uma dose de 25µg/kg de ZEA produziria lesões no miométrio e no endométrio de cadelas adultas (KNUTSEN et al., 2017). Considerando essa dose para cães e a concentração de ZEA nas rações mais contaminadas, os cálculos indicam que risco de intoxicação aguda seria muito baixo para os animais de estimação, entretanto, os riscos associados à exposição a longo prazo não pareceram tão baixos (MACÍAS-MONTES et al., 2020).

Em um estudo com análises de rações comercializadas para animais de companhia na Polônia foi constado limites aceitáveis de micotoxinas nas amostras

testadas de acordo com os regulamentos da União Europeia (WITASZAK et al., 2019). Entretanto, em outro estudo, um número relativamente elevado de rações para cães e gatos excederam os limites regulamentares europeus estabelecidos para certas micotoxinas, apenas cinco rações apresentaram baixa contaminação e foram aquelas avaliadas sem grãos, em que continha somente amido de leguminosas e batatas (GRANDI et al., 2019).

Para cães e gatos, a exposição média de ZEA variou de 0,22 de limite médio inferior mais baixo a 0,33 lg/kg de limite médio superior mais alto de peso corporal diário, enquanto no percentil 95 a variação foi de 0,75 a 0,80 lg/kg de peso corpóreo por dia (KNUTSEN et al., 2017).

Estudos e informações relativas a toxicocinética da ZEA na espécie canina são escassas. Em um experimento, 30 cadelas pré-puberes da raça Beagle foram subdivididas em três grupos com 10 animais, sendo que um grupo recebeu por via oral a dose diária de 0,5 µg de ZEA/kg de peso corporal por 42 dias, outro 0,75µg/kg e o grupo controle recebeu placebo. Ao final do tratamento foi realizado o procedimento de ovariohisterectomia e amostras de útero foram analisadas por meio da histologia e morfometria. Como resultado, foi observado hiperplasia glandular simples do endométrio em conjunto com adenogênese, angiogênese e vasodilatação como consequências relacionadas, sendo mais evidentes no grupo que recebeu doses baixas. Os autores relatam que tal fato pode ser um indício de uma resposta à dose hormonal (STOPA et al., 2014).

Gajęcka e colaboradores (2013) sugerem que doses baixas de ZEA (próximas do NOAEL) em rações para a espécie canina não causam sinais clínicos de intoxicação, entretanto podem elevar a proliferação de células somáticas em uma taxa inversamente proporcional à dose de ZEA. Além disso, baixas doses podem contribuir para alterações nas concentrações hormonais fisiológicas de estrógeno e progesterona ao longo da puberdade, levando a falsos sinais de cio, falsa maturação sexual e alterações histológicas em tecidos estrógeno-dependentes, atrasando ou impedindo a reprodução de cadelas pré-púberes e sexualmente maduras (GAJĘCKA et al., 2013).

É fundamental que haja um avanço nas investigações a respeito dos potenciais efeitos adversos para a saúde decorrentes da exposição crônica a baixas doses da combinação de micotoxinas nos animais e no homem. Deve-se levar em consideração que grande parte dos animais de estimação consomem uma monodieta

comercial, que normalmente é de uma mesma marca durante anos, devendo-se estabelecer critérios precisos para um bom controle de qualidade durante os processos de produção. Há escassez de dados sobre o risco da ingestão das micotoxinas nas dietas comercializadas para os *pets* (KNUTSEN et al., 2017).

2.3 MODELO EXPERIMENTAL *EX VIVO*

Os animais são utilizados como alimentação, transporte, esportes, recreação, companhia e estimação desde a antiguidade, e com o passar do tempo também foram empregados na experimentação científica. Entretando, questões éticas relacionadas ao direito animal, custos envolvidos na criação, alojamento, longos protocolos de manejo animal durante as experimentações e pressão da sociedade com relação as práticas envolvendo os animais, fizeram com que alternativas e diretrizes surgissem a fim de possibilitar a execução de pesquisas ao mesmo tempo que minimizasse os problemas supracitados (DOKE; DHAWALE, 2015).

Alguns autores afirmam que os estudos com animais *in vivo* ainda existem devido à dificuldade no desenvolvimento de alternativas eficientes que substituam por completo a utilização dos animais em experimentação, em razão às complexas interações existentes a nível orgânico, celular e subcelular. Pesquisas de toxicidade *in vitro* fornecem informações extremamente válidas, entretanto, a complexidade dos organismos vivos ainda demanda estudos em animais vivos a fim de extrapolar os resultados a espécie humana com maior confiabilidade (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015).

Todavia, nos últimos anos, houve intensos debates sobre o uso de animais em pesquisas e ensino. Embora seja uma prática antiga, essa questão ainda causa desconforto e gera discussões entre estudantes, professores e a sociedade. As preocupações vão além da ética, uma vez que muitos questionam a eficácia dessa metodologia de ensino diante dos avanços tecnológicos e científicos atuais (SOUSA NETO et al., 2020; TEIXEIRA; DUTRA, 2020)

Atualmente, ainda não existe um método que substitua por completo a utilização de animais em pesquisa, porém a ciência está em constante evolução, e o uso de animais em experimentos está sendo substituído por alternativas como programas de computador, *softwares*, manequins que imitam parâmetros fisiológicos e experimentos *in vitro*. Essa mudança está ocorrendo tanto no âmbito legal quanto

metodológico, indicando uma transformação na utilização de animais como modelos experimentais (SOUSA NETO et al., 2020; TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

O método de cultivo de explantes, também denominado como método *ex vivo* permite que procedimentos experimentais controlados pelo pesquisador sejam realizados em um menor espaço de tempo, e com um número reduzido de animais sem reduzir as repetições experimentais. Tal alternativa se baseia no cultivo de fragmentos teciduais, mantidos fora do corpo do animal durante vários dias a depender do tipo tecidual. O tecido é obtido por *punch* ou bisturi e posteriormente cultivados em placas com meio de crescimento adequado, à temperatura semelhante a corporal se assemelhando as condições *in vivo* (BASSO; BRACARENSE, 2013; DOKE; DHAWALE, 2015).

Cabe ressaltar que o cultivo de células e tecidos pode ser amplamente utilizada para a pesquisa básica aplicada, como por exemplo a viabilidade da ação de um fármaco quimioterápico no tocante as células cancerígenas. Porém, frequentemente, mesmo com a utilização das células ou tecido para o teste base, as vezes é preciso investigar o comportamento de certas moléculas no organismo vivo, visto que o funcionamento do próprio indivíduo pode interferir no resultado. Invariavelmente, o número de animais utilizados diminui quando já existe previamente um estudo *in vitro* (TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

A maior limitação do modelo *ex vivo* para o cultivo de explantes é o tempo, pois o tecido precisa se manter viável durante longos períodos, suportando a hipóxia durante todo o processo de cultivo tecidual. Diversos passos deste método estão em constante aprimoramento, a fim de estender ao máximo o tempo de cultivo tecidual de cada órgão mantendo-os com suas células viáveis. Ajustes no tipo de meio de cultivo, utilização ou não de gás carbônico (CO_2), modificações nos antibióticos e incubação sem ou sob agitação estão em constante aperfeiçoamento (BASSO; BRACARENSE, 2013).

Devido ao fato dos dados preliminares *in vitro* ainda requererem contraste com modelos *in vivo* (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015), enquanto não existe um método capaz de substituir completamente a utilização de animais em pesquisas, é obrigatório que se faça o controle e prevenção da dor e do estresse por meio de novas normas para uso de animais nos centros de pesquisa que sigam o princípio dos 3R's de substituição (*replace*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*) (DOKE; DHAWALE, 2015; TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

O “R” de *replace*, traz como objetivo a substituição de animais sencientes por invertebrados, microorganismos ou por estudos em órgãos e tecidos por meio de modelos *ex vivos* que mimetizem o que ocorre no organismo vivo; *reduction* com o intuito de diminuição do uso animais sem que afete na confiabilidade da pesquisa, com a utilização de bancos de dados, publicação de resultados não esperados e planejamento de experimentos que possam partilhar dos mesmos indivíduos; e *refinement*, com o propósito de melhorar os métodos de manejo para reduzir dor e estresse (TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

Resumindo, as investigações *in vitro* fornecem informações valiosas sobre as respostas específicas das células, enquanto os estudos *in vivo* avaliam os efeitos nos animais por completo. Nem sempre o estudo *in vitro* concordará com o *in vivo*, pois as células *in vitro* podem reagir com mais sensibilidade, visto a interação direta de substâncias com a membrana plasmática, podendo mudar sua estrutura e função (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015).

2.3.1 Método *Ex vivo* em Tecido Uterino

Luz et al (2006) realizaram uma pesquisa com explantes endometriais de cadelas a fim de compreender melhor o processo de luteólise que é considerada aguda no pré-parto e lenta em cadelas não gestantes. Tal estudo investigou a produção *in vitro* de Prostaglandina F2α (PGF2α) nos explantes de endométrio, corpo lúteo e placentas no pré-parto de oito cadelas gestantes e no final de diestro de nove cadelas não gestantes. A produção média de PGF2α pelos explantes endometriais das cadelas não prenhas foi maior no dia 65 após o pico de LH e diminuiu para níveis baixos nos dias 75 e 85. A produção foi menor nos explantes de corpo lúteo no dia 65 do que nos explantes endometriais no dia 65, e teve um discreto aumento no dia 85. A produção média de PGF2α pelos explantes endometriais foi muito maior nas cadelas gestantes do que nas não gestantes com altas concentrações no dia 64 e no pós-parto. A produção lútea também foi maior nas gestantes por volta do dia 65. Desta forma, o endométrio da cadela prenha tem uma alta aptidão de produzir PGF2α no pré-parto. Entretanto, assumindo uma massa maior de tecido placentário *in vivo* em gestações com vários fetos, os autores inferem que a placenta pode auxiliar nas concentrações periféricas de prostaglandinas (LUZ et al., 2006).

O câncer do corpo uterino em mulheres frequentemente referido como

câncer de endométrio, uma vez que mais de 90% dos casos ocorrem no endométrio, que é o revestimento interno do útero. Em 2023, foi estimado aproximadamente 66.200 casos de câncer de corpo uterino nos Estados Unidos. As taxas de mortalidade por câncer de corpo uterino aumentaram desde meados da década de 90 e de acordo com a pesquisa da American Cancer Society, cerca de 70% dos cânceres de útero são atribuíveis ao excesso de peso corporal, em parte por aumentar a quantidade de estrogênio circulante (SIEGEL et al., 2023).

Dado que o útero é o órgão mais acometido nas cadelas quando se fala de afecções reprodutivas em fase estral de diestro, são necessários mais estudos nessa espécie e especificamente no órgão uterino. Estudos com a utilização do método de cultivo *ex vivo* em tecido uterino de cadelas são escassos, portanto, pesquisas adicionais são necessárias para aprofundar o conhecimento sobre os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de afecções uterinas, bem como o uso dessa metodologia no trato reprodutivo.

2.3.2 Estresse Oxidativo e a Reprodução da Fêmea

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são agentes oxidantes altamente reativos. Em condições normais, as células possuem defesas antioxidantes que mantêm um equilíbrio adequado entre a geração de oxidantes e a presença de antioxidantes. No entanto, a superprodução de ERO ou a incapacidade de neutralização pela barreira antioxidante pode levar a um estado de estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode resultar em danos às células e tecidos, ameaçando a integridade do trato genital (RIZZO et al., 2012). As ERO, incluem os três principais tipos, o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio que resultam em alterações no DNA, peroxidação lipídica e danos às proteínas (LU et al., 2018).

Embora as ERO tenham efeitos nocivos, em concentrações controladas desempenham funções fisiológicas essenciais no organismo. Estudos confirmam a presença de ERO e enzimas antioxidantes nos diversos processos reprodutivos da fêmea (RIZZO et al., 2012).

Existem duas categorias de antioxidantes: os enzimáticos e os não enzimáticos. Os enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GSR). Já os não enzimáticos, também denominados de antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta, englobam

substâncias como a vitamina C, vitamina E, β-caroteno, caroteno, selênio, zinco, taurina, hipotaurina e glutationa (RIZZO et al., 2012). O estresse oxidativo ocorre quando a geração de ERO supera as defesas antioxidantes (LU et al., 2018).

No sistema reprodutor, quando mantidas em concentrações apropriadas, as ERO desempenham um papel crucial como mediadores importantes na sinalização hormonal, na esteroidogênese ovariana, na ovulação, na formação do corpo lúteo, na luteólise e na função das células germinativas (RIZZO et al., 2012).

As ERO não apenas desempenham funções significativas como mensageiros secundários em diversas cascatas de sinalização intracelular, mas também desempenham papéis essenciais em processos patológicos que resultam na geração excessiva de ERO (LU et al., 2018). No trato reprodutivo da fêmea, as ERO desempenham uma função dupla atuando como moléculas sinalizadoras essenciais em processos fisiológicos como o desenvolvimento folicular, ovulação, formação do corpo lúteo, luteólise, desenvolvimento inicial do embrião, manutenção da gestação e indução do parto. Contudo, sua persistência e elevada geração pode conduzir ao estresse oxidativo. Portanto, além de seu papel benéfico, as ERO também podem ser consideradas cofatores em processos patológicos (RIZZO et al., 2012).

Níveis equilibrados de ERO foram correlacionados com a atividade angiogênica no endométrio, promovendo a regeneração durante cada fase do ciclo estral. Assim sendo, quantidades controladas de ERO são essenciais para sustentar a função fisiológica, mas sua presença em concentrações elevadas pode ser prejudicial, com disfunção das células endometriais, resultando em afecções uterinas (LU et al., 2018).

Durante a fase lútea do ciclo estral a progesterona é capaz de modular a geração de ERO. Há uma correlação significativa entre a concentração de progesterona, atividades da SOD e concentrações de ERO. Um aumento nas defesas antioxidantes ovarianas ocorre com o intuito de preservar a atividade do corpo lúteo. Os efeitos luteolíticos podem ser explicados, em partes, pela redução da atividade da SOD e o aumento das ERO (RIZZO et al., 2012).

