

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE

**Avaliação da eficácia de aditivo anti-micotoxina
através de análise morfométrica e histopatológica
do trato reprodutivo de leitoas e de leitões pré-
púberes experimentalmente intoxicados por
zearalenona**

Danielle Fabião Gomes Moreira Leitão

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ADITIVO ANTI-MICOTOXINA ATRAVÉS DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA E HISTOPATOLÓGICA DO TRATO REPRODUTIVO DE LEITOAS E DE LEITÕES PRÉ-PÚBERES EXPERIMENTALMENTE INTOXICADOS POR ZEARALENONA

DANIELLE FABIÃO GOMES MOREIRA LEITÃO

Sob a Orientação do Professor

Carlos Alberto da Rocha Rosa

E Co-Orientação dos Professores

Kelly Moura Keller

e

Roberto Maurício Carvalho Guedes

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L533a Leitão, Danielle Fabião Gomes Moreira, 1988-
Avaliação da eficácia de aditivo anti-micotoxina
através de análise morfométrica e histopatológica do
trato reprodutivo de leitoas e de leitões pré-púberes
experimentalmente intoxicados por zearalenona /
Danielle Fabião Gomes Moreira Leitão. - 2017.
90 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.
Coorientadora: Kelly Moura Keller.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2017.

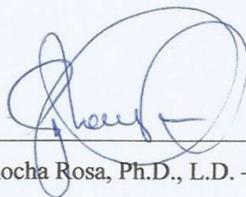
1. Micotoxinas. 2. Adsorvente. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Suínos. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-, orient. II. Keller, Kelly Moura, 1981, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

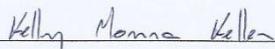
DANIELLE FABIÃO GOMES MOREIRA LEITÃO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinárias**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

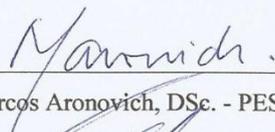
TESE APROVADA EM 21/02/2017



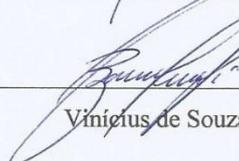
Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D., L.D. – UFRRJ
(Orientador)



Kelly Moura Keller, DSc. - UFMG
(Co-Orientadora)

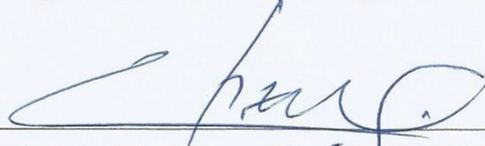


Marcos Aronovich, DSc. - PESAGRO-RIO



Vinícius de Souza Cantarelli, DSc. - UFLA

Eulógio Carlos de Queiroz Carvalho, DSc. – UENF



Airton Antônio Castagna, DSc. – PESAGRO-RIO

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Setor de Suinocultura da UFRRJ, Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO) e Phileo Lesaffre Animal Care Ltda.

RESUMO

LEITÃO, Danielle Fabião Gomes Moreira. **Avaliação da eficácia de aditivo anti-micotoxina através de análise morfométrica e histopatológica do trato reprodutivo de leitoas e de leitões pré-púberes experimentalmente intoxicados por zearalenona.** 2017. 90 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina que causa uma série de problemas de ordem reprodutiva, estando relacionada ao hiperestrogenismo em leitoas. Medidas preventivas que impeçam o crescimento fúngico nem sempre são eficientes, sendo necessário o uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM), que são produtos adicionados à ração, capazes de adsorver, biotransformar ou neutralizar as micotoxinas, impedindo o desenvolvimento da micotoxicose. A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* virou foco de inúmeros estudos, sendo utilizada como AAM, pois possui alta capacidade de ligação, e de adsorção às micotoxinas. Tendo em vista tais considerações, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da zearalenona sobre parâmetros bioquímicos séricos, e parâmetros histopatológicos e morfométricos do trato reprodutivo de leitoas e leitões pré-púberes intoxicadas experimentalmente com diferentes doses desta micotoxina e assim, avaliar a eficácia do aditivo anti-micotoxina à base de parede celular de leveduras na prevenção da micotoxicose. O período experimental foi de 21 dias. Foram utilizados oito leitões pré-púberes, cujas dietas apresentaram quatro níveis de inclusão de ZEA (0,0; 0,25; 0,6 e 2,0 mg Kg⁻¹ ou ppm). Foram realizadas análises morfométricas de comprimento e largura dos testículos. E ainda, foram realizadas mensurações histológicas nos testículos, e avaliações histopatológicas do: testículo direito e esquerdo, epidídimo direito e esquerdo (cabeça, corpo e cauda), ducto deferente direito e esquerdo, próstata, glândula bulbouretral e vesícula seminal, e análise da bioquímica sérica. Foram também utilizadas 48 leitoas pré-púberes, cujas dietas apresentaram dois níveis de inclusão de aditivo anti-micotoxina (AAM) (0,0 e 0,2%) e três níveis de inclusão de ZEA (0,25; 0,6 e 2,0 mg Kg⁻¹ ou ppm), sendo realizadas análises histomorfométricas da vagina proximal e distal, útero proximal, médio e distal, ovário direito e esquerdo e análises histopatológicas do fígado, rins e dos órgãos citados anteriormente, além de análise da bioquímica sérica. A inclusão de ZEA na dieta das leitoas interferiu nos índices normais da bioquímica sérica, como também provocou alterações histológicas dose dependentes nas duas porções da vagina e nas três porções uterinas, fígado e rins. Nos ovários também foram observadas alterações dose dependentes, ocorreu aumento no número de folículos atresícos, sendo que em leitoas que consumiram 2 ppm de ZEA foi observado escasso desenvolvimento folicular e abundante estroma de tecido conjuntivo. Com relação a histomorfometria, o efeito hiperestrogênico dose dependente foi pronunciado na vagina proximal, o mesmo não ocorreu nas três porções uterinas. A ZEA não interferiu na histomorfometria dos folículos ovarianos não atresícos. Não houveram alterações significativas na histomorfometria e na morfometria dos testículos dos leitões pré-púberes. Já na avaliação histopatológica dos órgãos reprodutores e glândulas acessórias dos leitões houve principalmente hiperemia dos vasos e infiltrado inflamatório nos animais que consumiram ZEA nas suas diferentes concentrações. A adição do AAM em questão nas dietas das leitoas contendo ZEA demonstrou ser uma alternativa para redução dos efeitos tóxicos desta micotoxina. As inclusões crescentes de ZEA na dieta de leitões pré-púberes não alteraram a morfometria e histomorfometria dos testículos. No entanto, causa alterações inespecíficas na estrutura histológica de órgãos do sistema reprodutor e glândulas acessórias. Mais trabalhos sobre este tema são necessários para definir claramente o papel da ZEA sobre histologia dos órgãos reprodutivos de machos suínos.

Palavras chaves: micotoxinas, adsorvente, *Saccharomyces cerevisiae*, suínos

ABSTRACT

LEITÃO, Danielle Fabião Gomes Moreira. **Evaluation of effectiveness of anti-mycotoxin additives through morphometric and histopathological analysis of the reproductive tract of male and female piglets experimentally intoxicated with zearalenone.** 2017. 90 p. Thesis (Doctor's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health) Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin that causes a lot of problems in the reproductive tract, being related to the hyperestrogenism in gilts. Preventive measures to prevent fungal growth are not always effective, the use of anti-mycotoxin additives (AMA), which are added to food products, capable of adsorbing, or neutralizing biotransform mycotoxins, preventing the development of mycotoxicosis are required. The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* has become the focus of numerous studies and is used as AMA, because it has high binding capacity, and adsorption of mycotoxins. The objective of this study was to analyze the effects of zearalenone on serum biochemical parameters and histopathological and morphometric parameters of the reproductive tract of pre-pubertal male and female piglets experimentally poisoned with different doses of this mycotoxin and to evaluate the effectiveness of the anti-mycotoxin additive made of yeast cell wall in the prevention of mycotoxicosis. The trial period had a total duration of 21 days. Eight pre-pubertal male piglets were used, whose diets presented four levels of ZEA (0.0, 0.25, 0.6 and 2.0 mg kg⁻¹ or ppm). Histomorphometric analyzes of the testis length and width were performed. Histological measurements were also performed on the testicles and histopathological evaluations of the right and left testicles, right and left (head, body and tail) epididymis, right and left deferent duct, prostate, bulbourethral gland and seminal vesicle, and biochemistry serum analysis. In addition, 48 prepubertal female piglets were used, whose diets presented two levels of inclusion of anti-mycotoxin additive (AMA) (0.0 and 0.2%) and three levels of ZEA (0.25; 0.6 and 2.0 mg kg⁻¹ or ppm). And still histomorphometric analyzes of the proximal vagina, distal vagina, proximal uterus, medial uterus, distal uterus, right and left ovary, and histopathological findings of the liver, kidneys and organs previously mentioned, and analysis of biochemistry serum. The inclusion of ZEA in gilts diet interfered with the normal levels of serum biochemistry, but also caused dose-dependent histological changes in the two portions of the vagina, in the three portions of uterus, liver and kidney. Dose-dependent alterations were also observed in the ovaries; there was an increase in the number of atretic, and gilts that consumed 2 ppm of ZEA, there was little follicular development and abundant connective tissue stroma. Regarding histomorphometry, the dose-dependent hyperestrogenic effect was pronounced in the proximal vagina, the same did not occur in the three portions of uterus. ZEA did not interfere in the histomorphometry of non-atretic ovarian follicles. There were no significant changes in the histomorphometry and morphometry of the testes of the prepubertal male piglets. In the histopathological evaluation of the reproductive organs and accessory glands of the male piglets there was mainly hyperemia of the vessels and inflammatory infiltrate in the animals that consumed ZEA in their different concentrations. The addition of the AAM in diets of female piglets experimentally intoxicated with zearalenone has been shown to be an alternative to reduce the toxic effects of this mycotoxin. Increasing inclusions of ZEA in the diet of prepubertal male piglets did not alter the morphometry and histomorphometry of the testis. More work in this theme is needed to clearly define the ZEA role on the reproductive organs histology of male pigs.