RIZZO et al (2009) determinaram as concentrações séricas de ERO durante as diferentes fases do ciclo estral das cadelas, com o intuito de estabelecer seus valores fisiológicos. As concentrações mais elevadas de ERO foram identificadas durante o estro, o que pode estar relacionado ao processo inflamatório agudo associado à ovulação, ao aumento das atividades imunológicas e metabólicas, às

alterações citológicas e à contratilidade miometrial estimulada pelos altos níveis de estrógeno. No diestro, houve redução na concentração média de ERO, sem diferença estatística em comparação com os valores médios do proestro. As concentrações elevadas de progesterona nesta fase exercem um efeito antioxidante e imunossupressor, que justifica a menor detecção média de ERO. Já no anestro, foram registradas as concentrações mais baixas de ERO devido à redução da atividade metabólica e endócrina nesta fase (RIZZO et al., 2009).

Outro estudo também com resultados similares ao de RIZZO et al (2009) confirmou que existem variações notáveis no equilíbrio do estresse oxidativo no ovário, oviduto e útero simultaneamente, durante as diferentes fases do ciclo estral nas cadelas. Deste modo, infere-se que a estrutura folicular e a fertilidade são capazes de serem afetadas por alterações no perfil oxidante e antioxidante no trato reprodutivo (BAKI ACAR et al., 2020).

A micotoxina ZEA impacta a integridade do DNA e das mitocôndrias, reduz a capacidade de proliferação celular e influencia a resposta inflamatória. Esses efeitos genotóxicos e citotóxicos podem ser atribuídos ao estresse oxidativo, uma vez que a ZEA tem o potencial de induzir a produção de ERO e peroxidação lipídica, resultando em oxidação e danos tanto no DNA quanto nas mitocôndrias. Esse processo pode desencadear apoptose e modular a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias. É relevante salientar que os efeitos tóxicos da ZEA podem ocorrer por meio de mecanismos não relacionados à sua atividade estrogênica (DA SILVA; BRACARENSE; OSWALD, 2018; MARIN et al., 2013).

Um estudo realizado com ratos expostos a uma dieta contaminada com as micotoxinas aflatoxina, desoxinivalenol e ZEA, revelou um aumento na atividade da glutationa peroxidase (GPx) e nos níveis de malondialdeído (MDA) no soro e fígado desses animais, indicando alteração no balanço redox. Além disso, a redução da atividade da catalase (CAT) no soro, fígado e rim, juntamente com a diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático e renal, reforçou a evidência da ocorrência de estresse oxidativo (HOU et al., 2013).

O estresse oxidativo, juntamente com a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio induzidas por micotoxinas, tem sido correlacionado com seus efeitos citotóxicos em DNA, síntese de proteínas e mitocôndrias. Embora esses efeitos tenham sido confirmados em diversos ensaios com membranas celulares, proteínas ou ácidos nucléicos, os mecanismos subjacentes à ativação das vias de sinalização

que resultam na morte celular ou aumento da permeabilidade para diferentes micotoxinas ainda permanecem incertos. As características moleculares das micotoxinas, além de aspectos como dose, duração da exposição e espécie animal, são alguns dos pontos que necessitam de investigação adicional (DA SILVA; BRACARENSE; OSWALD, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

A padronização de um método de cultivo uterino *ex vivo* em cadelas permitirá o desenvolvimento de projetos de pesquisas com reduzido número de animais. Embora o útero seja material descartado após as castrações eletivas, nem sempre está disponível para a realização de pesquisas. Assim, esse modelo experimental poderá ser aplicável a espécies selvagens ameaçados ou em extinção, além, da possibilidade de aplicação na espécie humana.

É sabido que, a realidade da ingestão crônica de baixas doses de micotoxinas é uma preocupação tanto em espécies animais como na espécie humana, devido à contaminação dos alimentos. Além disso, a intoxicação por micotoxinas é um dos fatores que impactam adversamente o desenvolvimento reprodutivo de determinadas espécies. Entre as micotoxinas, o metabólito α-Zol originado da Zearalenona é reconhecido como responsável por problemas nos órgãos reprodutivos. Contudo, a literatura apresenta uma escassez de estudos sobre as consequências desse metabólito em cadelas.

Como o útero é frequentemente o órgão mais afetado em cadelas na fase estral de diestro, é imprescindível conduzir pesquisas mais abrangentes nessa espécie e órgão específico. Aprofundar o conhecimento dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de afecções uterinas é essencial para uma compreensão mais completa e eficaz, visando aprimorar estratégias de prevenção e intervenção.

REFERÊNCIAS

ABINPET. **MANUAL PET FOOD BRASIL 10ed - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**, 2019.

ABINPET. **MANUAL PET FOOD BRASIL 11ed - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**, 2024.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 1–20, 2017.

ALVES, A. E.; COVIZZI, G. J. Fisiologia Reprodutiva de Cadelas. Em: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2015. v. 1, p. 17–21.

ANDRADE, J. R.; TOMA, C. D. M. Estudo retrospectivo de status reprodutivo de pequenos animais em um complexo de clínicas veterinárias no sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 7, p. 21343–21360, 2023.

APPARÍCIO, M.; ALVES, A. E.; VICENTE, W. R. R. Afecções do Sistema Genital Feminino. Em: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2015, v. 1, p. 54–74.

BAKI ACAR, D. et al. The evaluation of the oxidative stress index of reproductive tissues and serum thiol/disulphide homeostasis during estrous cycle in bitches. **Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 67, n. 1, p. 87–94, 2020.

BALTHAZAR DA SILVEIRA, C. P. et al. Estudo retrospectivo de ovariossalpingo-histerectomia em cadelas e gatas atendidas em Hospital Veterinário Escola no período de um ano**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 65, n. 2, p. 335-340, 2013.

BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Explantes teciduais: Um modelo redescoberto na experimentação animal. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 34, n. 6, p. 3951–3958, 2013.

BULGARU, C. V. et al. Zearalenone and the Immune Response. **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 248, 2021.

CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 200–210, 2011.

DA SILVA, E. O. et al. Phytic acid decreases oxidative stress and intestinal lesions induced by fumonisin b 1 and deoxynivalenol in intestinal explants of pigs. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2019.

DA SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. L.; OSWALD, I. P. Mycotoxins and oxidative stress: Where are we? **World Mycotoxin Journal**, v. 11, n. 1, p. 113–133, 2018.

DAVIDSON, A. P.; BAKER, T. W. Reproductive Ultrasound of the Bitch and Queen.

Topics in Companion Animal Medicine, v. 24, n. 2, p. 55–63, 2009.

DEEPA, N.; SREENIVASA, M. Y. Sustainable approaches for biological control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in cereals. Em: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbes in Soil, Crop and Environmental Sustainability**. Elsevier, 2019. p. 149–161.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185–206, 2015.

FERNANDES, S. C.; DE NARDI, A. B. Neoplasias Mamárias. Em: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2015. v. 1p. 171–182.

GAJĘCKA, M. et al. Influence of long-term zearalenone intoxication on the concentration of progesterone and 17β-oestradiol in blood plasma in bitches. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 405–409, 2008.

GAJECKA, M. et al. The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 6, p. 537–542, 2012.

GAJĘCKA, M. et al. The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17β-estradiol concentrations in peripheral blood and body weights of pre-pubertal female Beagle dogs. **Toxicon**, v. 76, p. 260–269, 2013.

GAJĘCKA, M.; ZIELONKA, Ł.; GAJĘCKI, M. The effect of low monotonic doses of zearalenone on selected reproductive tissues in pre-pubertal female dogs-A review. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20669–20687, 2015.

GALABOVA, G. et al. Morphological Changes of the Endometrial Epithelium in the Bitch during Metoestrus and Anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 415–420, 2003.

GEREZ, J. R. et al. Ovarian toxicity by fusariotoxins in pigs: Does it imply in oxidative stress? **Theriogenology**, v. 165, p. 84–91, 2021.

GEREZ, J. R.; DESTO, S. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Deoxynivalenol induces toxic effects in the ovaries of pigs: An ex vivo approach. **Theriogenology**, v. 90, p. 94–100, 2017.

GRANDI, M. et al. Occurrence of Mycotoxins in Extruded Commercial Cat Food. **ACS Omega**, v. 4, n. 9, p. 14004–14012, 2019.

HAGMAN, R. Canine pyometra: What is new? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 288–292, 2017.

HOLLINSHEAD, F.; HANLON, D. Normal progesterone profiles during estrus in the

bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. **Theriogenology**, v. 125, p. 37–42, 2019.

HOU, Y. J. et al. Mycotoxin-Containing Diet Causes Oxidative Stress in the Mouse. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–7, 2013.

JANIK, E. et al. Molecular aspects of mycotoxins—A serious problem for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1–21, 2020.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. The Canine Estrous Cycle. Em: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. (Eds.). **Canine and feline theriogenology**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. v. 1p. 16–31.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. Sistema Genital Feminino. Em: JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia Básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. v. 1, p. 1450–1513.

KNUTSEN, H. K. et al. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p. 1–123, 2017.

KOWALEWSKI, M. P. Selected comparative aspects of canine female reproductive physiology. Em: **Encyclopedia of Reproduction**. Elsevier, 2018. p. 682–691.

KUSTRITZ, M. V. R. Vaginal Cytology in the Bitch and Queen. Em: SHARKEY, L. C.; RADIN, M. J.; SEELIG, D. **Veterinary Cytology**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2020. v. 1p. 552–558.

LÉVY, X. Videovaginoscopy of the canine vagina. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 31–36, 2016.

LIMA, A. L. DE et al. Animais de companhia como modelos comparativos no estudo do melanoma e carcinomas cutâneos: revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. 1–13, 2022.

LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.

LUZ, M. R. et al. In vitro PGF2α production by endometrium and corpus luteum explants from pregnant and nonpregnant diestrus bitches and placental explants from pregnant bitches. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1442–1447, 2006.

MACENTE, B. I.; GUTIERREZ, R. R.; MOTHEO, T. F. Neoplasias do Sistema Genital Feminino. Em: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2015. v. 1p. 145–157.

MACÍAS-MONTES, A. et al. Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry food. **Science of the Total Environment**, v. 708, p. 1–12, 2020.

MARIN, D. E. et al. Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 408–415, 2013.

MASSART, F. et al. High Growth Rate of Girls with Precocious Puberty Exposed to Estrogenic Mycotoxins. **Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 5, p. 690–695, 2008.

QUEIROGA, F. L. et al. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, n. 1–2, p. 9–13, 2009.

RAI, A.; DAS, M.; TRIPATHI, A. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2710–2729, 2020.

RECKERS, F. et al. Canine Vaginal Cytology: A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1–10, 2022.

RIZZO, A. et al. Serum levels of reactive oxygen species (ROS) in the bitch. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 31, n. 2, p. 310–313, 2009.

RIZZO, A. et al. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344–352, 2012.

ROGOWSKA, A. et al. A study of zearalenone biosorption and metabolisation by prokaryotic and eukaryotic cells. **Toxicon**, v. 169, p. 81–90, 2019.

ROPEJKO, K.; TWARUŻEK, M. Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity. **Toxins**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2021.

SAMIK, A.; SAFITRI, E. Mycotoxin binders potential on histological of ovary mice exposed by zearalenone. **Veterinary World**, v. 10, n. 3, p. 353–357, 2017.

SANTOS, R. DE L.; NASCIMENTO, E. F.; EDWARDS, J. F. Sistema Reprodutivo Feminino. Em: SANTOS, R. DE L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2016. v. 1.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023.

SOUSA NETO, B. P. et al. Animais como modelos experimentais nos cursos de graduação na área da saúde: revisão sistemática. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 50, p. 1–11, 2020.

STOPA, E. et al. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches. **Theriogenology**, v. 82, n. 4, p. 537–545, 2014.

TEIXEIRA, T. C. N.; DUTRA, L. M. C. UMA DISCUSSÃO ÉTICA-NORMATIVA ACERCA DOS TESTES LABORATORIAIS EM ANIMAIS NÃO-HUMANOS. **Unisanta Law and Social Science**, v. 9, p. 1–17, 2020.

TSUCHIDA, M. et al. Ultrasonographic observation in combination with progesterone monitoring for detection of ovulation in Labrador Retrievers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 2, p. 149–156, 2022.

1 WITASZAK, N. et al. Fusarium species and mycotoxins contaminating veterinary diets
2 for dogs and cats. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2019.

4 HIPÓTESES

- A utilização de explantes uterinos de cadelas é eficiente para avaliar o efeito da micotoxina Zearalenona.
- O α-Zearalenol afeta a integridade do útero de cadelas em diestro.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Validar uma metodologia de cultivo de explantes uterinos em cadelas analisando potenciais efeitos histológicos e metabólicos causados pelo metabólito α-Zearalenol proveniente da micotoxina Zearalenona no cultivo *in vitro* dos explantes.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma metodologia padronizada para o cultivo de explantes uterinos em cadelas;
- Examinar alterações histológicas nos explantes controle e dos explantes uterinos desafiados com o α-Zearalenol em baixa e alta concentração em 24 horas de cultivo, utilizando escores para avaliação de lesão tecidual;
- Analisar as diferenças na espessura do epitélio de revestimento e glandular dos explantes controle e dos explantes uterinos desafiados com o α-Zearalenol em baixa e alta concentração em 24 horas de cultivo;
- Investigar a alteração de balanço redox presente dos explantes controle e dos explantes uterinos desafiados com o α-Zearalenol em baixa e alta concentração em 24 horas de cultivo;
- Realizar a avaliação bioquímica do sobrenadante do meio de cultivo por meio das dosagens de Na^+ (mmol/L-1), K^+ (mmol/L), Ca^{2+} (mg/dL), mOsm (mmol/kg), Lac (mmol/L), UCFP (mg/dL), Glu (mg/dL) e Cl^- (mmol/L).