Key words: mycotoxins, adsorbents, *Saccharomyces cerevisiae*, swines

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Principais micotoxinas e espécies produtoras.....	7
Tabela 2:	Limites Máximos de Tolerância para ingredientes destinados à alimentação animal.....	9
Tabela 3:	Limites Máximos de Tolerância para ingredientes destinados à alimentação animal.....	10
Tabela 4:	Limites Máximos de Tolerância para rações destinadas à alimentação animal.....	10
Tabela 5:	Tricotecenos dos grupos A e B.....	13
Tabela 6:	Composição da dieta utilizada durante o período experimental (fase de creche).....	30
Tabela 7:	Classificação dos tipos de folículos.....	33
Tabela 8:	Efeito dos tratamentos sobre a bioquímica sérica das leitoas pré-púberes ao 21º dia de experimento.....	38
Tabela 9:	Efeito dos tratamentos sobre a histomorfometria do trato reprodutivo das leitoas.....	39
Tabela 10:	Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	44
Tabela 11:	Alterações histopatológicas observadas nos rins dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	46
Tabela 12:	Alterações histopatológicas observadas na vagina proximal dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	49
Tabela 13:	Alterações histopatológicas observadas na vagina distal dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	49
Tabela 14:	Alterações histopatológicas observadas no ovário direito e esquerdo dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	54
Tabela 15:	Alterações histopatológicas observadas no útero proximal, médio e distal dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.....	57
Tabela 16:	Efeito dos tratamentos sobre a bioquímica sérica dos leitões pré-púberes ao 21º dia de experimento.....	60
Tabela 17:	Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular direita (comprimento) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento.....	60
Tabela 18:	Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular esquerda (comprimento) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento.....	60
Tabela 19:	Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular direita (largura) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento.....	61
Tabela 20:	Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular esquerda (largura) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento.....	61
Tabela 21:	Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a espessura do epitélio dos túbulos seminíferos dos leitões ao 21º dia de experimento.....	62
Tabela 22:	Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a distância entre os túbulos seminíferos dos leitões ao 21º dia de experimento.....	62
Tabela 23:	Alterações histopatológicas observadas na vesícula seminal dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	63
Tabela 24:	Alterações histopatológicas observadas na glândula bulbouretral dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	63

Tabela 25:	Alterações histopatológicas observadas na próstata dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	63
Tabela 26:	Alterações histopatológicas observadas no testículo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	70
Tabela 27:	Alterações histopatológicas observadas no ducto deferente direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	72
Tabela 28:	Alterações histopatológicas observadas na cabeça do epidídimo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	74
Tabela 29:	Alterações histopatológicas observadas no corpo do epidídimo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	74
Tabela 30:	Alterações histopatológicas observadas na cauda do epidídimo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mercado mundial de carne suína (Mil toneladas).....	4
Figura 2:	Produção brasileira de carne suína (Mil toneladas).....	4
Figura 3:	Estados exportadores de carne suína em 2015.....	5
Figura 4:	Esclerócito, ou “esporão”.....	7
Figura 5:	Fatores que afetam a produção de micotoxinas.....	8
Figura 6:	Estrutura química da zearalenona.....	15
Figura 7:	Estrutura química do α -zearalenol.....	16
Figura 8:	Estrutura química do β -zearalenol.....	16
Figura 9:	Edema vulvar: a) leitoa pré-púbere do grupo controle (0,0 ppm de ZEA) e b) leitoa pré-púbere intoxicada com 0,25 ppm de ZEA.....	18
Figura 10:	Esquematização dos componentes da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Figura 11:	Relação entre os componentes de parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Figura 12:	Fluxograma do sistema de obtenção de parede celular de leveduras.....	24
Figura 13:	Galpão do ensaio <i>in vivo</i>	26
Figura 14:	<i>Fusarium graminearum</i> cultivado em placa de Petri.....	27
Figura 15:	Arroz com cultivo de <i>Fusarium graminearum</i>	27
Figura 16:	Esquematização da purificação do extrato contendo a micotoxina.....	28
Figura 17:	Misturador mecânico tipo “Y”.....	28
Figura 18:	Fêmeas alojadas nas baias.....	29
Figura 19:	Fotomicrografia da vagina proximal, para visualização da mucosa e da camada muscular. HE. 20x.....	32
Figura 20:	Fotomicrografia do folículo primário multilaminar, para visualização da mensuração do diâmetro oocitário. HE. 20x.....	33
Figura 21:	Machos alojados nas baias.....	34
Figura 22:	Biometria testicular, mensuração do comprimento e da largura do testículo.....	35
Figura 23:	Fotomicrografia do testículo direito, para visualização das mensurações das variáveis. HE. 20x.....	37
Figura 24:	Fotomicrografia do espaço porta do fígado das leitoas dos oito tratamentos: A-B - espaço porta com discreto infiltrado (seta), T01-T02; C - Hiperemia e infiltrado inflamatório no espaço porta (seta), disposição normal dos hepatócitos e espaço porta normal, T03; D - Hiperemia, infiltrado inflamatório no espaço porta, ectasia dos capilares sinusoides (seta), T04; E-F-G-H - Hiperemia, infiltrado inflamatório no espaço porta, ectasia dos capilares sinusoides, espessamento do espaço interlobular (seta), T05-T06-T07-T08. HE. 20x.....	44
Figura 25:	Fotomicrografia do córtex renal das leitoas dos oito tratamentos A-B - Túbulos renais e glomérulos sem particularidades, corpúsculo renal de tamanhos diferentes e glomérulos (seta), T01 e T02; C - Hiperemia, infiltrado linfoplasmocitário multifocal (seta), T03; D -	

	Infiltrado linfoplasmocitário multifocal (seta), T04; E - Infiltrado linfoplasmocitário multifocal, células tubulares degeneradas (seta), T05; F - Infiltrado linfoplasmocitário multifocal e aumento do espaço capsular, T06; G-H - Aumento da celularidade em tufo glomerular, infiltrado linfoplasmocitário na zona medular e cortical, hiperemia e fibrose, T07 e T08. HE. 20x.....	47
Figura 26:	Fotomicrografia da vagina proximal das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Epitélio, camada muscular e serosa sem particularidades, e camada submucosa superficial há um leve infiltrado linfoplasmocitário, T01-T02; C-D-F-G-H - Epitélio de revestimento exibe hiperplasia, camada submucosa há hiperemia e infiltrado linfoplasmocitário, T03-T04-T05-T06-T07-T08. HE. 4x.....	50
Figura 27:	Fotomicrografia da vagina distal das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Epitélio, camada muscular e serosa sem particularidades, e camada submucosa superficial há um leve infiltrado linfoplasmocitário, T01-T02 ; C - Epitélio de revestimento com hiperplasia, na camada submucosa há infiltrado linfoplasmocitário, camada muscular espessada e hiperêmia, T03, D - Epitélio de revestimento com hiperplasia, na camada submucosa há infiltrado linfoplasmocitário, camada muscular espessada, T04; E-F-G-H - epitélio de revestimento com hiperplasia, na camada submucosa há infiltrado linfoplasmocitário, camada muscular espessada e hiperemia, T06-T07. HE. 4x.....	52
Figura 28:	Fotomicrografia dos ovários das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Aspecto histológico habitual, com leve hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários, T01-T02; C - Hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários degenerados, T03; D - Hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários degenerados, T04; E-F - Hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários degenerados, T05 e T06; G-H - Abundante estroma de tecido conjuntivo e escasso desenvolvimento folicular, hiperemia dos vasos, T07-T08. HE. 4x.....	54
Figura 29:	Fotomicrografia do útero das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Aspecto histológico habitual com endométrio, miométrio e perimétrio sem particularidades, T01-T02; C - Endométrio com infiltrado linfoplasmocitário, hiperemia e glândulas com lúmen dilatados, T03; D - Endométrio com infiltrado linfoplasmocitário e hiperêmico, T04; E-F-G-H - Endométrio com infiltrado linfoplasmocitário, hiperemia e glândulas com lúmen dilatados, T05-T06-T07-T08. HE. 10x.....	57
Figura 30:	Fotomicrografia da vesícula seminal dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual com mucosa pregueada, e por vezes exibindo secreção eosinofílica na luz dos túbulos. A - controle negativo, hiperemia; B - ZEA 0,25 ppm, infiltrado linfoplasmocitário multifocal e hiperemia; C - ZEA 0,6 ppm, hiperemia; D - ZEA 2,0 ppm, hiperemia. HE.10X.....	64
Figura 31:	Fotomicrografia da glândula bulbouretral dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual exibindo epitélio	

- secretor. A - controle negativo, sem alterações; B - ZEA 0,25 ppm, infiltrado linfoplasmocitário em tecido adiposo periglandular; C - ZEA 0,6 ppm, hiperemia; D - ZEA 2,0 ppm, sem alterações. HE.10X..... 66
- Figura 32:** Fotomicrografia da próstata dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual por vezes exibindo secreção eosinofílica na luz dos túbulos: A - controle negativo, sem alterações. B - 0,25 ppm ZEA, hiperemia, infiltrado linfoplasmocitário e hemorragia multifocal no estroma fibromuscular; C - 0,6 ppm ZEA, hiperemia e infiltrado linfoplasmocitário no estroma fibromuscular; D - 2,0 ppm ZEA, hiperemia, infiltrado linfoplasmocitário próximo as trabéculas e pontos hemorrágicos. HE. 10X..... 68
- Figura 33:** Fotomicrografia dos testículos dos leitões dos quatro tratamentos com parênquima imaturo com presença de túbulos seminíferos em desenvolvimento e grande quantidade de células de Leydig no tecido intersticial, ausência de espermatogênese. A - controle negativo, vasos hiperêmicos; B - 0,25 ppm ZEA, vasos hiperêmicos; C - 0,6 ppm ZEA, vasos hiperêmicos; D - 2,0 ppm ZEA, vasos hiperêmicos. HE. 10X..... 70
- Figura 34:** Fotomicrografia dos ductos deferentes dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual exibindo epitélio pseudoestratificado e camada muscular espessada: A - controle negativo, sem alterações; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado linfoplasmocitário na submucosa e na serosa; C - 0,6 ppm ZEA, hiperemia dos vasos, infiltrado linfoplasmocitário na submucosa e na serosa; D - 2,0 ppm ZEA, hiperemia dos vasos, infiltrado linfoplasmocitário na submucosa e na serosa. HE. 10X..... 72
- Figura 35:** Fotomicrografia da cabeça do epidídimo dos leitões dos quatro tratamentos, túbulos epididimários de aspecto histológico habitual, exibindo na luz de poucos túbulos material eosinofílico e ausência de espermatozoides. A - controle negativo, sem alterações; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; C - 0,6 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; D - 2,0 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos. HE. 10X..... 75
- Figura 36:** Fotomicrografia do corpo do epidídimo dos leitões dos quatro tratamentos, túbulos epididimários de aspecto histológico habitual, exibindo na luz de poucos túbulos material eosinofílico e ausência de espermatozoides: A - controle negativo, sem alterações; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; C - 0,6 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; D - 2,0 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos. HE. 10x..... 77
- Figura 37:** Fotomicrografia da cauda do epidídimo dos leitões dos quatro tratamentos, túbulos epididimários de aspecto histológico habitual, exibindo na luz poucos túbulos de material eosinofílico e ausência de espermatozoides: A - controle negativo, infiltrado leucocitário

linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; C - 0,6 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; D - 2,0 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos. HE. 10x.....

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
AAM	Aditivo anti-micotoxina
BDA	Agar batata bextrose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina aminotransferase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DON	Deoxinivalenol
DAS	Diacetoxyscirpenol
DF	Diâmetro folicular
DO	Diâmetro oocitário
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FPM	Folículo primário multilaminar
FPU	Folículo primário unilaminar
FP	Folículo primordial
FDA	Food and Drug Administration
ALP	Fosfatase alcalina
FB₁	Fumonisina B ₁
GGT	Gama glutamiltransferase
LMT	Limites máximos tolerados
NPMM	Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas
OD	Ovário direito
OE	Ovário esquerdo
PCL	Parede celular de levedura
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PIB	Produto interno bruto
PSA	Projeto Sanidade Animal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UD	Útero distal
UM	Útero médio
UP	Útero proximal
VD	Vagina distal
VP	Vagina proximal
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hipótese	2
1.2 Objetivo Geral	2
1.3 Objetivos Específicos	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Suinocultura no Brasil	3
2.2 Micotoxinas	5
2.3 Micotoxinas na Suinocultura	10
2.3.1 Aflatoxinas	11
2.3.2 Ocratoxinas	12
2.3.3 Tricotecenos	13
2.3.4 Fumonisinias	14
2.3.5 Zearalenona	15
2.4 Aditivo Anti-Micotoxina	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Experimento I (Leitoas Pré-Púberes)	26
3.1.1 Local do experimento	26
3.1.2 Unidades experimentais	26
3.1.3 Produção do núcleo de contaminação por ZEA	26
3.1.4 Extração e quantificação da ZEA	27
3.1.5 Contaminação da ração experimental	28
3.1.6 Aditivo anti-micotoxina	28
3.1.7 Delineamento experimental	29
3.1.8 Manejo	29
3.1.9 Dieta	30
3.1.10 Abate	30
3.1.11 Processamento do material para exame histopatológico e histomorfométrico	30
3.1.12 Análises histopatológicas e histomorfométricas	31
3.1.13 Análises da bioquímica sérica	33
3.2 Experimento II (Leitões Pré-Púberes)	34
3.2.1 Local do experimento	34
3.2.2 Unidades experimentais	34
3.2.3 Ensaio <i>in vivo</i> com leitões pré-púberes	34
3.2.4 Delineamento experimental	34
3.2.5 Parâmetros analisados no experimento <i>in vivo</i>	35
3.2.6 Abate	35
3.2.7 Processamento do material para exame histopatológico e histomorfométrico	35
3.2.8 Análises histopatológicas	36
3.2.9 Análises histomorfométricas	36
3.2.10 Análises da bioquímica sérica	37
3.3 Análises Estatísticas	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

4.1 Resultados Experimento I (Leitoas Pré-Púberes)	38
4.1.1 Análises da bioquímica sérica	38
4.1.2 Análises histomorfométricas	39
4.1.3 Análises histopatológicas	44
4.2 Resultados Experimento II (Leitões Pré-Púberes)	59
4.2.1 Análises da bioquímica sérica	59
4.2.2 Análises histomorfométricas	60
4.2.3 Análises histopatológicas	63
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura possui grande importância para o agronegócio brasileiro, já que o nosso país atualmente possui destaque no ranking mundial de produção e exportação de carne suína. Sendo assim, qualquer fator que afete negativamente a produção, causa prejuízos em toda a cadeia produtiva.

Neste contexto, deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais de rações, fungos e micotoxinas, que acarretam perdas consideráveis às criações de suínos. Os fungos são decompositores naturais de matéria orgânica que utilizam diversos substratos como fonte de nutrientes para o seu metabolismo. Esses microrganismos estão presentes de forma natural no campo, a partir da colonização em grãos podem produzir micotoxinas.

As micotoxinas são compostos tóxicos, seu consumo provoca efeitos negativos a sanidade dos animais, como diminuição do ganho de peso, aumento da conversão alimentar e ainda, efeitos deletérios para órgãos e sistemas.

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium*, *F. graminearum* e *F. roseum*, sendo assim, esses fungos são espécies basílicas produtoras de ZEA. O arroz, o trigo, a cevada e, principalmente, o milho são os principais substratos, os quais a ZEA está presente. É fundamental destacar que a ZEA é responsável por provocar efeitos estrogênicos, pois sua estrutura molecular é similar a do estrógeno, se ligando nos receptores de estrogênio, causando hiperestrogenismo, principalmente, em fêmeas suínas. Machos suínos também podem apresentar alterações decorrentes do consumo de ZEA, como redução da libido e ligeira queda da qualidade espermática, interferindo nos parâmetros reprodutivos.

Vale ressaltar ainda, que existem poucas pesquisas sobre o impacto da ZEA no sistema reprodutivo dos machos, e os trabalhos disponíveis, na literatura, são contraditórios. As pesquisas que mostram alterações histopatológicas e morfométricas de cada segmento do trato reprodutivo de machos e fêmeas, bem como as alterações decorrentes de diferentes concentrações desta micotoxina, são praticamente escassas na literatura mundial.

As micotoxinas quando já produzidas não dificilmente retiradas do substrato, uma das formas de reduzir a biodisponibilidade das micotoxinas se dá através do uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM). Aditivos anti-micotoxinas são produtos incorporados nas dietas dos animais, capazes de se ligar as micotoxinas ainda no trato gastrointestinal, impedindo que sejam absorvidas.

Muitas substâncias são utilizadas com o AAM, a parede celular de leveduras (PCL) é um exemplo de substância enteroadsorvente. São utilizados cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, pois sua parede celular possui componentes capazes de adsorver as micotoxinas dos alimentos. A parede celular de *S. cerevisiae* é composta basicamente por β -glucanos, e manano-oligossacarídeos (MOS). As pesquisas mostram que existe um processo de adesão das micotoxinas aos componentes celulares da parede.

Diante do exposto, se torna evidente a necessidade de aprofundamento nos estudos das micotoxinas, tendo em vista que o consumo desses compostos provoca efeitos deletérios à saúde dos animais, afetando seu desempenho produtivo e reprodutivo. Além disso, também é necessário buscar novos AAM, que sejam altamente eficazes contra os efeitos tóxicos das micotoxinas, já que estas afetam consideravelmente a produção animal. E ainda, testar a eficácia de um produto com base nas alterações histopatológicas e morfométricas, causadas no principal sítio de ação desta micotoxina.

Desta forma, este estudo é essencial, considerando que não há dados específicos na literatura acerca dos efeitos doses dependentes de ZEA sobre os parâmetros de bioquímica sérica, bem como sobre os parâmetros histopatológicos e morfométricos do trato reprodutivo de leitoas e de leitões pré-púberes. Do mesmo modo, que não há estudos sobre a eficácia de produtos, originados a partir de uma nova cepa de levedura sobre diferentes concentrações de

ZEA, e dos parâmetros estudados, pois sua capacidade de adsorção varia em função da micotoxina e de sua concentração.

1.1 Hipótese

Alterações reprodutivas de leitoas e leitões pré-púberes intoxicados experimentalmente por ZEA são doses dependentes. E ainda, as alterações reprodutivas causadas pela ZEA são inibidas pela substância enteroadsorvente à base de parede celular de leveduras adicionada na ração animal, que reduz os efeitos da micotoxicose.

1.2 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da zearalenona sobre parâmetros bioquímicos séricos, e parâmetros histopatológicos e morfométricos do trato reprodutivo de leitoas e leitões pré-púberes intoxicadas experimentalmente com diferentes doses desta micotoxina e assim, avaliar a eficácia do aditivo anti-micotoxina à base de parede celular de leveduras na prevenção da micotoxicose.

1.3 Objetivos Específicos

- a) Realizar biometria testicular de leitões experimentalmente intoxicados com zearalenona;
- b) Avaliar as alterações histopatológicas dos testículos, glândulas acessórias, ducto deferente e das três porções epididimárias de leitões experimentalmente intoxicados pela zearalenona;
- c) Realizar análise histomorfométrica do testículo direito e esquerdo;
- d) Avaliar as alterações histopatológicas das duas porções da vagina, das três porções uterinas, ovários, fígado e rins de leitoas experimentalmente intoxicadas pela zearalenona;
- e) Realizar análise histomorfométrica das duas porções da vagina, das três porções uterinas, ovários, fígado e rins de leitoas experimentalmente intoxicadas pela zearalenona;
- f) Avaliar a bioquímica sérica destes animais;
- g) Correlacionar os resultados obtidos com as diferentes doses de zearalenona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suinocultura no Brasil

A carne suína é a mais consumida em todo o mundo, possui excelente fonte de proteínas, vitaminas (do complexo B, B₁, B₂, B₆, B₁₂), potássio, zinco e ferro, com sabor e textura única. As proteínas presentes na carne suína possuem alto valor biológico, que ajudam na renovação das fibras musculares do organismo do ser humano (BIERNATH, 2013).

A suinocultura no Brasil foi fundamentada em um sistema de criação extensivo, que tinha em torno de 100 raças próprias, originadas de países asiáticos e da Índia que se adaptaram muito bem ao clima tropical, com alta rusticidade e grande resistências às enfermidades. Os animais eram produzidos para a produção de banha, muito utilizada na conservação e no preparo de alimentos. Além disso, a criação de suínos de subsistência era muito predominante (FAGANELLO, 2016).

No entanto, a partir da metade do século XX, o plantel brasileiro se modificou, assim como o sistema de criação. Sendo assim, na década de 60 ocorreu a adoção do sistema de criação intensivo. Aos poucos, a produção de carne foi ganhando destaque, principalmente quando os óleos vegetais foram ganhando espaço na elaboração de alimentos e a refrigeração passou a substituir a banha na conservação (FAGANELLO, 2016).

Logo, o sistema de criação de suínos passou por grandes mudanças ao longo dos anos, e cresceu consideravelmente nas últimas décadas. Este crescimento ocorreu devido à introdução da suinocultura moderna, um sistema novo de produção com avanços nas áreas de genética, nutrição, produção e controle de enfermidades (LOPES, 2009). As mudanças na genética garantiram uma redução de 31% na gordura da carne, redução de 10% no colesterol e uma redução de 14% nas calorias, o que tornou a carne mais magra, nutritiva e saborosa (GASTARDELO e MELZ, 2014).

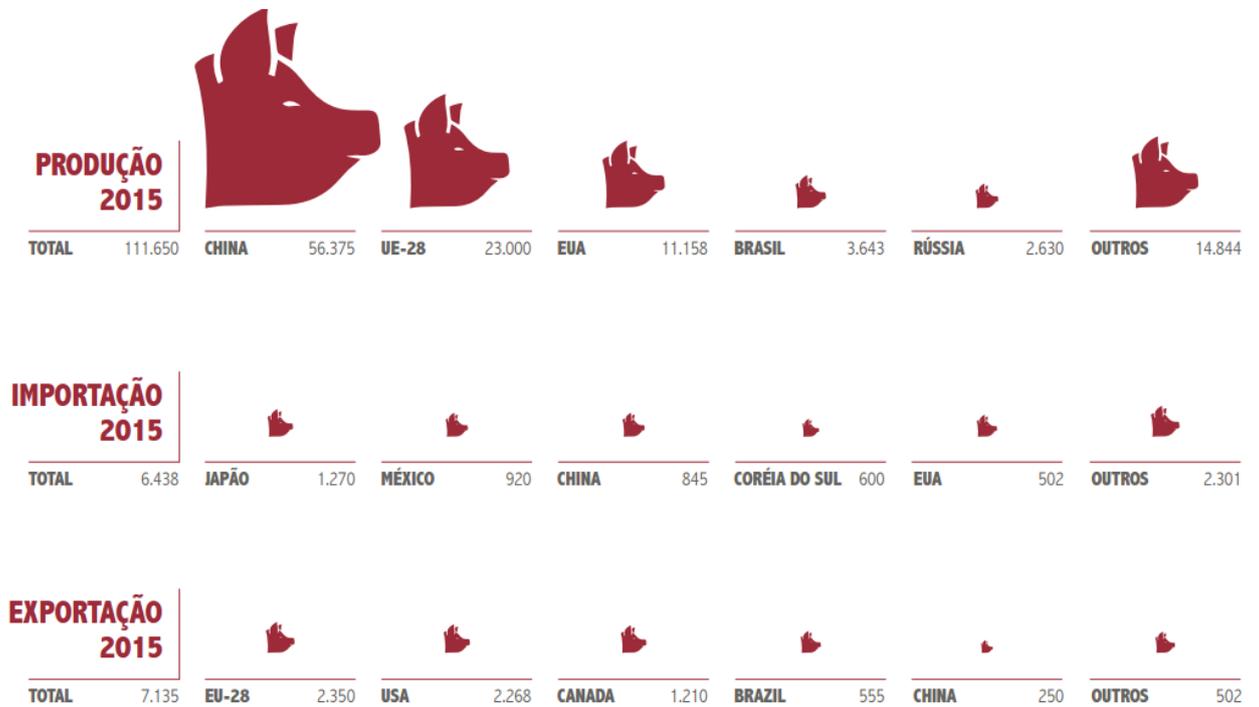
E ainda, o controle sanitário estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e por outros órgãos competentes também contribui para a qualidade do produto final. As fiscalizações e os selos de qualidade emitidos por estes órgãos garantem a segurança alimentar da carne suína (BIERNATH, 2013).