6. ARTIGO: ALFA-ZEARALENOL INDUZ TOXICIDADE EM EXPLANTES UTERINOS DE CADELAS EM FASE ESTRAL DE DIESTRO

O presente artigo será submetido ao periódico *Toxicon* com fator de impacto 2.6 (*Journal Citation Reports* – JCR)

α-Zearalenol induz toxicidade em explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro

SAMBATTI, N.R.[1], PIRES, B.G. [2], BALBO, L.C.[2], SILVA, V.W.[1], SILVA, L.A.S.[1], GREGUI, J.R.[1], BUZATO, B.A.[1], HIDALGO, M.M.T.[1], BORGES, F. H. [3], BRACARENSE, A.P.F.R.L[2], MARTINS, M.I.M.[1*]

[1]Laboratório de Andrologia e Reprodução Assistida Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.
[2]Laboratório de Patologia Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.
[3] Laboratório de Farmacologia Vascular, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.
*E-mail: imartins@uel.br

RESUMO

A contaminação de cereais e rações por micotoxinas é frequente em todo o mundo. A ingestão crônica de alimentos contaminados por zearalenona é um dos fatores que afeta negativamente o desenvolvimento reprodutivo dos animais. O α-zearalenol (α-Zol), metabólito da zearalenona, desencadeia alterações reprodutivas conhecidas, entretanto, seus efeitos morfofuncionais no útero ainda não são muito esclarecidos. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos metabólicos e histológicos do α-Zol no útero de cadelas em diestro, utilizando o modelo *ex vivo*, além de avaliar a viabilidade deste método de cultivo em tecido uterino de cadelas. Dez úteros foram obtidos de cadelas saudáveis, entre um e oito anos, submetidas à ovariohisterectomia na fase estral de diestro. Os explantes uterinos foram obtidos com o auxílio de *punch* de 6mm e posteriormente incubados a 38ºC, em meio de cultivo DMEM enriquecido, sob agitação, por 24h. Os explantes foram divididos em três grupos: controle, α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Após a incubação, dois explantes de cada grupo foram fixados e processados para análise morfológica com análise do escore lesional e morfometria do epitélio de revestimento e glandular. Outros dois de cada grupo armazenados em freezer a -80ºC para posterior análise do balanço redox. Além disso, parâmetros de homeostasia celular foram avaliados no sobrenadante do meio de cultivo. Foram encontrados nos explantes expostos ao α-Zol, achatamento do epitélio de revestimento e apoptose do epitélio de revestimento e glandular. Nos controles, visualizou-se com mais frequência, o achatamento do epitélio de revestimento e edema intersticial. Foi possível observar aumento no escore lesional nos explantes expostos a ambas as concentrações de α-Zol em relação ao controle, não diferindo entre os grupos tratados. Não houve diferença significativa na morfometria entre os tratamentos, bem como na análise do sobrenadante do meio de cultivo. A maior concentração de α-Zol induziu aumento de carbonilação de proteínas e em ambos os tratamentos ocorreu a lipoperoxidação. Conclui-se que o modelo *ex vivo* utilizado demonstrou efetividade na avaliação da toxicidade induzida pelo metabólito α-Zol em explantes uterinos de cadelas, resultando em alterações histológicas e alteração do estado redox, mesmo na menor concentração de α-Zol (0,68 µM).

Palavras-chave: cultivo *ex vivo*, espécie canina, estresse oxidativo, histopatologia, fusariotoxinas.

6.1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por fungos filamentosos e que apresentam toxicidade para animais e para o homem. São contaminantes presentes principalmente em produtos vegetais, que por sua vez, são amplamente utilizados na formulação de rações para animais (KNUTSEN et al., 2017).

A utilização de rações comerciais como base alimentar para cães e gatos, está cada vez mais comum mundialmente, devido a facilidade e economia ao mesmo tempo que atende às necessidades nutricionais das espécies ao longo da vida. Por esta razão e preocupação dos tutores com a segurança alimentar dos *pets*, a contaminação por micotoxinas se configura como um problema já conhecido (GRANDI et al., 2019).

No estudo conduzido por Macías-Montes et al. (2020), que investigaram as concentrações de várias micotoxinas em rações para cães e gatos, foi constatado diferentes proporções dessas substâncias em todas as marcas analisadas, embora a maioria estivesse presente em quantidades relativamente baixas. Grandi et al. (2019), também observaram uma ocorrência frequente de micotoxinas em amostras de rações, destacando-se a combinação de zearalenona (ZEA), desoxinivalenol e fumonisinas. Essas descobertas ressaltam a importância de monitorar e entender os potenciais riscos à saúde dos animais de estimação relacionados à contaminação por micotoxinas em suas dietas.

Dentre as micotoxinas, a ZEA é conhecida por sua capacidade de mimetizar o hormônio sexual 17-β-estradiol, com potencial de se ligar competitivamente aos receptores relacionados. Como consequência, essa micotoxina causa efeitos estrogênicos e induz distúrbios reprodutivos, tanto em humanos quanto em animais. A espécie canina é considerada uma das mais sensíveis aos efeitos da ZEA (ALSHANNAQ; YU, 2017; KNUTSEN et al., 2017). Existem dois metabólitos derivados da ZEA, sabe-se que o α-Zearalenol (α-Zol), é mais tóxico do que o β-Zearalenol, devido à alta afinidade pelos receptores de estrogênio. Além disso, dentre as fontes de contaminação da ZEA têm-se os cereais como milho, cevada, aveia, sorgo e trigo, presentes na maioria das rações animais e alimentação humana (JANIK et al., 2020).

A exposição crônica de cadelas à micotoxina ZEA, por meio de dieta contaminada e sua afinidade aos receptores hormonais, pode levar a desregulação dos hormônios reprodutivos e consequentemente distúrbios uterinos, como lesões degenerativas do miométrio e endométrio, incluindo aumento e atrofia das glândulas endometriais com edema e extravasamento (GAJĘCKA et al., 2013; KNUTSEN et al., 2017; STOPA et al., 2014). Estudo

que avaliaram esta exposição em outros mamíferos, observaram redução da fertilidade, infertilidade, abortos, retenção placentária, redução no tamanho de ninhadas, natimortos, cistos ovarianos, hiperplasia uterina, pseudociese, hiperplasia/prolapso vaginal, vaginite, edema de vulva e hiperplasia mamária em diversas espécies de mamíferos (ROPEJKO; TWARUŻEK, 2021).

No sistema reprodutor, as espécies reativas de oxigênio (ERO), quando mantidas em concentrações apropriadas, desempenham um papel crucial como mediadores importantes na sinalização hormonal, esteroidogênese ovariana, ovulação, formação do corpo lúteo, luteólise e função das células germinativas (RIZZO et al., 2009). Níveis equilibrados de ERO foram correlacionados com a atividade angiogênica no endométrio, promovendo a regeneração durante cada fase do ciclo estral. Assim sendo, quantidades controladas são essenciais para sustentar a função fisiológica, mas sua presença em concentrações elevadas pode ser prejudicial, com disfunção das células endometriais, predispondo às afecções uterinas (LU et al., 2018).

A exposição a uma dieta contaminada com ZEA acarreta alterações do balanço redox no soro, fígado, rins de camundongos (HOU et al., 2013) e tecido testicular de caprinos (LIU et al., 2023). Entretanto, quando tratamos do sistema reprodutivo da espécie canina, não há dados disponíveis na literatura relativos aos efeitos de uma dieta contaminada com ZEA na resposta oxidativa.

O cultivo de explantes, também denominado como método de cultivo de tecidos *ex vivo* baseia-se no cultivo de fragmentos teciduais obtidos por *punch* ou bisturi e posteriormente cultivados em meio de cultura buscando se assemelhar ao máximo as condições *in vivo* (BASSO; BRACARENSE, 2013; DOKE; DHAWALE, 2015). O cultivo de explantes se mostra relevante pelas questões éticas na experimentação animal (TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos histológicos e metabólicos do metabólito α-Zol em explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro, por meio do método *ex vivo*. E avaliar a viabilidade do método de cultivo *ex vivo* para tecido uterino de cadelas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Aspecto Ético

Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), protocolo CEUA de nº 019.2022 e a autorização dos tutores por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

6.2.2 Critérios de Inclusão dos Animais para Obtenção das Amostras

Para o cultivo dos explantes, o útero foi obtido de dez cadelas saudáveis, de um a oito anos de idade, que foram submetidas à ovariohisterectomia (OH) eletiva e que estavam na fase do ciclo estral de diestro.

Antes de serem incluídas no projeto, passaram por avaliação clínica minuciosa (CRUZ et al., 2024). Para análise laboratorial, foram colhidos 2ml de sangue total, o hemograma foi realizado por meio de um sistema automatizado (poCH-100iV Diff™, Sysmex, Kobe, Japão) para contagem de glóbulos vermelhos e leucócitos, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. Contagens diferenciais de leucócitos e estimativa manual de plaquetas para confirmar as contagens eletrônicas foram realizadas em esfregaços de sangue corados com Diff-Quick (NEWPROV, Paraná, Brasil). O teste bioquímico para determinação do nível plasmático de creatinina foi executado no sistema de química clínica Dimension® Xpand Plus (SIEMENS, Siemens Healthcare diagnostics Inc., PA, EUA). Após avaliação dos resultados, as pacientes que apresentavam valores normais para a espécie, eram consideradas aptas para a realização da cirurgia. Aquelas que apresentaram alterações no exame físico e/ou laboratorial foram excluídas do projeto.

A fase do ciclo estral de diestro foi confirmada por meio do histórico reprodutivo obtido pela anamnese e pela citologia vaginal (KUSTRITZ, 2020; RECKERS et al., 2022), a qual foi introduzida uma escova ginecológica no canal vaginal, seguido pela confecção e coloração da lâmina com panótico rápido e observação do padrão celular por meio da microscopia óptica de luz (microscópio BA400, Motic®). Para a caracterização exata da fase de diestro, contou-se 200 células esfoliativas vaginais por lâmina e calculou-se as proporções entre as células parabasais, intermediárias e superficiais, juntamente com a determinação da

quantidade estimada de neutrófilos.

6.2.3 Procedimento Anestésico e Cirúrgico

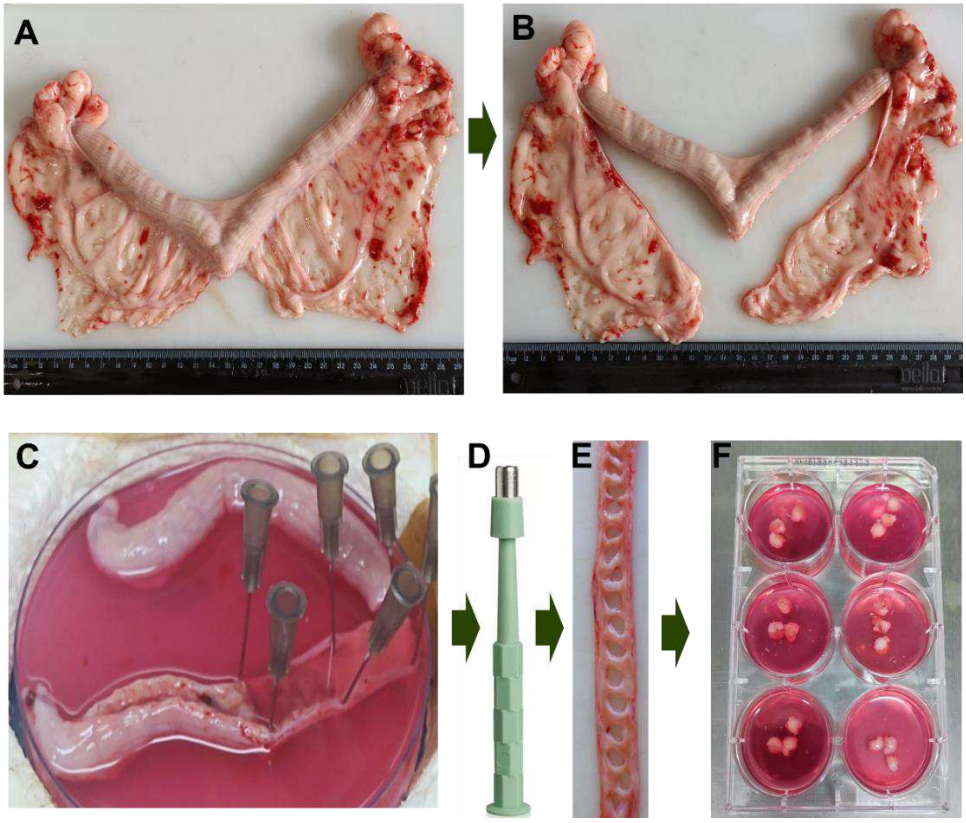
O procedimento anestésico foi realizado de acordo com o protocolo básico, composto por morfina (0,3 mg/Kg) e acepromazina (0,02mg/Kg) por via intramuscular, indução anestésica com propofol (4 a 8 mg/Kg – dose efeito) por via intravenosa e manutenção anestésica no isoflurano por via inalatória (CRUZ et al., 2024).

A cirurgia de OH eletiva foi realizada utilizando-se a técnica de três pinças hemostáticas (HEDLUND, 2008) para a transfixação dos pedículos ovarianos e coto uterino, com fio não absorvível (nylon comercial).

6.2.4 Preparo Tecidual e Cultivo dos Explantes

Após a realização do procedimento cirúrgico de OH, os úteros foram processados em um período máximo de 15 minutos, assim como em pesquisas similares (LUZ et al., 2006). Os úteros foram lavados com água Milli-Q e o ligamento largo do útero foi excisado. Os dois cornos uterinos foram abertos longitudinalmente após uma incisão transversal em cada corno, acima do ligamento intercornual. O útero foi submerso em meio de cultivo DMEM enriquecido, e então, os fragmentos foram obtidos a partir de úteros macroscopicamente saudáveis com auxílio de *punch* de 6mm (fluxograma demonstrado na Figura 1), resultando na obtenção de 20 explantes uterinos por animal. Para a análise histopatológica sem incubação (zero hora), foram separados dois explantes, os outros 18 explantes foram cultivados por 24 horas, totalizando uma amostra de 180 explantes.