Atualmente a China é o maior produtor mundial de carne suína, a União Europeia ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção, seguido pelos Estados Unidos em terceiro e pelo Brasil em quarto. Os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar no ranking de exportação mundial, em segundo a União Europeia, seguido pelo Canadá em terceiro e o Brasil na quarta posição. Em relação ao ranking mundial de importação de carne suína, o Japão ocupa a liderança (Figura 1) (LYRA, 2015).

Desta forma, atualmente, o Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de produção e exportação de carne suína (Figura 2), tendo a Rússia, como o principal país comprador do Brasil. Os estados brasileiros responsáveis pela produção de suínos são Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais (Figura 3) (LYRA, 2015).

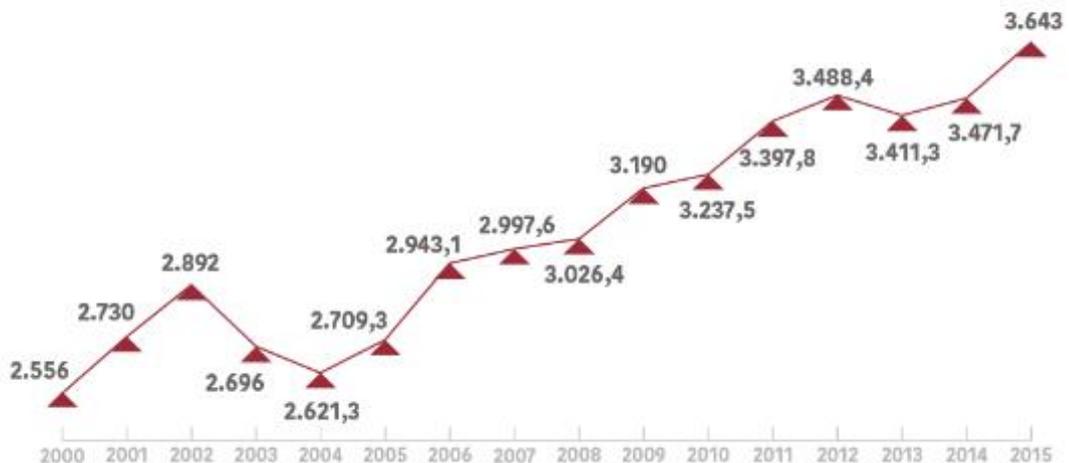
Apesar do lugar de destaque do Brasil com relação as exportações de carne suína, ainda é o mercado interno que absorve mais de 80% da produção brasileira. Em termos absolutos, a quantidade consumida só tem crescido no Brasil, dado o aumento da população e da renda. No entanto, em termos per capita, o consumo de carne suína no Brasil cresce de forma gradativa. Em 2013, o consumo médio per capita anual do brasileiro ficou em média 15,1 Kg (LYRA, 2015).

Figura 1: Mercado mundial de carne suína (Mil toneladas).



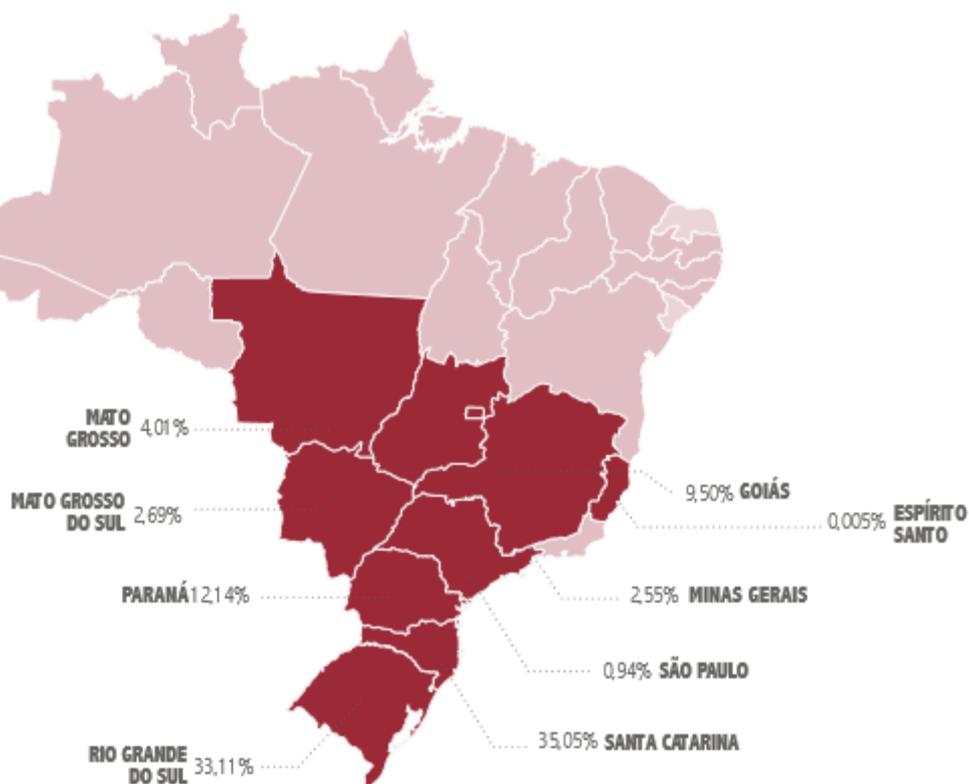
Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015).

Figura 2: Produção brasileira de carne suína (Mil toneladas).



Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015).

Figura 3: Estados exportadores de carne suína em 2015.



Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015).

A produção de suínos gera uma renda direta para mais de 730 mil pessoas, totalizando 2,7 milhões de pessoas que têm como renda direta e/ou indireta a suinocultura. Para o mercado externo os produtos oriundos dos suínos brasileiros possuem menor custo benefício quando comparados a outros países. O sistema de criação de suínos no Brasil é fundamentado na integração vertical, e na alta disponibilidade de insumos para a alimentação dos animais, como o milho e a soja, e ainda há investimentos em tecnologia. A extensão territorial do Brasil é um outro fator favorável à criação de suínos, que permite que haja ampliação do plantel de animais sem comprometer os recursos naturais (GONÇALVES e PALMEIRA, 2006).

No ano de 2015, estudos mostram que o setor suinícola no Brasil gerou R\$ 62,57 bilhões de PIB (Produto Interno Bruto), e em torno de 126 mil empregos diretos e mais de 900 mil empregos indiretos. Nesse mesmo ano, o abate anual do Brasil foi de 39 milhões de animais (GOMES, 2016).

2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são caracterizadas por serem metabólitos secundários tóxicos, produzidos por alguns fungos filamentosos. Os fungos, de modo geral, sintetizam diferentes metabólitos e enzimas que são necessários para seus processos celulares e para produção de energia, sendo esses essenciais para a sobrevivência desses microrganismos, que fazem parte do metabolismo primário. Metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos a processos essenciais do microorganismo. As micotoxinas fazem partes das substâncias produzidas pelo metabolismo

secundário (ABID, 2012). Os fungos toxigênicos podem produzir uma ou mais micotoxinas. É importante ressaltar, que nem todos os fungos são toxigênicos, assim como nem todos os metabólitos secundários são tóxicos (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

A contaminação fúngica e a produção de micotoxinas em plantas, cereais e grãos podem ocorrer durante qualquer momento da cadeia de produção desses insumos. O consumo de produtos que contenham micotoxinas resulta em uma micotoxicose, termo utilizado para designar a ingestão e a exposição a esses metabólitos tóxicos, que pode ocorrer tanto em seres humanos quanto em animais. A micotoxicose pode ser primária ou secundária, a primária se dá pela ingestão direta de alimentos contendo micotoxinas; já a micotoxicose secundária se dá pelo consumo de produtos de origem animal provenientes dos que ingeriram estas toxinas fúngicas durante a sua alimentação (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Assim, a micotoxicose pode ser aguda ou crônica. A micotoxicose aguda ocorre quando são ingeridas doses altas de micotoxinas, que, na maioria das vezes, causa uma série de sinais e sintomas muito característicos que facilitam sua identificação; em contrapartida, a micotoxicose crônica se dá pelo consumo de doses baixas a moderadas, nesse caso os sinais clínicos não são percebidos (SANTANA, 2012). O grau de toxicidade pelo consumo das micotoxinas é determinado pela quantidade ingerida, pelo tempo de ingestão, pela presença de duas ou mais micotoxinas no mesmo alimento. Existem espécies de animais que são mais sensíveis a determinadas micotoxinas, por exemplo a espécie suína e os equídeos, além disso, o sexo, a idade e o estado imunológico também podem influenciar (ABRUNHOSA et al., 2012).

O efeito tóxico decorrente da ingestão de micotoxinas pode ser potencializado devido ao efeito sinérgico que ocorre entre duas ou mais micotoxinas. O efeito aditivo entre duas ou mais micotoxinas ocorre quando o resultado é o mesmo que a soma individual da sintomatologia isolada de cada micotoxina. No que tange, ao efeito antagônico, ocorre este quando o desdobramento total decorre do consumo de duas ou mais micotoxinas, sendo menor, neste caso, a soma do efeito deletério individual de cada metabólito tóxico (ROSMANINHO et al., 2001).

As micotoxinas já são descritas a séculos, acredita-se que uma das 10 pragas do Egito tenha sido causada pelo consumo desses compostos, dizimando seres humanos e animais. Um episódio que ocorreu na França, na Idade Média, chamado de “Fogo Sagrado de Santo Antônio”, aconteceu devido ao consumo de grãos contaminados com alcaloides do ergot, metabólito secundário tóxico (RICHARD, 2007).

Os alcaloides do ergot possuem estrutura química diversa, podendo exercer atividade no sistema nervoso central ou vasoconstrição. O acontecimento, na Idade Média, foi marcado pelo consumo de cereais contaminados com essas substâncias, e as pessoas que consumiram tinham ataques, alucinações e gangrena nas extremidades do corpo (braços e pernas). A população se dirigiu até as igrejas para rezar e pedir socorro, no entanto, muitos acometidos faziam peregrinações até o templo de Santo Antônio, localizado na parte central da França. Muitos desses indivíduos, que peregrinavam ao templo de Santo Antônio, eram “curados” de forma milagrosa. O povo acreditava que estavam sendo curados por Santo Antônio, porém a “cura” se dava em decorrência da mudança de local. Dessa forma, as pessoas paravam de ingerir alimentos contaminados com alcaloides do ergot (COSTA, 1998).

Alcaloides do ergot são produzidos, principalmente, pelos fungos *Claviceps purpurea* e *C. paspali*, que invade o ovário da planta, se desenvolve e produz uma massa micelial compacta, chamada de esclerócitos (Figura 4), que contém inúmeras substâncias incluindo os alcaloides do ergot. Os esclerócitos caem no chão, após a maturação e continuam viáveis, essas estruturas germinam, produzindo esporos (ascosporos) que se dispersam no vento ou na água da chuva, dando início a um novo ciclo de infecção em vegetais e plantas, sendo mais comum no trigo e no centeio (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Figura 4: Esclerócito, ou “esporão”.



Fonte: Mallmann e Dilkin (2007).

Entre os anos de 1800 e 1900, muitos pesquisadores reconheciam que os fungos eram capazes de produzir metabólitos secundários, a partir disso surgiu o interesse pelo estudo da toxicidade desses compostos (RICHARD, 2007). Porém, apenas em 1960, surgiu a micotoxicologia moderna, devido à morte de 100 mil perus no Reino Unido por causa desconhecida, o episódio foi chamado de “doença X dos perus”. Muitos estudos, pesquisas e hipóteses foram feitos para estabelecer a causa *mortis*, entretanto, somente através de estudos microbiológicos, com solventes dos ingredientes da ração, foi possível identificar que a causa era uma toxina, aflatoxina, produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, presente no amendoim, ingrediente incorporado na ração (JOUANY et al., 2005; MALLMANN e DILKIN, 2007).