Figura 1 – Fluxograma para obtenção dos fragmentos uterinos de cadelas em fase estral de diestro para o cultivo tecidual. A: Útero e ovários após lavagem externa com água Milli-Q. B: Excisão do ligamento largo do útero. C: Posicionamento dos cornos uterinos após incisão transversal em cada corno, acima do ligamento intercornual e abaixo de cada ovário para que fosse possível uma abertura longitudinal. D: *punch* de biópsia estéril de 6mm utilizado para a obtenção dos explantes. E: Aspecto do corno uterino após a retirada dos explantes. F: Placas de cultura de seis poços com os explantes uterinos submersos no meio de cultivo.



Fonte: o próprio autor.

O cultivo tecidual foi realizado em placas de cultura de 6 poços (Figura 1 – F) contendo 5mL do meio para cultivo celular DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium – powder high glucose, gibco®) e acrescido de soro fetal bovino (10%), insulina transferrina em selênio - ITS (10%), complexo polivitamínico (10%) e o antibiótico-antimicótico (1%) contendo 10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. Os explantes foram distribuídos em três grupos com quatro repetições: controle (apenas meio de cultura), grupo exposto ao α-Zol 0,68 µM e grupo exposto ao α-Zol 3,4 µM. O α-Zol (ZO166-5mg Sigma-Aldrich®) foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO), conforme recomendação do fabricante, para obtenção de soluções estoque na concentração de 1 mM que foram mantidas congeladas a -18ºC (±2ºC) em *eppendorf* selados, ao abrigo da luz, até que fossem utilizados.

A dose utilizada foi baseada no Manual Pet Food Brasil, criado pela Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) e

considerados referência para as indústrias brasileiras que produzem *pet food*. Seguindo a legislação da União Europeia de nº 2013/165 (ABINPET, 2024), que estabelece o limite máximo de 200 µg/kg (0,68 µM) de ZEA para animais de estimação adultos (ABINPET, 2024). Para a concentração mais baixa utilizou-se o limite máximo tolerado pela legislação de 200 µg/kg (equivalente a 0,68µM de α-Zol) e cinco vezes o limite máximo, portanto 1mg/kg (3,4 µM).

As placas foram incubadas em estufa a 38ºC, sob agitação, por 24 horas. Após a incubação, de cada tratamento foram separados dois explantes para o processamento histopatológico, dois armazenados em freezer -80ºC para posterior análise de estresse oxidativo e dois sobressalentes armazenados para eventuais reanálises. Além do sobrenadante do meio de cultivo encaminhado para análise bioquímica.

6.2.5 Protocolo de Histomorfologia e Morfometria

Os explantes foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por 24 horas. As amostras foram então desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 4µm de espessura obtidos por meio do micrótomo automático (CUT 6062 SLEE medical GmbH®) foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE).

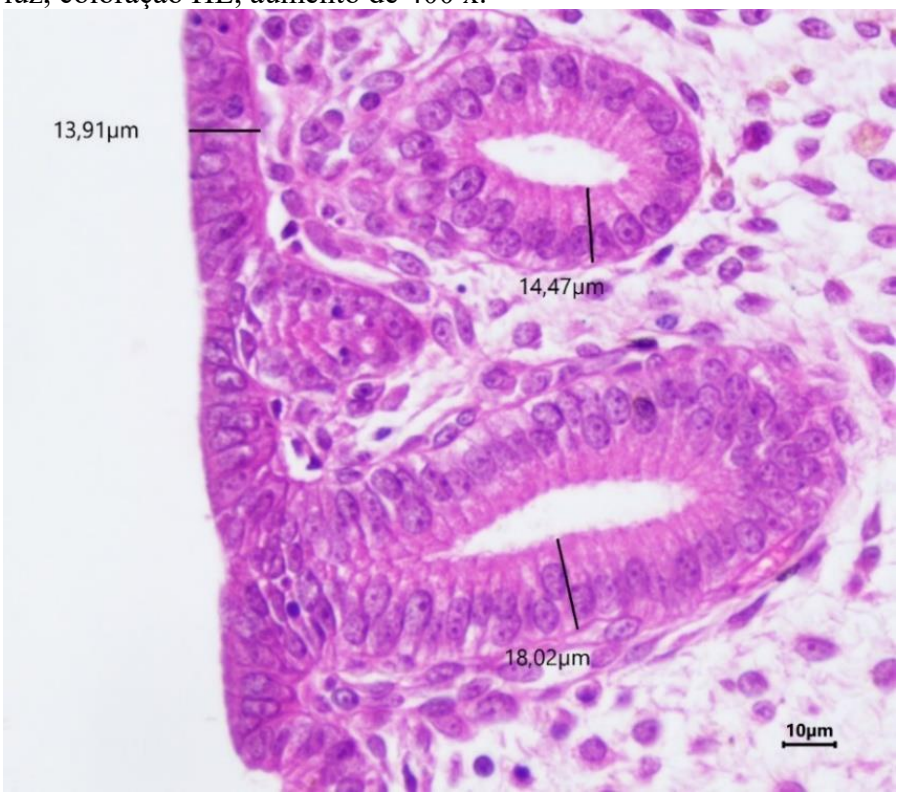
As alterações histológicas foram classificadas utilizando-se um escore de lesão. A extensão de cada alteração foi classificada de 0 a 3 (de acordo com a intensidade ou frequência da lesão) e posteriormente multiplicada pelo fator de gravidade para o estabelecimento do escore lesional (Tabela 1). A análise morfométrica da altura do epitélio de revestimento e glandular foi realizada com auxílio do programa de análise de imagens (Opticam Microscope Image Software 3.7®, EUA). A Figura 2 demonstra o método de mensuração da altura do epitélio glandular e de revestimento.

Tabela 1 – Escore lesional no endométrio de cadelas em fase estral de diestro – classificados pelo tipo de lesão histológica e multiplicados pelo fator de gravidade das lesões.

Alteração (intensidade: 1- leve, 2- moderada e 3- acentuada)	Fator de gravidade (1- leve, 2-moderado e 3- acentuado)
Achatamento do epitélio e revestimento	1x
Vacuolização citoplasmática do epitélio de revestimento	1x
Vacuolização citoplasmática do epitélio glandular	1x
Descamação do epitélio de revestimento	1x
Descamação do epitélio glandular	1x
Edema intersticial	2x
Infiltrado inflamatório	2x
Apoptose do epitélio de revestimento	3x
Apoptose do epitélio glandular	3x
Escore máximo	**45**

Fonte: Adaptado de Gerez; Desto; Bracarense (2017).

Figura 2 – Morfometria do epitélio glandular e do epitélio de revestimento. Microscopia de luz, coloração HE, aumento de 400 x.



Fonte: o próprio autor.

6.2.6 Análise da Resposta ao Estresse Oxidativo

Todas as análises descritas a seguir tem seus resultados expressos em miligramas de proteína. A concentração de proteínas foi encontrada por meio da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), que utiliza o corante Coomassie®, cuja absorbância pode ser medida a 495nm devido à sua coloração marrom, no entanto, ao interagir com as proteínas da amostra, sua coloração varia para tons de azul, possibilitando a leitura a 595nm.

6.2.6.1 Quantificação de dano oxidativo

6.2.6.1.1 Proteína Carbonílica (PC)

São proteínas que passaram por modificações pela adição de grupos carbonila, tornando-as mais hidrofóbicas e resistentes à proteólise (REZNICK; PACKER, 1994). A homogeneização dos tecidos foi realizada em tampão fosfato 50mM. Em seguida, 150µL dessa homogeneização foram divididos em dois tubos, sendo que um deles continha dinitrofenilhidrazina e o outro ácido clorídrico a 2M (molar). Após 1 hora, foram adicionados 500µL de ácido tricloroacético a 28%. O precipitado resultante foi então lavado com álcool absoluto e diluído em guanidina 6M. A leitura dos dois tubos foi realizada em 385nm, e o cálculo pela fórmula $\{[(Abs_{Tubo2} - Abs_{Tubo1})/0{,}011\mu M^{-1})] \times (350\mu L/150\mu L)\}$, em que $0{,}011\mu M^{-1}$ representa o coeficiente de partição da placa, e a relação 350/150 é a proporção entre o volume final e o volume inicial pipetado para a placa. Os valores resultantes foram expressos em nmol/mg de proteína.

6.2.6.1.2 Análise da lipoperoxidação

Os lipídeos das membranas são facilmente oxidados. Assim é possível observar a lipoperoxidação de membranas biológicas por meio da detecção de produtos da lipoperoxidação, que reagem com o ácido tiobarbitúrico (DRAPER et al., 1993). Na microplaca, foram adicionados 50µL de ácido tricloacético a 2,8%, 50µL de ácido tiobarbitúrico a 1%, 5µL de cloreto férrico a 1M e ácido ascórbico a 0,5M em 50µL do homogenato. Rapidamente a microplaca foi levada a estufa por 45ºC por 30min. Logo em seguida, a microplaca foi retirada e resfriada em banho de gelo e lida em 535nm e 572nm. O cálculo foi realizado por $(Abs_{535} - Abs572)/0{,}05$ e os valores expressos em nmol de TBARS/mg de

proteína.

6.2.8.1.3 Malondialdeído (MDA)

Ao término da lipoperoxidação, pode-se encontrar produtos mais prejudiciais, como o malondialdeído, capaz de se ligar a bases nitrogenadas e causar danos ao DNA (GUTTERIDGE, 1986). Nesse sentido, 300µL do homogenato foram adicionados a 40µL de ácido tricloroacético a 28%. Aguardou-se por 15 minutos antes de adicionar 150µL de ácido tiobarbitúrico a 1%. Por fim, os tubos foram levados à estufa a 45ºC por 30 minutos. A leitura foi realizada a 532nm. O cálculo foi feito em relação ao padrão de MDA e expresso em mmol/mg de proteína.

6.2.6.2 Avaliação da capacidade antioxidante

6.2.6.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima é caracterizada como a mais crucial na defesa dos organismos, sendo capaz de catalisar a conversão de superóxidos e hidrogênios em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (SUN; OBERLEY; LI, 1988). Assim, para cada 10µL de homogenato, foram adicionados 120µL de tampão de carbonato de sódio 50mM, 50µL de solução de EDTA 0,1mM contendo 96mM de tetrazólio nitroazul (NBT) e 10µL de Triton X-100 0,6%. As amostras foram incubadas por dois minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 10µL de hidroxilamina a 20mM, e a leitura foi realizada a 560nm. O cálculo foi feito pela porcentagem de inibição $(Abs_{560} - Abs_{branco})/(Abs_{branco})$, este valor dividido por 50, que corresponde à porcentagem de inibição do NBT por unidade de SOD. Dessa forma, a atividade específica pôde ser calculada pela fórmula (% de inibição x 20) / (unidade de SOD x proteínas) e os valores foram expressos em % de inibição/U SOD/mg de proteína.

6.2.6.2.2 Catalase (CAT)

É uma enzima capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio (KAR; MISHRA, 1976). Para conduzir o experimento, 10µL do homogenato foram adicionados a 296µL de solução reagente (9mL de tampão Tris-HCl com 720µL de peróxido de hidrogênio P.A.). Após dois minutos, a leitura foi feita a 240nm, e o cálculo realizado por meio

da fórmula {[(Abs_{240}/2)/2,8]/0,01}, onde 2,8 é o coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio e 0,01 é o volume da amostra. Os valores obtidos foram expressos em $\mu mol.H_2O_2.min^{-1}$/mg de proteína.

6.2.6.2.3 Glutationa S-transferase (GST)

Este tripeptídeo, presente nas células, desempenha uma função essencial em diversas atividades celulares, estando envolvido no metabolismo de xenobióticos e contribuindo para a proteção contra a lipoperoxidação (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974). Na preparação do reagente, foram adicionados 0,0093g de glutationa reduzida (GSH) e adição de 0,0122g do oxidante 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno a 19mL de tampão difosfato 0,1M. Posteriormente, 20µL do homogenato foram adicionados a 180µL desse reagente. Antes da leitura a 340nm, aguarda-se por três minutos em temperatura ambiente. O cálculo foi realizado pela seguinte fórmula: {[(Abs_{340}/3)/9,6] x 200/(proteína x 20)} x 20, onde 9,6 é o coeficiente de partição GST/GSH, 200 é o volume final, e 20 é o volume da amostra. Os valores foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

6.2.6.2.4 Poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

É um teste que avalia a capacidade dos antioxidantes de reduzir o ferro férrico (BENZIE; STRAIN, 1996). Para preparar a solução reagente, foram adicionados 20mL de tampão acetato 0,3M, 1mL de TPTZ 10mM e 1mL de cloreto férrico 20mM. Em seguida, 20µL do homogenato foram adicionados a 150µL do reagente preparado e aguardados por um minuto em temperatura ambiente. Posteriormente, a leitura foi realizada a 593nm. O cálculo foi efetuado pela curva padrão de Trolox e expresso em mmol Fe^2/L.

6.2.7 Análises Bioquímicas do Meio de Cultivo

Análise de níveis de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio e cloro), lactato, glicose, microproteína e osmolalidade foi realizada com o sobrenadante do meio de cultivo dos explantes. Para tanto, foi colhido 1mL do sobrenadante previamente a incubação (0 h) e 1mL do sobrenadante dos explantes expostos aos diferentes tratamentos após as 24h de incubação. As análises foram realizadas por meio do aparelho de hemogasometria *Siemens - RAPIDPoint® 500 Blood Gas Systems* e a mensuração da microproteína pelo UCFP (teste de determinação

quantitativa de proteína total) com a utilização do Sistema de Bioquímica Integrada *Siemens - Dimension EXL 200*.

6.2.8 Análise Estatística

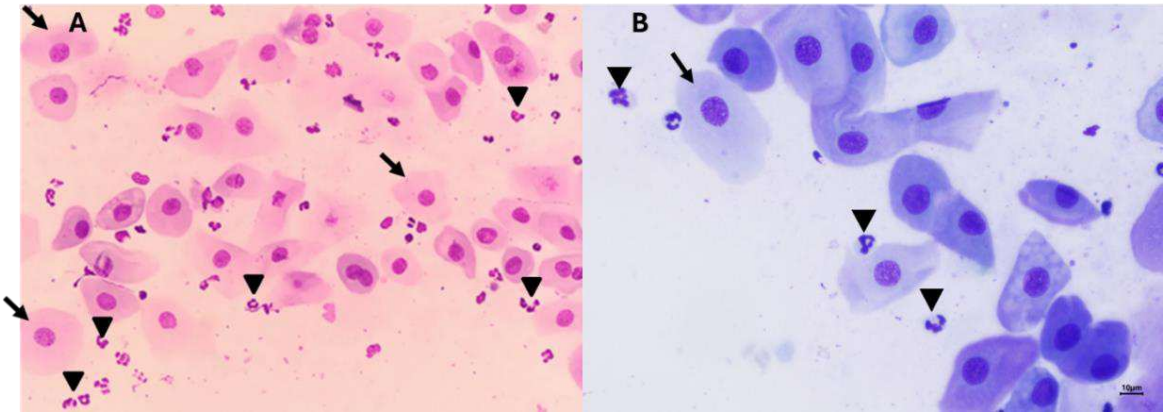
Os dados foram tabulados com auxílio de planilhas do programa Microsoft Excel® (Excel 2013). A avaliação bioquímica do sobrenadante foi tratada como um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em fatorial com dois fatores qualitativos (tempo e concentração de α-Zol). As demais avaliações de morfometria, escore lesional e estresse oxidativo, tratado como um DIC simples, com um fator qualitativo em três níveis (controle, baixa concentração de α-Zol e alta concentração de α-Zol). A normalidade dos dados foi testada por meio de Shapiro-Wilk, as análises de variância e testes de agrupamento de médias (Tukey ou Scott-Knott) foram realizadas com auxílio dos programas R Development Core Team (2009) e SISVAR 5.6, além da ilustração gráfica dos resultados elaborada por meio do programa SigmaPlot 12.0. Os dados de proteína carbonílica não apresentaram distribuição normal e foram transformados utilizando-se Log (x) para que pudessem atender os pressupostos e serem submetidos a análise de variância. Já os dados da glutationa s-transferase, que também não ofereceram distribuição normal, foram submetidos a análises não paramétricas e avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Tukey, e expressos por mediana [percentil 25-75%]. No caso de dados não paramétricos os dados foram expostos por meio de média e desvio padrão.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Fase do Ciclo Estral

Foi constatado que 20% das cadelas utilizadas no estudo experimental se encontravam entre o 1º e 20º dia do diestro citológico, 50% entre o 21º e 40º dia, e 30% entre o 41º e 60º dia, caracterizando início, meio e final de diestro. Na fase de diestro há predomínio de células vaginais do tipo intermediárias (Figura 3) e parabasais (KUSTRITZ, 2020; RECKERS et al., 2022).

Figura 3 – Perfil citológico vaginal de cadelas na fase estral de diestro. Células coradas pelo método panóptico e observadas em microscopia de luz em 200x (A) e 400 x (B). As setas demonstram células intermediárias e as pontas de setas a presença de neutrófilos, frequentemente observados nessa fase do ciclo estral.



Fonte: o próprio autor.

6.3.2 Análise Histológica

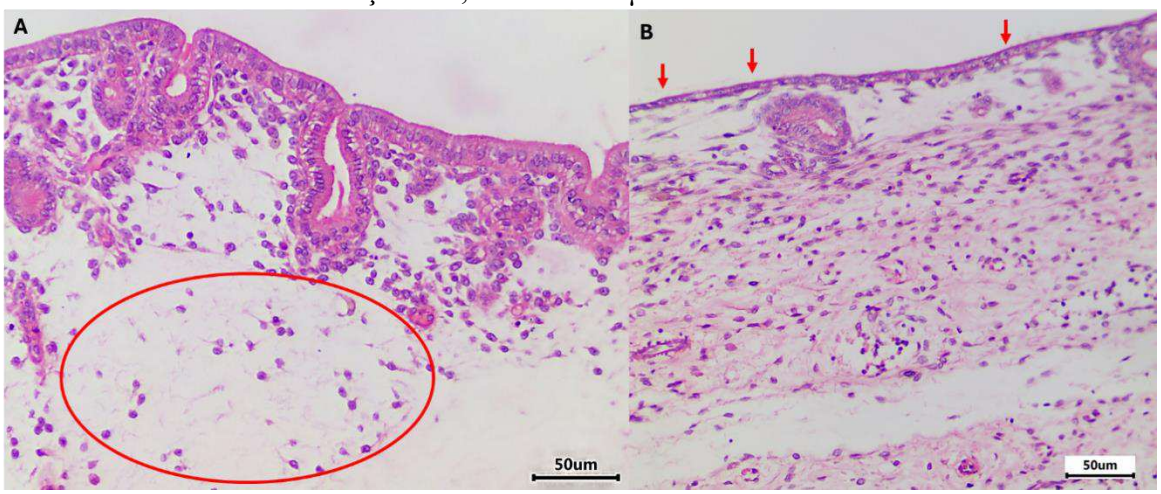
Após 24 horas de incubação os achados histológicos mais frequentes nos explantes uterinos do grupo controle foram o edema intersticial (Figura 4 - A) e o achatamento do epitélio de revestimento (Figura 4 - B). Nos explantes expostos a ambas as concentrações de α-Zol as principais alterações foram edema intersticial, achatamento do epitélio de revestimento e apoptose do epitélio de revestimento e glandular (Figura 5). Vacuolização citoplasmática (Figura 6 - A) e descamação epitelial (Figura 6 - B) foram observadas em todos os tratamentos. A frequência de cada alteração nos diferentes tratamentos está disposta na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência de alterações histológicas em explantes uterinos expostos aos diferentes tratamentos – controle 0h (sem incubação), controle 24h, α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração.

Tipo da Lesão	Controle 0h	Controle 24h	[α-Zol] Baixa	[α-Zol] alta
Achatamento do epitélio de revestimento	9	16	12	23
Vacuolização citoplasmática do epitélio de revestimento	7	7	11	10
Vacuolização citoplasmática do epitélio glandular	4	5	10	11
Descamação do epitélio de revestimento	1	0	2	5
Descamação do epitélio glandular	0	9	9	13
Edema intersticial	20	34	36	42
Presença de infiltrado inflamatório	0	0	20	8
Apoptose do epitélio de revestimento	0	3	27	24
Apoptose do epitélio glandular	0	3	30	24
TOTAL	**41**	**77**	**157**	**160**

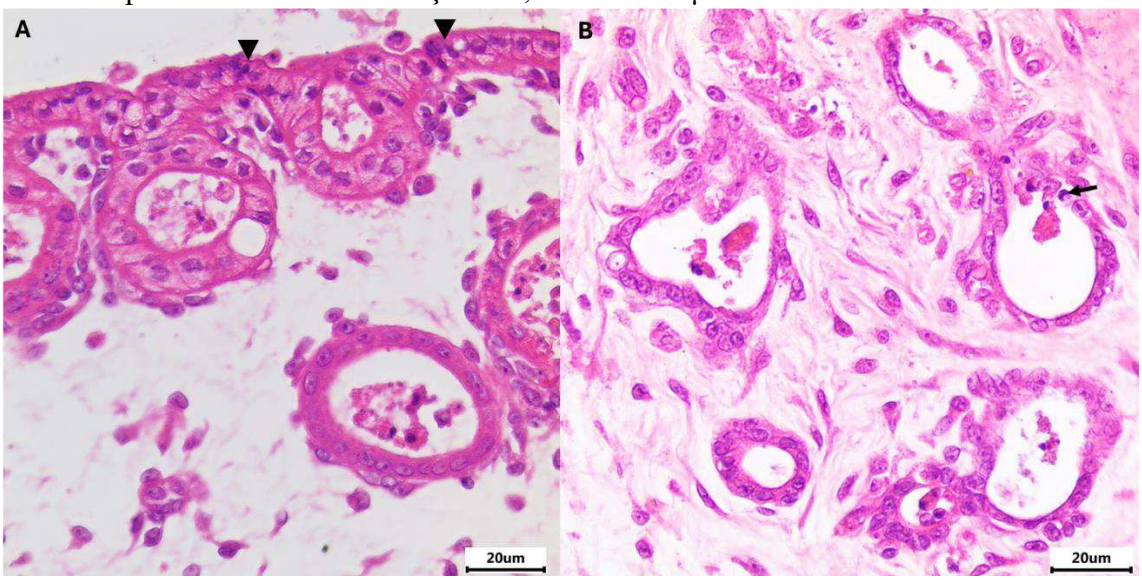
Fonte: o próprio autor.

Figura 4 – Edema intersticial (região circulada - A) e achatamento do epitélio de revestimento (setas - B) frequentemente observado no grupo controle de explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro. Coloração HE, barra de 50 µm.



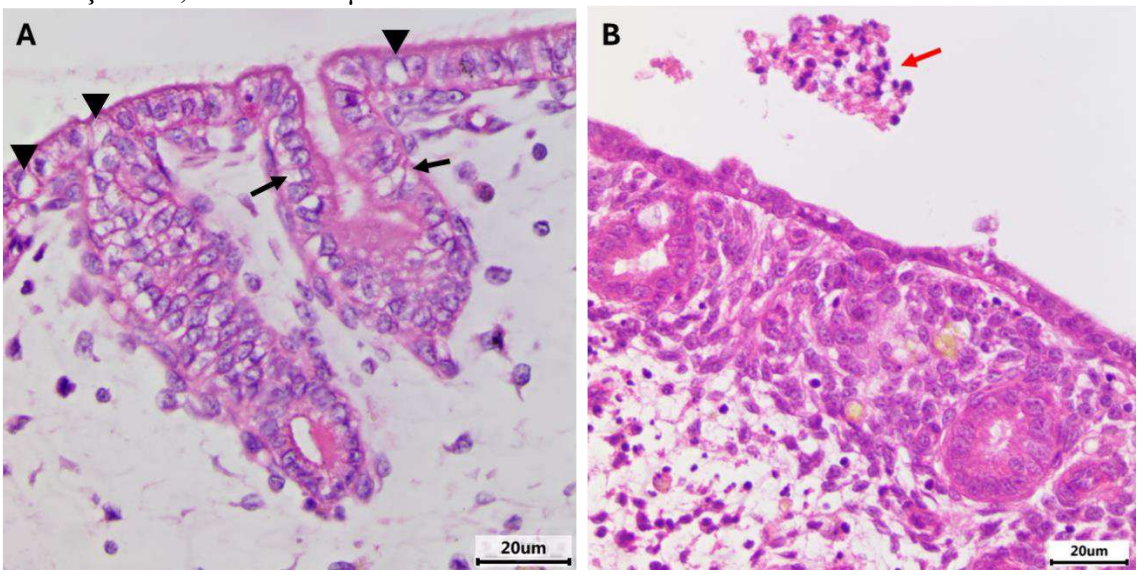
Fonte: o próprio autor.

Figura 5 – Sinais de apoptose no epitélio de revestimento (pontas de setas – figura A) e glandular (seta preta – figura B) observada nos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro expostos ao α-Zol. Coloração HE, barra de 20 µm.



Fonte: o próprio autor.

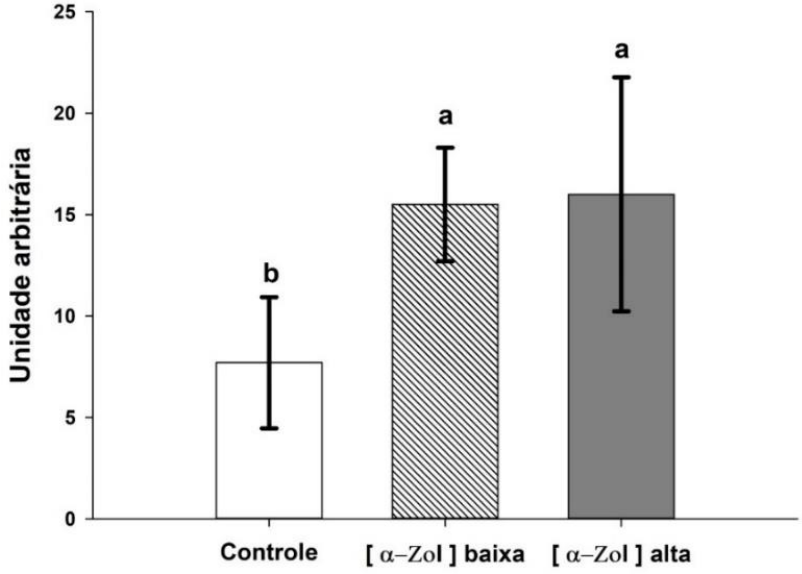
Figura 6 – Vacuolização citoplasmática do epitélio de revestimento (pontas de setas – figura A) e glandular (seta preta – figura A) e descamação epitelial (seta vermelha – figura B) observados nos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Coloração HE, barra de 20 µm.



Fonte: o próprio autor.

Um aumento significativo ($p \leq 0,01$) no escore lesional nos explantes expostos a ambas as concentrações de α-Zol (baixa concentração = 15,5 ± 2,8; alta concentração = 16 ± 5,77) foi constatado em comparação com o grupo controle 24 horas (7,7 ± 3,23). No entanto, não houve diferença no escore lesional entre as diferentes concentrações de α-Zol às quais os explantes foram expostos (Figura 7).