Existem mais de 300 micotoxinas identificadas, e em torno de 350 espécies de fungos toxigênicos (SANTANA, 2012). Estima-se que aproximadamente 25% dos grãos e cereais no mundo estão contaminados com micotoxinas (MARIN et al., 2013). Um estudo recente com 1100 amostras de insumos coletadas ao redor do mundo mostrou que 70% dessas amostras estavam contaminadas com micotoxinas (PIERRON et al., 2016).

As micotoxinas de maior importância são: aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, deoxinivalenol, outros tricotecenos e zearalenona (MARROQUIN-CARDONA et al., 2014). Uma grande variedade de fungos é responsável pela produção de micotoxinas, principalmente, fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Claviceps* (Tabela 1) (MARIN et al., 2013).

Tabela 1: Principais micotoxinas e espécies produtoras.

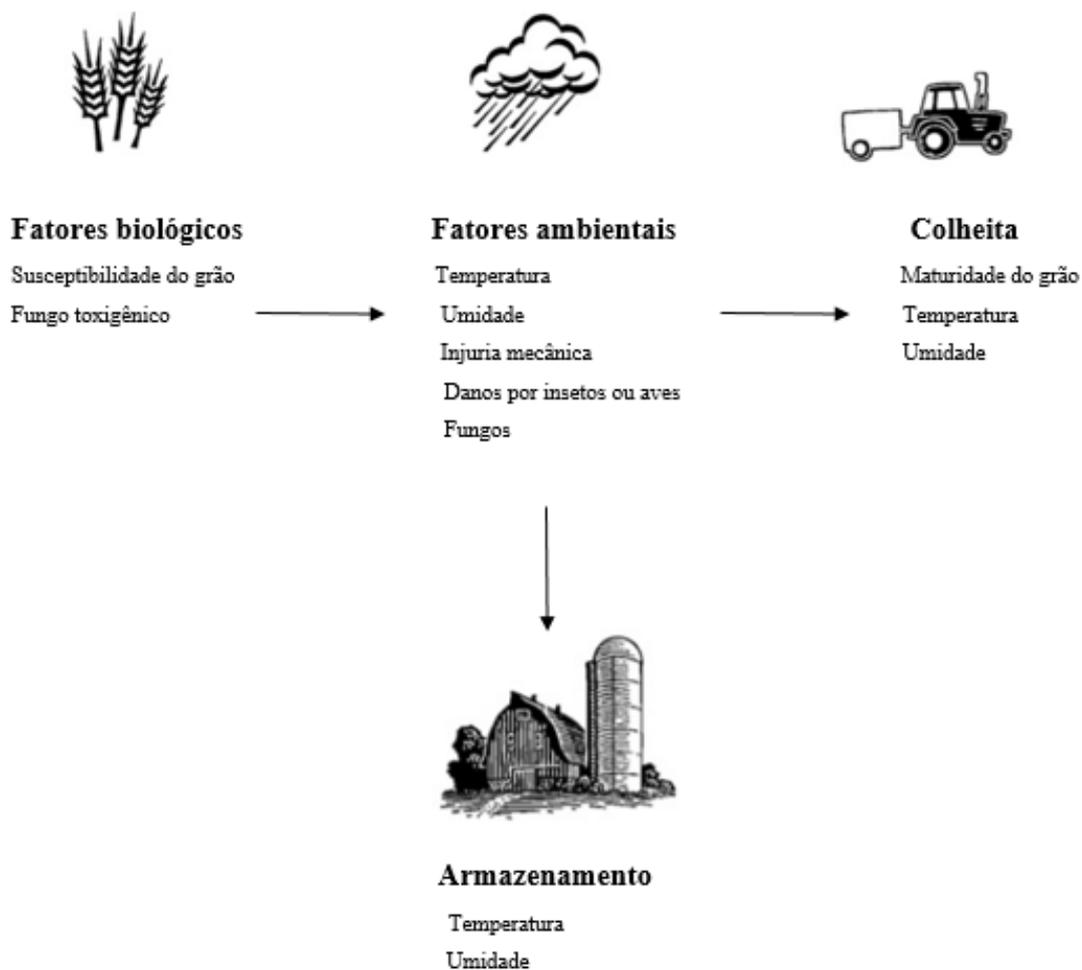
Micotoxina	Espécies fúngicas produtoras
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasticus</i>
Ocratoxina A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i>
Alcaloides do ergot	<i>Claviceps purpúrea</i> , <i>C. paspali</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium</i> spp.
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>
Fumonisinias	<i>Fusarium verticillioides</i>

Fonte: adaptada de Bryden (2012).

Existem inúmeras micotoxinas que possuem baixa incidência ou são desconhecidas, que emergem ou são introduzidas por mudanças climáticas que afetam a distribuição de determinados fungos. Dessa forma, micotoxinas emergentes surgem graças aos avanços de técnicas de detecção e de equipamentos de análise (FELS-KLERX et al., 2009). As principais micotoxinas emergentes são: fusaproliferina, moniliformina, beauvericina e eniáticas, essas produzidas por espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*. E ainda, alenueno, alternariol, alternariol monometil éter, altertoxina e ácido tenuazônico como micotoxinas emergentes produzidas por espécies do gênero *Alternaria* (MARIN et al., 2013).

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são influenciados por inúmeros fatores, como umidade, temperatura, nível de oxigênio, grau de danificação do grão e/ou cereal, grau de umidade do grão e a presença dos esporos fúngicos. Além disso, a atividade água do grão é outro fator determinante que influencia no crescimento fúngico. A produção de micotoxina pode ocorrer ainda no campo durante o processo de desenvolvimento e maturação da planta, como também após a colheita, durante o transporte, na estocagem ou no armazenamento do grão (Figura 5) (COVER et al., 2012; PLEADIN et al., 2012).

Figura 5: Fatores que afetam a produção de micotoxinas.



Fonte: Bryden (2012).

Portanto, qualquer planta, grão ou cereal estará suscetível à contaminação por micotoxinas em algum momento da cadeia produtiva de alimentos. As micotoxinas possuem estabilidade térmica, uma vez produzida, por mais que o grão passe por um processamento

térmico, esses metabólitos tóxicos continuam até o final da cadeia de produção, sendo ingeridos por animais e seres humanos (BRYDEN, 2012). Logo, as micotoxinas possuem destaque no cenário global, já que, de modo geral, possuem propriedades teratogênicas, mutagênicas, carcinogênicas, estrogênicas, neurotóxicas, podendo também causar efeitos deletérios para o sistema imune (YANG et al., 2015).

O consumo desses metabólitos causa impacto negativo na produção animal. O principal problema está associado com a diminuição do desempenho produtivo, causado pela ingestão crônica dessas substâncias, podendo ou não acompanhar sinais clínicos patológicos. Muitas micotoxinas provocam diminuição do consumo de ração, no ganho de peso e aumento da conversão alimentar (BRYDEN, 2012).

A biodisponibilidade dos nutrientes é afetada quando há contaminação por fungos, já que o metabolismo fúngico acompanhado pela produção de micotoxinas interfere na composição dos nutrientes. E ainda, existem as micotoxinas que causam distúrbios de ordem reprodutiva, tanto em fêmeas como em machos, interferindo na gestação e no desenvolvimento embrionário, provocando abortos. As micotoxinas provocam imunossupressão, pois interferem na resposta celular, em fatores humorais e na resposta do sistema imune (BRYDEN, 2012). O consumo dessas substâncias por animais, gera resíduos pela metabolização no organismo, havendo presença desses metabólitos em órgãos internos, na musculatura e no leite (BURANATRAGOOL et al., 2015).

Em países desenvolvidos, a preocupação fica por conta da contaminação da cadeia produtora de alimentos, do risco para a saúde humana, e do impacto na saúde e na produção animal. No que concerne aos países em desenvolvimento, a maior preocupação fica a cargo da regulação das micotoxinas, para reduzir a exposição aos seres humanos e animais, e com o custo adicional para o produtor para atender as exigências da regulação internacional com a venda de insumos como grãos, cereais e até mesmo produtos de origem animal (BRYDEN, 2012). Os limites estabelecidos pela União Européia para produtos e subprodutos destinados a alimentação animal encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Limites Máximos de Tolerância para ingredientes destinados à alimentação animal.

Micotoxinas	Descrição do produto	Limite máximo de tolerância (ppm)
Deoxinivalenol	Cereais e seus subprodutos	8
	Rações e concentrados para suínos	0,9
Zearalenona	Cereais e seus subprodutos	2
	Produtos à base de milho	3
	Rações e concentrados para leitões e marrãs	0,1
Ocratoxina A	Rações e concentrados para suínos e suínos de terminação	0,25
	Cereais e seus subprodutos	0,25
Fumonisina B ₁ + B ₂	Rações e concentrados para suínos	0,05
	Milho e produtos à base de milho	60
Aflatoxina B ₁	Rações e concentrados para suínos	5
	(excetos animais jovens)	0,02

Fonte: Jornal Oficial da União Européia (2006).

Aqui no Brasil, com enfoque na alimentação humana, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou os Limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos comercializados, que se aplicam às empresas que importam, produzem, distribuem e

comercializem determinadas categorias de bebidas, alimentos e matérias primas, de acordo com a Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013.

Com relação aos limites máximos tolerados de micotoxinas a produtos e subprodutos utilizados na alimentação animal, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu a Portaria MA/SNAD/SFA n.º 07, de 06 de novembro de 1988, publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 – seção I, página 21.968. Essa portaria estabelece que o limite máximo tolerado de aflatoxinas totais em produtos ou insumos destinados à alimentação animal não pode ultrapassar 50 ppb, não havendo limite para outras micotoxinas.

Em 2006, o MAPA organizou um grupo de trabalho sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal, publicado no Diário Oficial da União de 25 de maio de 2006 – seção 2, página 5. Esse documento sugere os limites máximos tolerados em produtos destinados à alimentação animal, sendo uma proposta para uma futura regulamentação (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Limites Máximos de Tolerância para ingredientes destinados à alimentação animal.

Micotoxinas	Descrição do produto	Limite máximo de tolerância (ppb)
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Milho grão e subprodutos	20
Fumonisinias B1 e B2	Milho grão e subprodutos	10.000
	Trigo grão e seus subprodutos	10.000
Deoxinevalenol	Trigo grão e seus subprodutos	4.000

Fonte: Mapa (2006).

Tabela 4: Limites Máximos de Tolerância para rações destinadas à alimentação animal.

Micotoxinas	Descrição do produto	Limite máximo de tolerância (ppb)
Aflatoxina B1	Rações, concentrados e outros alimentos completos para animais de todas as espécies nas fases pré-inicial e inicial	10
Fumonisinina B1 e B2	Rações e concentrados para monogástricos, exceto aves domésticas	5.000
	Rações e concentrados para aves domésticas	10.000
Zearalenona	Rações e concentrados para suínos adultos	100
	Rações e concentrados para suínos nas fases pré-inicial, inicial e marrãs	50
Deoxinivalenol	Rações e concentrados para suínos	1.000
Ocratoxina A	Rações e concentrados para suínos e alimentos para cães	50

Fonte: Mapa (2006).

2.3 Micotoxinas na Suinocultura

Dentro de todas as espécies animais, os suínos são os mais sensíveis ao consumo de micotoxinas, aves e ruminantes, por exemplo, são consideradas espécies “mais resistentes”, porém com baixa sensibilidade (GUERRE, 2015). No que tange à alta sensibilidade dos suínos,

as micotoxinas podem se manifestar através do consumo excessivo de grãos e cereais nas suas dietas, como também por meio da metabolização desses compostos (PIERRON et al., 2016).

O nível de contaminação de produtos destinados à alimentação dos suínos, geralmente, são de baixos a moderados, o que resulta em diminuição de parâmetros zootécnicos e imunossupressão, provocados pelo consumo crônico de micotoxinas, gerando perdas econômicas. Existem seis micotoxinas que são frequentemente encontradas em insumos e rações destinados à alimentação de suínos, são essas: aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, tricotecenos e zearalenona (PIERRON et al., 2016).

2.3.1 Aflatoxinas

Existem em torno de 20 substâncias que são denominadas aflatoxinas, porém apenas as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ que possuem maior importância toxicológica. As principais espécies produtoras são *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A aflatoxina M₁ é um produto metabólico proveniente da biotransformação da aflatoxina B₁, encontrada em fluidos corporais como leite e urina (RICHARD, 2007).

O clima quente e os períodos de seca, o armazenamento de grãos e/ou outros subprodutos em locais úmidos, com temperatura acima de 20°, são fatores importantes que podem desencadear a produção de aflatoxinas pelos fungos produtores. As aflatoxinas são encontradas, principalmente, no milho, no amendoim, nas sementes oleaginosas e no farelo de algodão (RICHARD, 2007).

O consumo de aflatoxinas provoca, principalmente, danos hepáticos e possui propriedades carcinogênicas (PIERRON et al., 2016). A quantidade ingerida pelos animais e a idade são fatores determinantes no desenvolvimento da sintomatologia clínica, na qual a manifestação de sinais e sintomas poderá ser aguda, subaguda ou crônica. O fígado é o órgão alvo dessa toxina, provocando hemorragias, icterícias, necrose e lipidose hepática em casos agudos. A sintomatologia aguda é a mais comum em leitões, quanto mais novo o animal, maior será o risco do curso da intoxicação ser letal (STOJANAC et al., 2015).

Numa intoxicação crônica, o consumo de doses baixas a moderadas de aflatoxinas ocasiona o aumento do peso do fígado, dos rins, do baço e do pâncreas, e também ocorre a diminuição do desempenho zootécnico, diminuindo o consumo de ração e a taxa de crescimento dos suínos, além do efeito imunossupressor (MOK et al., 2013). E ainda, as aflatoxinas causam efeitos deletérios no sistema reprodutivo, como endometrite, edema de glândula mamária e diminuição da leitegada (MALLMANN e DILKIN, 2007).

A toxicidade das aflatoxinas no sistema imune é para todas as espécies, incluindo os suínos. A exposição às aflatoxinas provoca a diminuição dos títulos de anticorpos e a queda da ativação de macrófagos (STOJANAC et al., 2015). Em experimento com leitões desmamados, durante quatro semanas, que consumiram doses baixas de aflatoxinas, os pesquisadores concluíram que ocorreu alteração da resposta inflamatória, devido à diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento de citocinas anti-inflamatórias. Os leitões expostos às aflatoxinas, ainda no útero, pelo consumo desses metabólitos tóxicos por suas progenitoras, tiveram alteração da capacidade funcional de macrófagos e neutrófilos (PIERRON et al., 2016).

Esses metabólitos são rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal por serem altamente lipofílicos, também são facilmente absorvidos pelos pulmões e pela pele. Após absorção, as toxinas caem na corrente sanguínea e são distribuídas para órgãos e tecidos. As aflatoxinas B₁, B₂ e M₁ são comumente encontradas em baixos níveis em órgãos e tecidos musculares (MALLMANN e DILKIN, 2007).

O fígado é o órgão alvo, no qual há maior concentração desses metabólitos. A biotransformação ocorre no fígado, porém, pesquisadores relatam que em suínos também pode ocorrer, através da mucosa nasal, inclusive, pode gerar carcinoma no trato respiratório superior.

No fígado, as enzimas são responsáveis pela metabolização, que torna as moléculas mais hidrofílicas através de processos de oxidação, redução e hidrólise, os quais são realizados pelo organismo com intuito de facilitar a eliminação das aflatoxinas. A detoxificação gera produtos como aflatoxina M₁, Q₁, P₁ e B_{2a} que são menos tóxicos que seus precursores. Também ocorre a formação do aflatoxicol, que retorna ao organismo como aflatoxina B₁ pelo sistema de reductase citoplasmática. A aflatoxina B₁ também pode ser metabolizada, gerando 8,9- epóxi aflatoxina que possui propriedades covalentes com ácidos nucleicos, diminuindo sua produção, provocando efeito mutagênico, teratogênico e carcinogênico (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Nos Estados Unidos, os limites são determinados pela agência reguladora, FDA – Food and Drug Administration, responsável pelo controle de alimentos tanto para humanos como para animais. No caso do milho e produtos/subprodutos derivados do amendoim, destinados à alimentação de suínos, na fase de terminação, devem possuir concentração máxima de 200 ppb de aflatoxinas totais. No que concerne à alimentação de reprodutores suínos, o milho e produtos/subprodutos derivados do amendoim devem possuir concentração máxima de 100 ppb aflatoxinas totais. Já o milho destinado à alimentação de leitões, deve possuir concentração máxima de 20 ppb aflatoxinas totais. E por fim, outros insumos devem possuir concentração máxima de 20 ppb aflatoxinas totais (RICHARD, 2007).

2.3.2 Ocratoxinas

A ocratoxina A é o principal metabólito, com maior importância toxicológica, de um grupo com um total de sete compostos tóxicos (MALLMANN e DILKIN, 2007; RICHARD, 2007). As ocratoxinas são produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, como *A. ochraceus*, *A. seção Nigri* e *Penicillium*, *P. verrucosum* e *P. nordicum* (MARIN et al., 2013). As ocratoxinas são frequentemente encontradas em grãos e cereais e em seus subprodutos, como por exemplo, café, cacau, vinho, cerveja, pimentas, frutas secas. Também estão presentes em produtos de origem animal, oriundos de animais expostos ao consumo dessa toxina em suas dietas (ARMANDO et al., 2012). Esses compostos possuem alta estabilidade térmica, apenas temperaturas acima de 250° são suficientes para reduzir a concentração dessas toxinas. A espécie suína é altamente sensível ao consumo dessa micotoxina (MARIN et al., 2013).

A ocratoxina A possui estrutura química similar com o aminoácido fenilalanina, por isso, existe um efeito inibitório em enzimas que utilizam esse aminoácido, inibindo a síntese de proteínas, e ainda, em nível celular provoca danos na mitocôndria, peroxidação de lipídios e apoptose de inúmeras células (MARIN et al., 2013). O órgão alvo da ocratoxina A são os rins, sendo uma substância nefrotóxica que possui propriedades carcinogênicas e teratogênicas (ARMANDO et al., 2012).

Após o consumo, essa micotoxina é rapidamente absorvida no estômago e no intestino delgado, sendo eliminada através da bile, onde é novamente absorvida. Em seguida, há distribuição através da corrente sanguínea, e ligação com albumina e outras macromoléculas, essa ligação torna o metabólito biodisponível por mais tempo, até se desprender e ir para o fígado e rins.

A biotransformação ocorre em vários órgãos, gerando vários outros compostos que serão eliminados pelos rins. O processo de eliminação é dependente do grau de ligação da toxina com as macromoléculas. Suínos que consomem 1 ppm de ocratoxina A, o organismo demora em média 4 dias para biotransformar e eliminar a toxina a níveis não detectáveis (MALLMANN e DILKIN, 2007).

A ocratoxina A também interfere no metabolismo dos carboidratos, interferindo na gliconeogênese. Há diminuição na produção de uma enzima que tem importante papel na gliconeogênese, que converte componentes intermediários do ácido cítrico em glicose e glicogênio. Dessa forma, as reações são afetadas, o que causa danos nos néfrons, provocando

disfunção renal (MALLMANN e DILKIN, 2007). Os sinais clínicos nos animais são polidipsia e poliúria, devido à nefropatia, porque há degeneração dos túbulos contorcidos renais e fibrose intersticial (MARIN et al., 2013).

O consumo de pequenas doses de ocratoxinas não provocam sintomatologia renal clássica descrita anteriormente, porém ocorre diminuição do ganho de peso, aumento da conversão alimentar, diminuição da taxa de crescimento e maior susceptibilidade às doenças (WIŚNIEWSKA-DMYTROW et al., 2013). Vale destacar, que as ocratoxinas causam efeitos deletérios no sistema imune, provocando redução no baço, nos linfonodos, na resposta de anticorpos, assim como provocam alterações no número e na função de células do sistema imune e na modulação e produção de citocinas (MARIN et al., 2013). Segundo Marin et al. (2013), doses acima de 1 ppm de peso vivo são responsáveis por uma toxicidade aguda para suínos.

2.3.3 Tricotecenos

Os tricotecenos são constituídos por um grupo de micotoxinas, categorizadas em quatro tipos, A, B, C e D (NATHANAIL et al., 2016), de acordo com a variação funcional de suas estruturas químicas, acetoxi e hidroxilo (MARIN et al., 2013). Existem mais de 200 metabólitos identificados como tricotecenos (NATHANAIL et al., 2015). Esses compostos são produzidos por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* e *Trichoderma*. As micotoxinas presentes nos grupos A e B possuem maior importância toxicológica (Tabela 5), já as micotoxinas presentes nos grupos C e D são consideradas menos importante (MALLMANN e DILKIN, 2007; MARIN et al., 2013; PINTON e OSWALD, 2014).

Tabela 5: Tricotecenos dos grupos A e B.

Tipo	Micotoxina	Principal Fungo produtor
A	Toxina T-2, Toxina HT-2, Diacetoxyscirpenol (DAS), Neosolaniol	<i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. semitectum</i> e <i>F. equiseti</i>
B	Nivalenol, Deoxinivalenol (DON), 4-acetil-nivalenol (Fusarenon -X), 3-acetil-deoxinivalenol (3-Ac-DON)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> e <i>F. acuminatum</i>

Fonte: Mallmann e Dilkin (2007).

As micotoxinas T2, DAS e HT-2 são comumente encontradas em cereais e grãos, como trigo, aveia, centeio, cevada, milho e os subprodutos e derivados (LATTANZIO et al., 2012). Deoxinivalenol (DON) e as outras toxinas que pertencem ao grupo B também estão presentes em cereais, como milho, trigo, centeio, cevada e aveia e seus subprodutos e derivados (PINTON e OSWALD, 2014).

De modo geral, os tricotecenos interferem na síntese de proteínas de células eucarióticas, ocorre ligação com a subunidade 60S ribossomal e interação com a enzima peptiltransferase. Como existe variação química nas moléculas de cada micotoxina, que pertencem ao grupo dos tricotecenos, a interação e inibição da síntese de proteínas varia, dependendo da estrutura química específica de cada tricoteceno (MARIN et al., 2013). Após o consumo, apenas 1% é absorvido no trato gastrointestinal ocorrendo ação cáustica no local, a micotoxina atinge a corrente sanguínea sendo distribuída no fígado, rins, pele, tecido adiposo, muscular e bile. A biotransformação ocorre no fígado e são produzidos outros compostos que são eliminados pelos rins e nas fezes. A eliminação pelo organismo é rápida, o que possibilita que não haja resíduos

em produtos de origem animal, com exceção do tecido adiposo (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Os suínos são mais sensíveis a intoxicação por deoxinivalenol (DON). Os sinais clínicos agudos normalmente envolvem vômito, recusa do alimento, inflamação do trato gastrointestinal e dermatites. A intoxicação crônica é frequente, sendo caracterizada por diminuição do ganho de peso e diminuição do consumo de ração (PINTON e OSWALD, 2014). O DON interfere na sinalização neuroendócrina, na resposta imunológica, nos hormônios do crescimento, e no sistema nervoso central. Há interferência na sinalização neuroendócrina que afeta a produção de serotonina. A serotonina está relacionada com a secreção de hormônios que controlam o apetite. O DON também provoca alterações no sistema imune, ativa citocinas pró-inflamatórias que provocam a recusa do alimento, induzindo alterações específicas no sistema nervoso central, e ainda induz a liberação de hormônios de saciedade provocando anorexia (PINTON e OSWALD, 2014; TIEMANN et al., 2008).