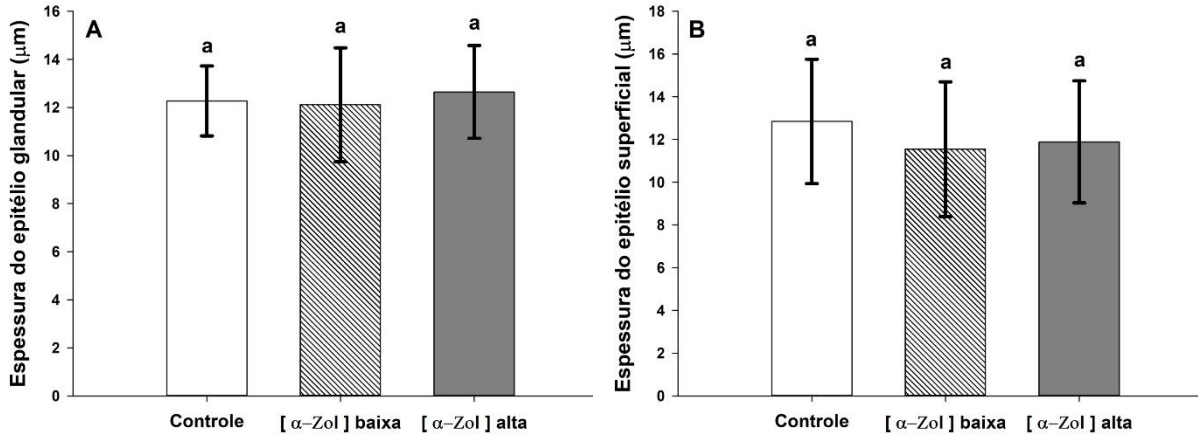
Figura 7 – Escore lesional dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,01).



Fonte: o próprio autor.

Na avaliação morfométrica do endométrio, não foi encontrado diferença significativa (p>0,05) na espessura do epitélio glandular (12,34 ± 1,92) e de revestimento (11,98 ± 2,97) entre os diferentes tratamentos e grupo controle 24 horas (Figura 8).

Figura 8 – Morfometria do epitélio glandular (A) e de revestimento (B) dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05).



Fonte: o próprio autor.

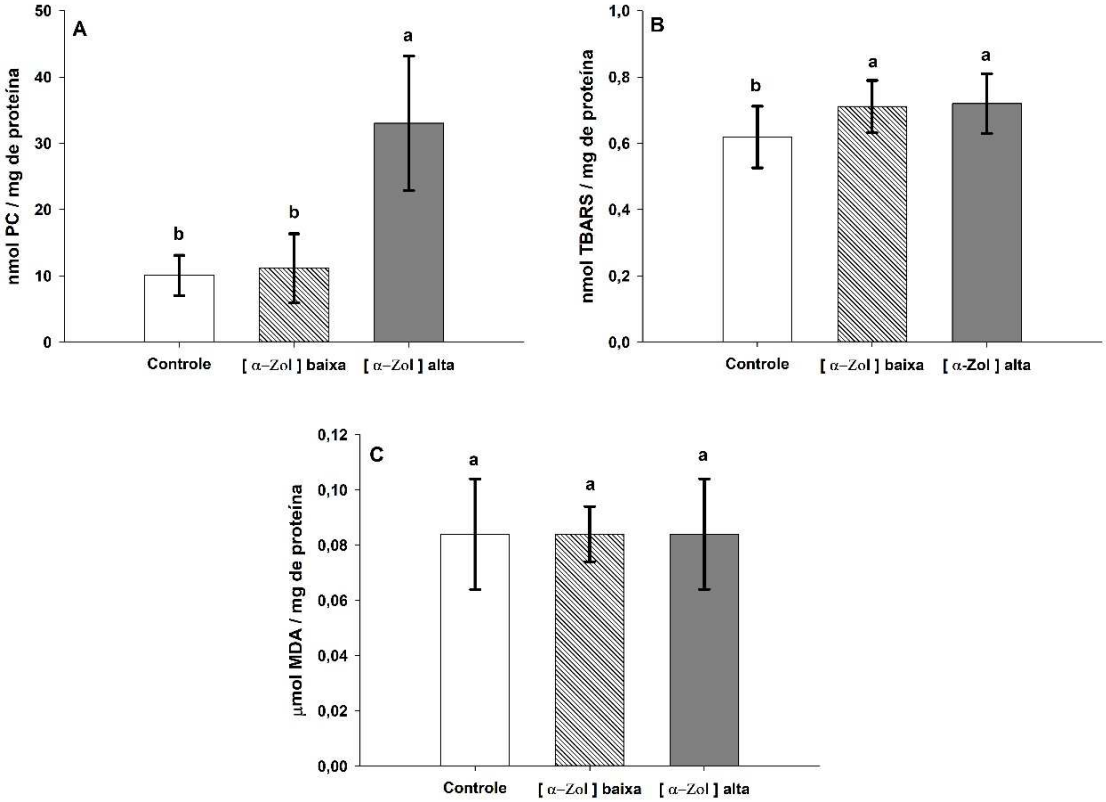
6.3.3 Análise da Resposta ao Estresse Oxidativo

6.3.3.1 Quantificação de dano oxidativo

Os explantes expostos a maior concentração de α-Zol apresentaram um aumento de 3,3 vezes nos níveis de carbonilação de proteínas (33,05 ± 10,14 nmol PC/mg de proteína) quando comparado ao tratamento controle (10,08 ± 3,04 nmol PC/mg de proteína) e com baixa concentração de α-Zol (11,14 ± 5,21 nmol PC/mg de proteína) (Figura 9).

Para avaliação da peroxidação lipídica utilizou-se o método TBARS modificado em que se detectou que ambas as concentrações de α-Zol (baixa concentração = 0,71 ± 0,08 nmol TBARS/mg de proteína e alta concentração = 0,72 ± 0,09 nmol TBARS/mg de proteína) induziram aumento de oxidação em comparação ao controle (0,62 ± 0,09 nmol TBARS/mg de proteína) (Figura 9B). Já com relação ao término da lipoperoxidação, não teve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos (baixa concentração = 0,084 ± 0,01 mmol/mg de proteína; alta concentração = 0,084 ± 0,02 mmol/mg de proteína e controle = 0,084 ± 0,02 mmol/mg de proteína) nos níveis de MDA (Figura 9C).

Figura 9 – Avaliação do estresse oxidativo nos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,01$). A: Dosagem de proteína carbonílica (PC) expresso em nmol PC/ mg de proteína. B: Teste de avaliação dos níveis de lipoperoxidação expresso em nmol TBARS/mg de proteína. C: Dosagem de malondialdeído (MDA) expresso em mmol/mg de proteína.



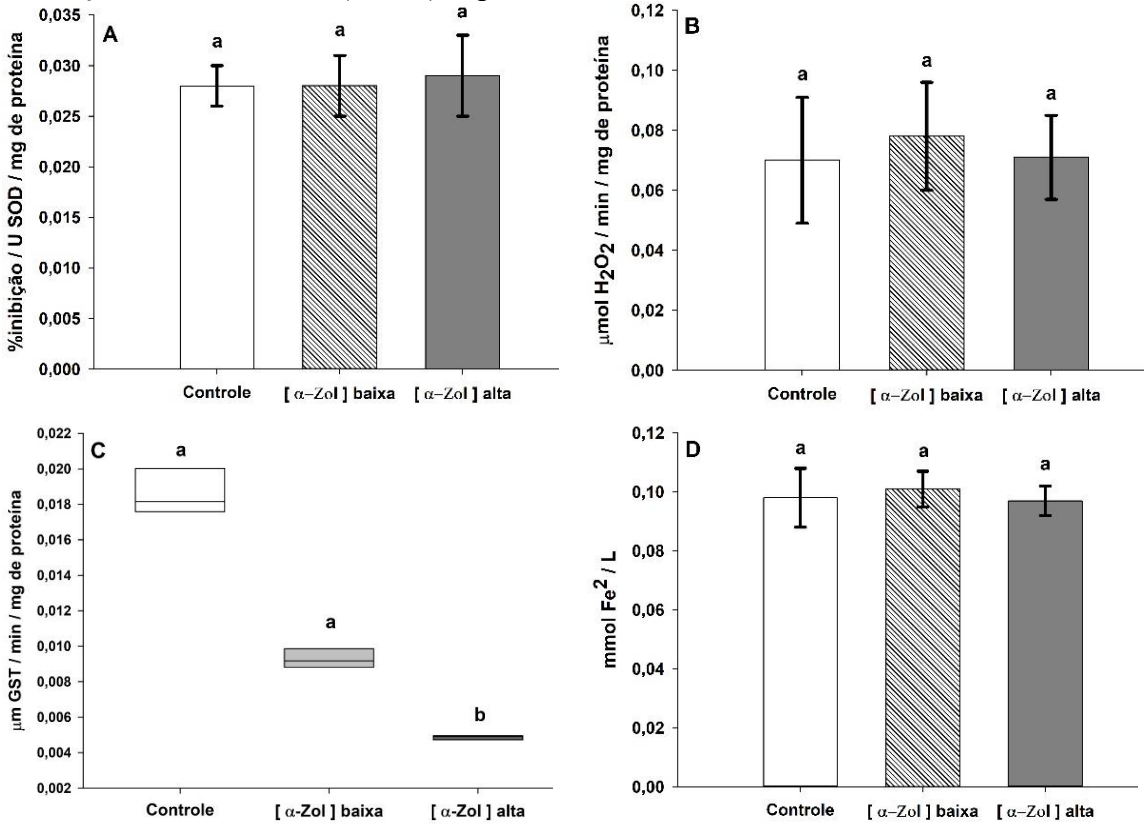
Fonte: o próprio autor.

6.3.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante

No presente estudo a capacidade antioxidante foi avaliada por meio da mensuração dos níveis de SOD, catalase, FRAP e GST. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos na mensuração de SOD (baixa concentração = 0,028 ± 0,003% de inibição/U SOD/mg de proteína; alta concentração = 0,029 ± 0,004% de inibição/U SOD/mg de proteína e controle = 0,028 ± 0,002% de inibição/U SOD/mg de proteína), catalase (baixa concentração = 0,078 ± 0,018 µmol $H_2O_2.min^{-1}$/mg de proteína; alta concentração = 0,071 ± 0,014 µmol $H_2O_2.min^{-1}$/mg de proteína e controle = 0,07 ± 0,021 µmol $H_2O_2.min^{-1}$/mg de proteína), e FRAP (baixa concentração = 0,101 ± 0,006 mmol Fe^2/L; alta concentração = 0,097 ± 0,005 mmol Fe^2/L e controle = 0,098 ± 0,01 mmol Fe^2/L) (Figura 10). No entanto, para GST detectou-se redução significativa dos níveis nos explantes tratados com a maior concentração de α-Zol (0,0049, P25 = 0,0047, P75 = 0,005 µmol/min/mg de proteína) (Figura

10) quando comparado ao controle (0,0181, P25 = 0,0176, P75 = 0,02 µmol/min/mg de proteína) e baixa concentração (0,0092, P25 = 0,0088, P75 = 0,0099 µmol/min/mg de proteína).

Figura 10 – Mensuração da capacidade antioxidante dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro cultivados em meio de cultivo controle e meio contendo α-Zol em baixa (0,68 µM) e alta (3,4 µM) concentração. Valores expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). A: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) expresso em % de inibição/U SOD/mg de proteína. B: Dosagem da atividade da enzima catalase (CAT) expresso em µmol $H_2O_2.min^{-1}$/mg de proteína. C: Mensuração da glutationa s-transferase (GST) expresso em µmol/min/mg de proteína. D: Teste da capacidade de redução do ferro férrico (FRAP) expresso em mmol Fe^2/L.



Fonte: o próprio autor.

6.3.4 Análises Bioquímicas do Meio de Cultivo

Diversos parâmetros de homeostasia celular foram avaliados no sobrenadante (concentração de íons, glicose, lactato), no entanto, não se observou diferença significativa entre os tratamentos. Conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos parâmetros de homeostasia celular do sobrenadante do meio de cultivo controle, meio contendo α-Zol em baixa (0,68 μM) e alta (3,4 μM) concentração.

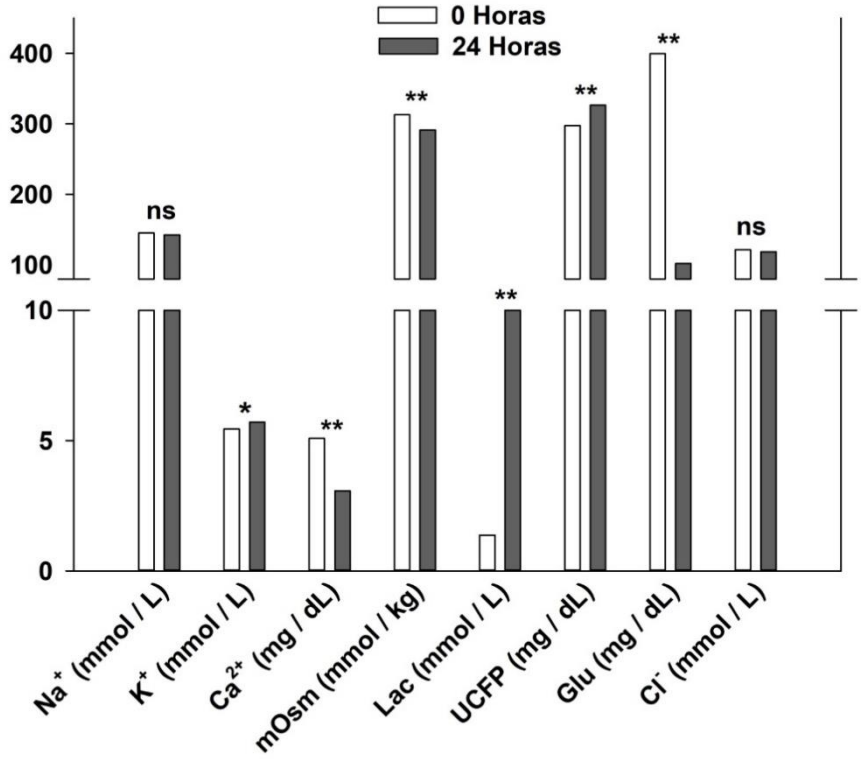
Parâmetros bioquímicos	Média ± Desvio Padrão		
	Controle	Baixa Concentração	Alta Concentração
Na^+ (mmol/L)	145,06 ± 14,00	142,63 ± 13,68	140,49 ± 16,25
K^+ (mmol/L)	5,75 ± 0,74	5,64 ± 0,67	5,73 ± 0,47
Ca^{2+} (mg/dL)	3,13 ± 0,42	3,10 ± 0,43	2,99 ± 0,49
mOsm (mmol/kg)	295,77 ± 27,68	290,91 ± 26,98	286,99 ± 32,61
Lac (mmol/L)	19,69 ± 3,38	17,45 ± 2,65	17,55 ± 2,36
UCFP (mg/dL)	332,58 ± 33,02	325,58 ± 27,71	321,54 ± 24,62
Glu (mg/dL)	99,30 ± 23,20	98,70 ± 23,41	108,00 ± 28,01
Cl (mmol/L)	119,60 ± 18,38	116,44 ± 19,30	120,10 ± 15,41

Fonte: o próprio autor.

Diferença significativa para os parâmetros de homeostasia celular foi observada apenas no tempo de exposição do tecido ao meio, independente da concentração da micotoxina. Para o íon sódio - Na^+ (zero hora: 145,426 ± 0,761 mmol/L; 24 horas: 142,726 ± 14,298 mmol/L) e o íon cloro - Cl^- (zero hora: 121,520 ± 0,865 mmol/L; 24 horas: 118,715 ± 17,229 mmol/L) não houve diferença significativa ($p>0,05$) (Figura 11).

Já para os íons potássio (zero hora: 5,440 ± 0,052 mmol/L; 24 horas: 5,708 ± 0,615 mmol/L; $p\leq0,05$) e cálcio (zero hora: 5,082 ± 0,066 mg/dL; 24 horas: 3,073 ± 0,436 mg/dL; $p\leq0,01$), na osmolalidade (zero hora: 313,020 ± 1,650 mmol/kg; 24 horas: 291,223 ± 28,412 mmol/kg; $p\leq0,01$), dosagem de lactato (zero hora: 1,368 ± 0,148 mmol/L; 24 horas: 18,230 ± 2,925 mmol/L; $p\leq0,01$), UCFP (teste de determinação quantitativa de proteína total) (zero hora: 297,410 ± 22,502 mg/dL; 24 horas: 326,567 ± 24,47 mg/dL 9; $p\leq0,01$) e no nível de glicose (zero hora: 399,700 ± 2,184 mg/dL; 24 horas: 102,000 ± 24,479 mg/dL; $p\leq0,01$), houve diferença significativa nos níveis mencionados (Figura 11).

Figura 11 – Análises bioquímicas do meio de cultivo realizadas antes e após 24 horas de cultivo dos explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro. Valores expressos pela média. Separação de médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Na^+: íon sódio. K^+: íon potássio. Ca^{2+}: íon cálcio. mOsm: osmolalidade. Lac: Lactato. UCFP: teste de determinação quantitativa de proteína total. Glu: Glicose. Cl^-: Cloro.



Fonte: o próprio autor. **Legenda:** * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

6.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi verificado que o metabólito α-Zol induziu alterações histológicas e do balanço redox em explantes uterinos de cadelas em fase estral de diestro. A toxicidade reprodutiva induzida pela zearalenona (ZEA) foi descrita em diferentes espécies (ALSHANNAQ; YU, 2017; GAJECKA et al., 2012; STOPA et al., 2014). O processo de detoxificação da ZEA resulta na produção de metabólitos com maior toxicidade como α-Zol (JANIK et al., 2020). Apesar da biotransformação de ZEA em seus metabólitos ser um processo biológico multifatorial, o que dificulta a predição exata de sua derivação em α ou β Zol, estudos demonstram que há maior biotransformação de ZEA em α-Zol (KNUTSEN et al., 2017) sendo este o principal metabólito encontrado em cães (GAJĘCKA et al., 2013).

No entanto, a legislação determina limites máximos toleráveis apenas para ZEA (ABINPET, 2024), tornando-se assim difícil a determinação da equivalência entre ZEA e seus metabólitos. No presente estudo, foi possível evidenciar que a presença do α-Zol

diretamente no tecido uterino de cadelas induziu alterações histológicas e oxidativas.

Neste estudo, ambas as concentrações de α-Zol induziram alterações no endométrio e interstício de cadelas. Vacuolização citoplasmática e apoptose foram os principais achados nas células epiteliais, sendo que edema foi frequentemente observado no interstício. Em um estudo *in vivo* com cadelas que receberam por via oral a dose diária de 0,5 μg e 0,75μg/kg de ZEA/kg de peso corporal por 42 dias, observou-se hiperplasia glandular do endométrio, angiogênese e vasodilatação, sendo mais evidentes no grupo que recebeu a dose baixa (STOPA et al., 2014).

Apesar do pouco tempo de incubação (24 horas), ocorreram alterações degenerativas leves, como o edema intersticial. É importante ressaltarmos que esses achados se deram no grupo controle, fato este, possivelmente associado a um grau relativo de hipóxia durante a cultura dos explantes. Tal ocorrência foi comumente observada em estudo com método similar em tecido ovariano (GEREZ; DESTO; BRACARENSE, 2017).

Embora tenhamos mensurado a espessura do epitélio de revestimento e glandular, não ocorreram alterações entre os tratamentos, porém Stopa et al. (2014) utilizaram o parâmetro por meio da pesagem das porções uterinas e mensuração da altura e espessura das pregas da mucosa endometrial e encontraram hiperestrogenismo induzido por ZEA em ambos os grupos experimentais com alterações morfométricas específicas de diferentes intensidades. O interessante é que a exposição a doses mais baixas levou a um maior aumento nas características morfométricas, provavelmente provocado por um maior efeito proliferativo de uma dose mais baixa. É importante ressaltarmos que tais divergências observadas entre os dois estudos podem ter ocorrido por utilização de diferentes metodologias.

Baixas doses de ZEA administradas por via oral em leitoas sexualmente imaturas também induziram alterações na morfologia uterina, pois estimularam a hiperplasia de quase todos os tecidos da parede uterina, além de hiperestrogenismo experimental (GAJECKA et al., 2012). Essas disparidades podem ser explicadas pelos diferentes modelos empregados em cada estudo (*in vivo* e cultura de explante), no que diz respeito ao método e tempo de exposição à toxina, seja por meio da dieta consumida ou pelo meio de cultura utilizado, visto que quando a micotoxina ZEA é ingerida pelo animal ela passa por diferentes tecidos, como por exemplo o trato gastrointestinal e hepatócitos onde é metabolizada e pode ter seu efeito alterado (ROGOWSKA et al., 2019).

O aumento nas concentrações de estrogênio promove a proliferação das células estromais, o crescimento dos ductos glandulares e das artérias espirais. Isso resulta em um aumento da espessura do endométrio, levando à restauração do epitélio glandular que

reveste a cavidade uterina e ao aumento do peso uterino em cadelas pré-púberes (STOPA et al., 2014). O aumento da espessura do epitélio de revestimento e glandular no estudo atual provavelmente não foi observado devido ao tempo de 24 horas de incubação do explante uterino com o α-Zol ou pelo tipo de mensuração realizada no endométrio.

Durante a fase lútea do ciclo estral a progesterona é capaz de modular a geração de ERO, que por sua vez apresenta certa correlação com atividades da SOD e níveis de progesterona. Um aumento nas defesas antioxidantes ovarianas ocorre com o intuito de preservar a atividade do corpo lúteo. Os efeitos luteolíticos podem ser explicados, em partes, pela redução da atividade da SOD e o aumento das ERO (RIZZO et al., 2012).

A principal via que inicia o processo de toxicidade causada pela ZEA é o dano oxidativo. ZEA desencadeou a formação de estresse oxidativo e lesões no DNA tanto em estudos realizados em laboratório quanto em organismos vivos (RAI; DAS; TRIPATHI, 2020). As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem induzir a destruição de proteínas por meio da oxidação de grupamentos sulfidril, que foi detectado por meio do método de carbonilação de proteínas (REZNICK; PACKER, 1994). O dano oxidativo foi evidenciado por meio do aumento da proteína carbonílica e aumento dos produtos da lipoperoxidação. nos resultados encontrados no presente estudo, que indica a presença de ERO nos explantes uterinos.

O aumento encontrado na produção de carbonilação de proteínas no tratamento com a maior concentração de α-Zol, também foi encontrado por Salem et al. (2016), porém, em tecido cardíaco de camundongos. Demonstrando assim, uma possível correlação entre a micotoxina e a carbonilação de proteínas, resultando em danos permanentes, como a perda de função de certas proteínas, causando danos irreparáveis em células e tecidos, bem como, auxiliar nas alterações da fertilidade (LU et al., 2018).

Ambos os tratamentos com o α-Zol resultaram na oxidação dos lipídeos de membranas, sugerindo um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e a geração de ERO em membranas plasmáticas. Esses achados corroboram com a literatura, indicando que a micotoxina ZEA impacta negativamente na integridade do DNA, nas mitocôndrias, reduz a proliferação celular, influencia a resposta inflamatória e aumenta a peroxidação lipídica (DA SILVA; BRACARENSE; OSWALD, 2018; MARIN et al., 2013). A lipoperoxidação pode comprometer a integridade das membranas celulares, compostas por bicamadas fosfolipídicas, afetando principalmente sua permeabilidade. Esses efeitos genotóxicos e citotóxicos são atribuídos ao estresse oxidativo, induzido pela ZEA, que pode desencadear apoptose e modular a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (DA SILVA; BRACARENSE; OSWALD, 2018).

No estudo atual não houve alteração na atividade da enzima SOD na presença da micotoxina e consequentemente os mecanismos de defesas antioxidantes se mantiveram funcionais, diferente do estudo de Salem et al. (2016) que demonstrou aumento significativo dos níveis de SOD nos grupos tratados com a ZEA.

Um leve consumo de GST foi observado no grupo com alta concentração do α-Zol, o que neutralizou a cadeia de oxidação e impediu a formação de MDA. Tal fato pode ser explicado pelo desbalanço hormonal possivelmente causado pela ação da micotoxina, e não apenas pelos elevados níveis de progesterona encontrados na fase de diestro que por si só poderia exercer um efeito antioxidante e imunossupressor (RIZZO et al., 2009).

Sabe-se que a regulação hormonal dos processos reprodutivos específicos das cadelas, que envolve períodos longos de ação da progesterona e prolactina e alta sensibilidade aos estímulos estrogênicos endógenos e/ou exógenos (CONCANNON, 2011), desempenham uma função significativa na etiopatogenia de grande parte das afecções reprodutivas que se desenvolvem na fase estral de diestro (QUEIROGA et al., 2009). A presença de ZEA, ainda que em doses muito baixas, podem atuar como desreguladores endócrinos em relação à progesterona e ao 17β-estradiol em cadelas (GAJĘCKA et al., 2013). No estudo de Gajecka et al (2008) a dose mais baixa de ZEA causou alterações nas concentrações hormonais de estrógeno e progesterona, de modo que os valores foram semelhantes aos observados na hiperplasia endometrial cística. Já a dose mais alta de ZEA levou à condição hormonal comumente observada na piometra espontânea. Esses estudos ressaltam a importância de se realizar mais pesquisas sobre o impacto das micotoxinas na fase de diestro do ciclo estral.

Ao extrapolarmos os resultados, alguns autores sugerem que o consumo de alimentos contendo milho, pode estar associado a um aumento na incidência de puberdade precoce em crianças. O estudo de Massart et al. (2008) demonstrou elevados níveis de ZEA no sangue de crianças acometidas. Considerando que o milho e seus derivados têm uma maior probabilidade de contaminação por ZEA, esta substância pode ser uma das causas potenciais da puberdade precoce (MASSART et al., 2008). Além disso, a presença de ZEA já foi detectada no endométrio de mulheres com distúrbios reprodutivos, indicando uma possível relação com efeitos estrogênicos (RAI; DAS; TRIPATHI, 2020).

Neste estudo foi possível constatar que o meio de cultivo foi efetivo, pois houve consumo de glicose e produção de ácido lático (observado pelo aumento do lactato) independentemente dos explantes uterinos estarem expostos ou não ao α-Zol. Tais alterações são previsíveis no contexto *ex vivo*, uma vez que as amostras de tecido são expostas a uma condição de hipoxia relativa (BASSO; BRACARENSE, 2013).

Por fim, este estudo evidencia que o modelo *ex vivo* de explantes uterinos foi adequado para avaliar a toxicidade do metabólito, promovendo a ética na pesquisa animal e aderindo aos princípios dos 3R's: substituição (*replace*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*). Entretanto, ainda não há um método integralmente substitutivo ao uso de animais em pesquisas (DOKE; DHAWALE, 2015; TEIXEIRA; DUTRA, 2020).

6.5 CONCLUSÃO

Foi constatado que a menor concentração do metabólito α-Zol (0,68 μM) causou toxicidade nos explantes uterinos, fato este constatado por meio de alterações histológicas, incluindo distúrbios na morfologia tecidual e possíveis danos celulares. Adicionalmente, houve alteração no estado redox nos explantes expostos ao metabólito, sugerindo um desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a formação de radicais livres, ampliando o entendimento da toxicidade do metabólito no tecido uterino. Visto os danos causados pelo metabólito, se faz necessário uma legislação que controle os níveis de micotoxinas nas fontes de alimentação animal. Além disso, o método de cultivo *ex vivo* se mostrou viável para a realização de diversas análises no tecido uterino de cadelas.

6.6 REFERÊNCIAS

ABINPET. **MANUAL PET FOOD BRASIL 11ed - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**, 2024.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 1–20, 2017.

BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Explantes teciduais: Um modelo redescoberto na experimentação animal. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 34, n. 6 SUPPL. 2, p. 3951–3958, 2013.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 200–210, 2011.

CRUZ, M. F. R. et al. Avaliação comparativa de quatro protocolos analgésicos para controle da dor no período pós-operatório de gatas submetidas à ovariohisterectomia eletiva. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 4, p. 4011, 2024.