Pierron et al. (2016) relataram em seus estudos, que o efeito imunossupressor ou imunoestimulador de DON é dependente da dose ingerida pelos animais, do tempo e da frequência do consumo, que pode favorecer ou não uma resposta inflamatória, podendo aumentar os níveis de IgA no soro sanguíneo. Doses acima de 2 ppm de DON na ração já são consideradas doses altas que provocam alterações na mucosa gástrica e intestinal. As alterações histopatológicas na mucosa do intestino são severas, havendo atrofia multifocal, fusão das vilosidades, necrose apical das vilosidades, vacuolização citoplasmática dos enterócitos e edema na lâmina própria. O exato mecanismo de ação, de como essas lesões acontecem, ainda não está bem elucidado (PINTON e OSWALD, 2014). E ainda, doses acima de 20 ppm de DON na ração induzem ao vômito e a recusa do alimento (BRYDEN, 2012).

O consumo de nivalenol, que também constitui o tipo B dos tricotecenos, induz diminuição do desempenho zootécnico dos animais, reduzindo o ganho de peso e o consumo de ração, e ainda aumenta o peso relativo dos órgãos e causa severa leucopenia. Porém, em um ensaio *in vivo* com leitões, que consumiram durante três semanas nivalenol em suas dietas, não ocorreu alteração no peso vivo e no peso relativo aos órgãos, entretanto, no exame macroscópico dos órgãos, ocorreu diferença entre os animais-controles e o grupo de animais intoxicados. Os rins e o trato gastrointestinal dos animais intoxicados apresentaram lesões e na microscopia houve redução no número de células no baço (GEREZ et al., 2015).

2.3.4 Fumonisinias

As fumonisinias são produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, *F. napiforme*, *F. dlamini* e *F. nygamai*, sendo *F. verticillioides* e *F. proliferatum* como as principais espécies produtoras dessa micotoxina. Esses metabólitos são encontrados, principalmente, no milho e nos seus subprodutos (CORTINOVIS et al., 2014; MARIN et al., 2013). O clima seco, quente e úmido, durante a maturação do grão, são fatores de estresse importantes, que desencadeiam a produção de fumonisinias pelos fungos produtores (RICHARD, 2007). As fumonisinias possuem estabilidade térmica quando expostas ao calor, só havendo uma pequena degradação em temperaturas superiores a 150° C e durante processos de fermentação (MARIN et al., 2013).

No total existem 12 compostos que são denominados fumonisinias, os compostos mais importantes são da série B, sendo fumonisinina B₁, B₂ e B₃. A fumonisinina B₁ (FB₁) é o metabólito mais frequente, que possui maior importância toxicológica (CORTINOVIS et al., 2014; MARIN et al., 2013). A FB₁ inibe a síntese de uma enzima, ceramida sintase, que participa da reação de transformação dos esfingolipídios. Os esfingolipídios possuem papel fundamental na manutenção da integridade da membrana celular, na regulação dos receptores de superfície celular, na bomba de íons e no suporte de sistemas vitais para o funcionamento e sobrevivência das células (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Ao inibir a ceramida sintase há acúmulo intracelular de esfinganina e diminuição da esfingosina (MARIN et al., 2013). O acúmulo de esfinganina gera uma série de efeitos tóxicos para os rins, fígado e possui propriedades carcinogênicas (BRYDEN, 2012). Desse modo, provocam uma série de efeitos tóxicos que variam entre as espécies de animais domésticos (PIERON et al., 2016), por exemplo em equinos a ingestão de FB₁ causa necrose da substância branca do cérebro (RICHARD, 2007).

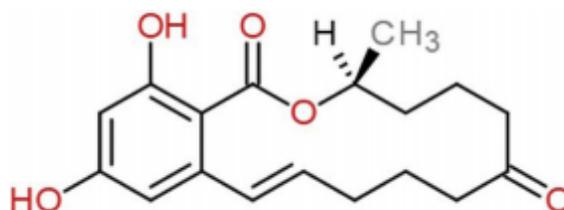
Os suínos assim como os equinos também são sensíveis a ingestão de fumonisinas, a ingestão desses metabólitos nos suínos está relacionado ao edema pulmonar e ainda produz efeitos sendo cardiotoxicos. A sintomatologia clínica engloba diminuição do consumo de ração, dispnéia, fraqueza, cianose seguida de morte. Quando realizado o exame *post mortem*, os animais apresentam edema intersticial e interlobular nos pulmões e hidrotorax (MARIN et al., 2013). Doses acima de 12 ppm de FB₁ costumam ser letais para a espécie suína. Estudos apontam que o intestino e o fígado também são órgãos afetados pelo consumo dessa toxina (BUREL et al., 2013). É importante perceber, que o edema pulmonar ocorre porque há aumento da permeabilidade capilar, no entanto, existem pesquisadores que relatam que ocorre uma série de mudanças na dinâmica cardíaca, por essa razão há o edema pulmonar, causado pela deficiência de contração do coração (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Doses baixas de FB₁ não interferem no desempenho zootécnico, entretanto, interferem na colonização de patógenos como *Escherichia coli* havendo diminuição na resposta inflamatória local e alta permeabilidade no epitélio intestinal (BUREL et al., 2013). A maturação das células detentoras de antígenos também é afetada, ocorrendo diminuição na expressão intestinal de interleucinas. E ainda, há interferência na reposta de células T- helper, diminuindo a resposta humoral (PIERON et al., 2016). Após a ingestão, entre 3-6%, é absorvido pelo trato gastrointestinal, e o restante é eliminado através das fezes. Quando absorvida, a FB₁ atinge a corrente sanguínea, sendo distribuída por órgãos e tecidos. A eliminação é rápida, principalmente, quando a ração contaminada é substituída (MALLMANN e DILKIN, 2007).

2.3.5 Zearalenona

Zearalenona (ZEA) é um hormônio responsável pela reprodução sexuada em espécies de *Fusarium* (GAJECKA et al., 2012), mas que também é uma micotoxina estrogênica, sendo 6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1- undecenyl) β lactona ácido resorcílico (Figura 6), com estrutura química não esteroideal (BURANATRAGOOL et al., 2015). E ainda, possui estrutura cristalina, insolúvel em água, porém solúvel em substâncias aquosas alcalinas e em solventes orgânicos, e possui ponto de fusão de 164°C (DOLL e DANICKE, 2011).

Figura 6: Estrutura química da zearalenona.



Fonte: Buranatragoool et al. (2015).

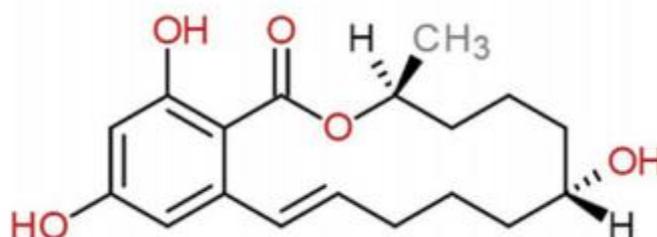
A ZEA é produzida por uma série de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, como *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* e *F. semitectum*. Essa toxina possui distribuição global, sendo encontrada principalmente no milho, sorgo, cevada, trigo, aveia, gergelim e os seus subprodutos (MARIN et al., 2011; JIANG et al., 2012; SHOEVERES et al., 2012; STOPA et al., 2014;). A produção de ZEA, normalmente, acontece ainda no campo, já que as espécies produtoras de ZEA estão presentes no campo e invadem as plantas. No entanto, a produção dessa toxina pode ocorrer em condições ruins de estocagem do grão ou de seus subprodutos. As concentrações de ZEA em grãos, produtos, subprodutos e nas rações destinadas à alimentação de animais variam muito, sendo dependente das variações climáticas, tendo em vista que a ZEA possui alta estabilidade térmica, acima de 150° C, e sua degradação só é observada em temperaturas extremamente altas ou sob condições alcalinas (MARIN et al., 2013; ZATECKA et al., 2014).

Estudos feitos na Europa mostraram que os níveis de contaminação por ZEA variam de pequenas concentrações em ppb até 8 ppm de ZEA no trigo, aveia, cevada e centeio. Em países do continente Africano e da Ásia essas concentrações chegam em mais de 600 ppm de ZEA em determinados substratos (MARIN et al., 2011).

Uma pesquisa instituída nos últimos cinco anos com o objetivo de analisar a incidência de ZEA em grãos utilizados na alimentação de animais de produção na província de Shandong na China, onde analisaram 1389 amostras. Os resultados mostraram a presença de ZEA em 69,15% das amostras, a maior concentração de ZEA detectada em grãos foi de 4,33 ppm, a média detectada nas amostras foi de 0,97 ppm (CHEN et al., 2015).

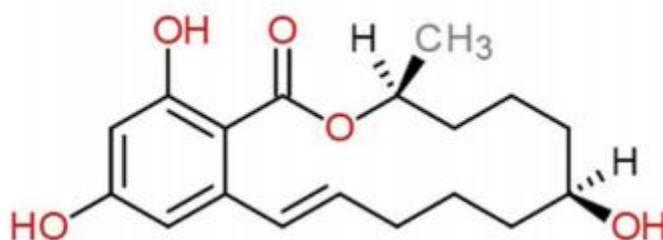
As espécies de *Fusarium* sobre determinadas condições produzem mais de 150 derivados de ZEA, como α -zearalenol e β -zearalenol (Figura 7 e 8), que são encontrados em doses extremamente baixas ainda no campo, porém essas substâncias são produzidas durante a metabolização da ZEA em organismos de mamíferos (GAJECKA et al., 2012).

Figura 7: Estrutura química do α -zearalenol.



Fonte: Buranatrigoool et al. (2015).

Figura 8: Estrutura química do β -zearalenol.



Fonte: Buranatrigoool et al. (2015).

A estrutura química da ZEA e de seus principais metabólitos é similar com a estrutura química do 17 β -estradiol, e possuem afinidade pelos receptores estrogênicos (CHEN et al., 2015). Por essa razão a ZEA é considerada uma micotoxina estrogênica, compete com 17 β -estradiol pela ligação com os receptores de estrogênio, sendo distribuída em tecidos que possuam receptores de estrogênio, como útero, vagina, células intersticiais do testículo e folículos ovarianos (ZATECKA et al., 2014).

A distribuição dos receptores estrogênicos é um tema contraditório, já que estão distribuídos de forma irregular nos tecidos. Receptores α estrogênicos estão presentes nos ossos, nas glândulas mamárias, no sistema urinário, reprodutivo, cardiovascular e nervoso. Já os receptores β estrogênicos estão presentes no sistema reprodutor e digestivo. Esses receptores desempenham uma função diferente em processos de proliferação e diferenciação em tecidos alvos. Os receptores β estrogênicos modulam os receptores α estrogênicos, inibindo a proliferação dependente de estrogênio e promovendo apoptose. A ZEA e seus metabólitos são agonistas dos receptores α estrogênicos e parcialmente antagonistas dos receptores β estrogênicos (Gajecka et al., 2016).