DA SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. L.; OSWALD, I. P. Mycotoxins and oxidative stress: Where are we? **World Mycotoxin Journal**, v. 11, n. 1, p. 113–133, 2018.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 4, p. 353–363, 1993.

GAJĘCKA, M. et al. INFLUENCE OF LONG-TERM ZEARALENONE INTOXICATION ON THE CONCENTRATION OF PROGESTERONE AND 17β-OESTRADIOL IN BLOOD PLASMA IN BITCHES. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 405–409, 2008.

GAJECKA, M. et al. The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 6, p. 537–542, 2012.

GAJĘCKA, M. et al. The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17β-estradiol concentrations in peripheral blood and body weights of pre-pubertal female Beagle dogs. **Toxicon**, v. 76, p. 260–269, 2013.

GEREZ, J. R.; DESTO, S. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Deoxynivalenol induces toxic effects in the ovaries of pigs: An ex vivo approach. **Theriogenology**, v. 90, p. 94–100, 2017.

GRANDI, M. et al. Occurrence of Mycotoxins in Extruded Commercial Cat Food. **ACS Omega**, v. 4, n. 9, p. 14004–14012, 2019.

GUTTERIDGE, J. M. C. Aspects to Consider When Detecting and Measuring Lipid Peroxidation. **Free Radical Research Communications**, v. 1, n. 3, p. 173–184, 1986.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HEDLUND, C. S. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital. Em: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. Elsevier, 2008. 3. ed. p. 702–774.

HOU, Y. J. et al. Mycotoxin-Containing Diet Causes Oxidative Stress in the Mouse. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–7, 2013.

JANIK, E. et al. Molecular aspects of mycotoxins—A serious problem for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1–21, 2020.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice

Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–319, 1976.

KNUTSEN, H. K. et al. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p. 1–123, 2017.

KUSTRITZ, M. V. R. Vaginal Cytology in the Bitch and Queen. Em: SHARKEY, L. C.; RADIN, M. J.; SEELIG, D. (Eds.). **Veterinary Cytology**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2020. v. 1p. 552–558.

LIU, X. et al. Zearalenone induces oxidative stress and autophagy in goat Sertoli cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 252, 2023.

LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.

MARIN, D. E. et al. Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 408–415, 2013.

MASSART, F. et al. High Growth Rate of Girls with Precocious Puberty Exposed to Estrogenic Mycotoxins. **Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 5, p. 690–695, 2008.

QUEIROGA, F. L. et al. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, n. 1–2, p. 9–13, 2009.

RAI, A.; DAS, M.; TRIPATHI, A. **Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone**. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**Taylor and Francis Inc., 2020.

RECKERS, F. et al. Canine Vaginal Cytology: A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1–10, 2022.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. Em: **Methods in Enzimology**. New York, v. 233p. 357–363.

RIZZO, A. et al. Serum levels of reactive oxygen species (ROS) in the bitch. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 31, n. 2, p. 310–313, 2009.

RIZZO, A. et al. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344–352, 2012.

ROGOWSKA, A. et al. A study of zearalenone biosorption and metabolisation by prokaryotic and eukaryotic cells. **Toxicon**, v. 169, p. 81–90, 2019.

ROPEJKO, K.; TWARUŻEK, M. Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity. **Toxins**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2021.

SALEM, I. BEN et al. Zearalenone-induced changes in biochemical parameters, oxidative stress and apoptosis in cardiac tissue. **Human and Experimental Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 623–634, 2016.

STOPA, E. et al. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches. **Theriogenology**, v. 82, n. 4, p. 537–545, 2014.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497–500, 1988.

TEIXEIRA, T. C. N.; DUTRA, L. M. C. Uma discussão ética-normativa acerca dos testes laboratoriais em animais não-humanos. **Unisanta Law and Social Science**, v. 9, p. 1–17, 2020.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mestrado pelo programa de pós-graduação em ciência animal representou dois anos intensos de desafios e aprendizados no âmbito da pesquisa científica. Aceitar e superar tais desafios contribuiu significativamente para o meu crescimento pessoal, profissional e como pesquisadora.

Durante a execução do experimento, pude constatar que a realização deste projeto de mestrado não seria possível sem uma equipe coesa. Foi imprescindível contar com a colaboração de profissionais de diferentes laboratórios e departamentos do hospital veterinário.

Inicialmente, para obter o número necessário de cadelas na fase de diestro do ciclo estral, foi fundamental divulgar o projeto por meio das redes sociais. Esse apelo gerou um número significativo de pessoas interessadas. Procedíamos com uma série de questionamentos para identificar em qual fase do ciclo estral as cadelas estavam e agendava uma avaliação para confirmar as informações fornecidas pelos tutores. Muitas vezes, os tutores mencionavam que a cadela estava no cio recentemente, para se qualificar para a cirurgia a um preço reduzido, mas durante a avaliação clínica e exames complementares descobríamos que era mentira, impossibilitando a inclusão destas no projeto.

Na etapa cirúrgica, nosso grupo de pesquisa era dividido em dois subgrupos distintos: um encarregado pela cirurgia propriamente dita e outro responsável pela preparação simultânea do meio de cultivo. Essa divisão permitiu que, assim que o útero fosse removido, pudesse ser imediatamente levado ao laboratório de anatomia patológica para a obtenção dos explantes e o início da incubação.

Enfim, o sucesso desse projeto só foi possível graças ao apoio e ao envolvimento de todos os membros da equipe, que contribuíram com organização e padronização ao longo de todo o período experimental.

Limitações e dificuldades:

1. No início do projeto, muitos úteros foram descartados devido à presença de hematomas no endométrio, evidenciados após a abertura dos cornos uterinos. Inicialmente, pensei que essas alterações fossem específicas de algumas

cadelas, mas ao longo do desenvolvimento do projeto, observei que a incidência de hematomas variava conforme o cirurgião ou a necessidade de manipulação durante o procedimento. Notei uma tendência de ocorrência mais acentuada de hematomas no corno uterino direito, o que é compreensível, dado que a exposição do ovário direito é mais desafiadora devido à sua localização mais cranial em relação ao lado oposto. Como resultado, alguns meses após o início do experimento, foi necessário descartar os primeiros úteros e adotar uma padronização no procedimento cirúrgico, além de solicitar a presença de um auxiliar treinado para minimizar a manipulação dos cornos uterinos.

2. O tamanho do útero também se mostrou uma limitação, especialmente em cadelas de porte muito pequeno que já estavam no final da fase de diestro. Nestes casos, era extremamente difícil ou até mesmo impossível obter o número necessário de explantes para todos os tratamentos.
3. Algumas cadelas, geralmente as mais idosas, apresentavam alterações uterinas que só eram evidenciadas após a abertura dos cornos uterinos, como a presença de neoplasias, hiperplasia endometrial cística, mucometra e até piometra subclínica.
4. O tempo limitado do mestrado dificultou a realização de todas as análises desejadas. O primeiro ano foi dedicado ao cumprimento dos créditos exigidos pelo programa e à aprendizagem das técnicas necessárias para o cultivo de explantes, processamento das amostras e padronização do método. Já no segundo ano, ao iniciar o projeto com a exposição dos explantes ao metabólito α-Zol, enfrentamos dificuldades para encontrar cadelas na fase estral desejada, além das limitações mencionadas anteriormente que fez com que atrasasse a realização de todas as análises.

ANEXOS

Anexo 1. Quadro de análise de variância para a variável escore lesional.

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	3	976,63	325,54	23,124	0,000
Erro	36	506,82	14,08		
Total	39	1483,45			
Média Geral	10,94		n= 40		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle 0 horas, controle 24 horas, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 2. Quadro de análise de variância para a variável avaliação da morfometria uterina no epitélio glandular.

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	3	2,99	0,99	0,202	0,8944
Erro	36	177,80	4,94		
Total	39	180,79			
Média Geral	12,23		n= 40		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle 0 horas, controle 24 horas, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 3. Quadro de análise de variância para a variável avaliação da morfometria uterina no epitélio de revestimento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	3	16,82	5,61	0,673	0,5745
Erro	36	300,05	8,33		
Total	39	316,87			
Média Geral	11,84		n= 40		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle 0 horas, controle 24 horas, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 4. Quadro de análise de variância para a variável estresse oxidativo proteína carbonílica.

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	2	1,716	0,858	33,922	0,0000
Erro	27	0,683	0,025		
Total	29	2,399			
Média Geral	1,164		n= 30		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 5. Quadro de análise de variância para a variável estresse oxidativo lipoperoxidação (TBARS).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	2	0,084	0,042	5,582	0,0094
Erro	27	0,205	0,008		
Total	29	2,40			
Média Geral	0,693		n= 30		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 6. Quadro de análise de variância para a variável estresse oxidativo malonaldeido (MDA).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	2	0,000001	$7,35^{\wedge}10^{-7}$	0,212	0,8103
Erro	27	0,000094	0,000003		
Total	29	0,00095			
Média Geral	0,084		n= 30		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 7. Quadro de análise de variância para a variável capacidade antioxidante superóxido desmutase (SOD).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	2	0,000005	0,000003	0,313	0,7347
Erro	21	0,000179	0,000009		
Total	23	0,00184			
Média Geral	0,029		n= 24		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 8. Quadro de análise de variância para a variável capacidade antioxidante catalase (CAT).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	2	0,000114	0,000057	0,180	0,8364
Erro	21	0,006650	0,000317		
Total	23	0,00184			
Média Geral	0,068		n= 24		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 9. Quadro de análise de variância para a variável capacidade antioxidante FRAP.

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	2	0,000075	0,000038	0,734	0,4917
Erro	21	0,001075	0,000051		
Total	23	0,001150			
Média Geral	0,099		n= 24		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Tratamentos: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol.

Anexo 10. Quadro de análise de Kruskal-Wallis para a variável Glutationa (GST).

Grupo	n	Perd.	Mediana	25%	75%
Controle	8	0	0,0181	0,0176	0,02
Alta concentração	8	0	0,0049	0,00471	0,00496
Baixa concentração	8	0	0,00916	0,0088	0,00986

n: número de observações. Perd.: dados perdidos. 25%: percentil 25% (1º quartil). 75%: percentil 75% (3º quartil).

Anexo 11. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável sódio (Na^+).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	417,417	208,709	0,262	0,7708
Tempo	1	2265,4157	2265,416	2,839	0,0978
Dose*Tempo	2	417,417	208,709	0,262	0,7708
Erro	54	43087,746	797,921		
Total	59	46187,9959			
Média Geral	139,28		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 12. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável potássio (K^+).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	0,037	0,019	0,092	0,9125
Tempo	1	1,074	1,075	5,284	0,0254
Dose*Tempo	2	0,037	0,018	0,092	0,9125
Erro	54	10,983	0,203		
Total	59	12,132			
Média Geral	5,574		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 13. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável potássio (Ca^{++}).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	0,054	0,027	0,265	0,7682
Tempo	1	60,521	60,521	590,292	0,0000
Dose*Tempo	2	0,054	0,027	0,265	0,7682
Erro	54	5,536	0,103		
Total	59	66,166			
Média Geral	4,078		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 14. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável osmolalidade (mOsm).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	1808,776	904,388	0,274	0,7611
Tempo	1	25651,473	25651,473	7,782	0,0073
Dose*Tempo	2	1808,776	904,388	0,274	0,7611
Erro	54	177998,382	3296,266		
Total	59	207267,407			
Média Geral	292,343		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 15. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável lactato (Lac).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	15,904	7,952	1,979	0,1418
Tempo	1	4264,906	4564,906	1061,255	0,0000
Dose*Tempo	2	15,904	7,952	1,979	0,1418
Erro	54	217,012	4,019		
Total	59	207267,407			
Média Geral	9,799		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 16. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável micro proteína total (UCFP).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	312,005	156,003	0,229	0,7965
Tempo	1	12751,668	12751,668	18,680	0,0001
Dose*Tempo	2	312,005	156,003	0,229	0,7965
Erro	54	36862,283	682,635		
Total	59	50237,961			
Média Geral	311,988		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 17. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável glicose (GLU).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	270,90	135,45	0,431	0,6521
Tempo	1	1329379,35	1329379,35	4229,078	0,0000
Dose*Tempo	2	270,90	135,45	0,431	0,6521
Erro	54	16974,50	314,343		
Total	59	1346895,65			
Média Geral	250,85		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 18. Quadro de análise de variância para a análise bioquímica, variável cloro (Cl^-).

FV	GL	SQ	QM	Fc	p-valor
Dose	2	755,633	377,816	0,983	0,3808
Tempo	1	670,673	670,673	1,745	0,1921
Dose*Tempo	2	755,633	377,816	0,983	0,3808
Erro	54	20754,608	384,345		
Total	59	22936,5473			
Média Geral	118,177		n= 60		

FV: Fonte de variação. GL: Graus de liberdade. SQ: Soma de quadrados. QM: Quadrado média. Fc: F calculado. Dose: Controle, baixa concentração de a-Zol e alta concentração de a-Zol. Tempo: 0 e 24 horas. Dose*Tempo: Interação do fator dose com o fator tempo.

Anexo 19. Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos do sobrenadante do meio de cultivo nos tempos zero e 24 horas.

Parâmetros bioquímicos	Zero hora		24 horas	
	Média	Desv. Pad.	Média	Desv. Pad.
Na^+ (mmol/L)	145,426	0,7609	142,726	14,2979
K^+ (mmol/L)	5,44	0,0517	5,7077	0,6153
Ca^{2+} (mg/dL)	5,082	0,0660	3,0733	0,4362
mOsm (mmol/kg)	313,02	1,65	291,2297	28,4117
Lac (mmol/L)	1,368	0,1475	18,23	2,9254
UCFP (mg/dL)	297,41	22,502	326,5667	25,1732
Glu (mg/dL)	399,7	2,1838	102	24,4794
Cl (mmol/L)	121,52	0,8652	118,7147	17,2288

Fonte: o próprio autor. **Legenda:** Desv. Pad: Desvio padrão.