A ZEA e seus metabólitos interagem diretamente com os receptores citoplasmáticos do 17 β estradiol e há translocação dos sítios receptores para o núcleo. No núcleo ocorre estimulação de RNA que desencadeia a síntese de proteínas, causando os sinais clínicos de estrogenismo (MOSTROM, 2012).

A ZEA e seus componentes como descrito anteriormente possuem alta afinidade de pelos receptores estrogênicos, agem nesses receptores para ativar a transcrição dos genes estrogênicos responsivos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A ZEA também aumenta a expressão de GRP78 (proteína 78 reguladora de glicose) e CCAAT (potencializador de proteína homóloga de proteína de ligação – CHOP), dois genes marcadores relacionados com o estresse dos receptores estrogênicos. ZEA pode induzir fatores de apoptose e como também outros fatores que induzem morte celular. Além disso, α -zearalenol e β -zearalenol podem induzir perda do potencial de membrana mitocondrial, como também fatores de indução de apoptose e liberação citoplasmática do citocromo (JI et al., 2017).

Os suínos são muito sensíveis à ingestão da ZEA, e também há efeitos deletérios severos em ratos e camundongos. Após o consumo de ração contaminada pela ZEA, essa toxina é rapidamente absorvida, estima-se que entre 80 a 85% seja absorvido, e rapidamente distribuída pela corrente sanguínea (MALLMANN e DILKIN, 2007; ZATECKA et al., 2014). A ZEA é metabolizada principalmente no fígado, porém há metabolização nas células da granulosa (no ovário) e na mucosa intestinal de suínos, sendo reduzida em α e β zearalenol, zearalanona, α e β zearalanol (FRIZZELL et al., 2015; MARIN et al., 2011). Existem diferenças na biotransformação entre as espécies. Os suínos convertem a ZEA principalmente em α zearalenol, que possui maior afinidade pelos receptores estrogênicos. Os metabólitos da ZEA possuem maior toxicidade que a própria ZEA, a toxicidade é classificada da seguinte forma: zearalanona > β zearalenol > α zearalenol > ZEA (MARIN et al., 2011). No entanto, segundo Frizzell et al. (2015), α zearalenol possui o maior potencial estrogênico, seguido pela ZEA, sendo que a ZEA é 70 vezes menos estrogênica que α zearalenol.

A biotransformação da ZEA ocorre primeiro através da hidroxilação que resulta na formação de α e β zearalenol, por reações catalisadas por 3 α e 3 β desidrogenase hidroxisteroide. Após, há conjugação da ZEA e de seus metabólitos com o ácido glucurônico, reação catalisada pela glucuronil-difosfato-uridina-transferase (TEIXEIRA et al., 2011; ZINEDINE et al., 2007).

A conjugação da ZEA e de seus metabólitos com o ácido glucurônico facilita a eliminação dessa micotoxina pela urina e pelas fezes. Esses compostos também são eliminados pela bile, no entanto devido ao ciclo enterohepático há um prolongamento da meia vida da ZEA

e diminuição da sua excreção (FRIZZELL et al., 2015). Estima-se que a meia vida da ZEA e de seus metabólitos são de 87 horas, quando doses moderadas são consumidas (MALLMAN e DILKIN, 2007).

Os sinais e sintomas em suínos decorrentes da ingestão da ZEA variam de acordo com a dose, com o sexo, o tempo de exposição e a fase reprodutiva (ZATECKA et al., 2014). De modo geral, em fêmeas suínas a ZEA está associada com o hiperestrogenismo caracterizado pelo edema da vulva e aumento do peso dos órgãos do trato reprodutivos, e ainda há diminuição da fertilidade, redução do tamanho da leitegada, aborto, prolapso retal e vaginal, nascimento de leitões fracos e alteração nos níveis de progesterona e estradiol (BENZONI et al., 2008; CHATOPADHYAY et al., 2012; DUMITRESCU et al., 2014; MARIN et al., 2011).

Poucos estudos abordam os efeitos da ZEA sobre parâmetros zootécnicos de suínos, essa toxina e seus metabólitos não diminuem a taxa de crescimento e/ou desempenho produtivo, efeitos deletérios de performance produtiva apenas ocorrem quando há contaminação da ZEA e deoxinivalenol (OLIVER et al., 2012).

Leitoas pré-púberes são as mais sensíveis ao consumo de ZEA, doses a partir de 0,2 ppm já são suficientes para desencadear sinais clínicos de hiperestrogenismo (BENZONI et al., 2008). O aumento do tamanho da vulva é o sinal clínico clássico em leitoas pré-púberes, sendo bem elucidado na literatura (Figura 9). Além disso, há aumento do peso total dos órgãos do trato reprodutivo, e maior desenvolvimento das glândulas endometriais (GAJECKA et al., 2011; OLIVER et al., 2012).

Figura 9: Edema vulvar: a) leitoa pré-púbera do grupo controle (0,0 ppm de ZEA) e b) leitoa pré-púbera intoxicada com 0,25 ppm de ZEA.



Fonte: Arquivo pessoal (2012).

O limite de tolerância para que não haja sintomatologia clínica em leitoas é uma dose de aproximadamente 0,05 ppm por Kg de ração (OLIVER et al., 2012). Leitoas pré-púberes são sexualmente imaturas e por essa razão possuem níveis basais de estrogênio. A ZEA provoca alta expressão de RNA mensageiro e níveis altos de proteínas nos receptores estrogênicos nas células alvo do sistema reprodutivo. Logo, há uma elevada concentração inter-orgânica de um análogo exógeno do estrogênio em comparação com o estrogênio endógeno produzido pelo organismo, ocorrendo queda da atividade do estrogênio endógeno seguido de biotransformações modificadas de substâncias endógenas, incluindo hormônios sexuais, em nível local e sistêmico. E ainda há modificação nos níveis de expressão e de atividade do percurso de enzimas esteroidogênicas (CAMARGO et al., 2009; GAJECKA et al., 2012).

O consumo de ZEA interfere nos níveis normais de hormônios, podendo interferir na síntese e no metabolismo de hormônios esteroides, afetando a sinalização hormonal normal, resultando em um desequilíbrio endócrino. Essa toxina ainda pode causar alteração no eixo

ovário hipotálamo-pituitária, como também suprime a secreção de FSH (hormônio folículo estimulante) nos ovários, quanto maior a concentração de ZEA menor será o nível FSH no soro sanguíneo (CHEN et al., 2015).

Outro ponto importante com relação a alteração endócrina, a ZEA funciona como um substrato competitivo por enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo de hormônios esteróides. E ainda, α e β zearalanol interferem na síntese de progesterona em cultivo de células da granulosa de fêmeas suínas, de acordo com sua fase reprodutiva, idade e concentração desta micotoxina (CHEN et al., 2015).

Doses de 200 ppb de ZEA por Kg de peso vivo em leitões sexualmente imaturas desencadeiam processos de apoptose nas camadas das células da granulosa de folículos mais desenvolvidos, como também atresia folicular (MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008). Já em matrizes suínas em idade reprodutiva os efeitos deletérios também incluem alterações reprodutivas, como pseudogestação, atrofia ovariana e mudanças no endométrio. Ensaios *in vivo* com concentrações 25 a 100 ppm de ZEA por Kg de ração fornecida a fêmeas multíparas provocou estro prolongado, pseudogestação e infertilidade (CORTINOVIS et al., 2013; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008).

A infertilidade ocorre devido aos efeitos da ZEA nos ovários, os folículos maduros sofrem degeneração, por mais que haja sinais de estro, não há ovulação. A ZEA funciona de forma similar ao estradiol inibindo a liberação de hormônio folículo-estimulante (FSH), dessa forma deprime a maturação dos folículos ovarianos durante a fase pré-ovulatória (CORTINOVIS et al., 2013; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008). Em fêmeas suínas gestantes, a exposição a ZEA é um fator determinante, que pode provocar aborto ou morte embrionária. O consumo de 1 ppm de ZEA por Kg de peso vivo, fornecido na ração durante sete a dez dias após a inseminação artificial (IA) não interferiu na gestação. Quando o consumo ocorreu dois dias após a IA, houveram alterações degenerativas nos embriões, essas alterações se tornam mais severas após o 13º dia após a IA. Durante a gestação, a ZEA reduz a sobrevivência embrionária, como também diminui o peso dos fetos. Existe transferência da ZEA e de seus metabólitos através da placenta, que provocam efeitos teratogênicos nos fetos, e ainda a leitegada pode nascer com sinais clínicos de hiperestrogenismo (MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008).

Em machos suínos, a ZEA diminui em 30% o peso dos testículos, como também reduz a fertilidade pois induz diminuição da qualidade, da viabilidade espermática e da espermatogênese. Em cachos jovens, o consumo de ZEA diminui os níveis de testosterona, da libido e induz feminização. Em contrapartida nos cachos adultos, a ZEA não provoca efeitos deletérios no potencial reprodutivo dos animais (CORTINOVIS et al., 2013; FARNWORTH e TRENHOLM, 1983; MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008).

Foi realizado um experimento *in vivo* com cachos adultos, com duração de 55 dias, esses animais foram expostos a 1 ppm de ZEA por Kg de ração. Ao final desse experimento, não foi observado efeito deletério na espermatogênese dos animais intoxicados. Ensaios *in vitro* também foram feitos e indicaram que a ZEA diminui a motilidade e viabilidade de células espermáticas de suínos. Pesquisadores ainda relatam que a ZEA diminui a capacidade dos espermatozoides de se ligarem a zona pelúcida, como também provoca danos na cromatina da célula espermática, interferindo na fertilização e no desenvolvimento embrionário normal (CORTINOVIS et al., 2013; KLINEFELTER e HESS, 1988; LIU et al., 2014).

Alguns estudos mostram que ZEA e os seus metabólitos interferem no potencial endócrino, em nível de sinalização dos receptores nucleares e com isso há alteração na produção de hormônios como a testosterona; outros provaram que a ZEA reduz a secreção de testosterona tanto *in vivo* como *in vitro*. Sendo assim, essa toxina influencia na expressão de algumas enzimas produtoras de esteroides a nível de RNA mensageiro (LIU et al., 2014). A ZEA se liga

nos receptores estrogênicos dos testículos, interferindo no fator de transcrição do crescimento, da proliferação e da diferenciação celular (CHEN et al., 2015).

A ZEA e α zearalanol inibem de forma significativa a secreção de testosterona induzida por gonadotrofina coriônica, em humanos. Essa inibição está associada com a diminuição da transcrição de esteróide dehidrogenase 3 β -hidroxi, de enzimas de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 e de proteínas reguladoras esteroidogênicas (CHEN et al., 2015).

A toxicidade da ZEA ainda inclui genotoxicidade, imunotoxicidade, sendo também carcinogênica. A genotoxicidade induz a formação de adutos e fragmentação no DNA (LIU et al., 2014). Com relação aos efeitos deletérios no sistema imune, há um aumento da síntese de citocinas inflamatórias e inflamação crônica no trato reprodutivo de suínos. A ZEA em diferentes concentrações reduz os níveis de interferon produzidos pelo baço. No entanto, poucos estudos abordam essa temática, sendo que a maioria das pesquisas são feitas em ratos ou camundongos, e os resultados ainda são inconsistentes (PIERON et al., 2016; REN et al., 2016).

2.4 Aditivo Anti-Micotoxina

As estratégias adotadas como boas práticas agrônômicas que impedem a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos não são eficientes. Além disso, uma vez que haja produção de micotoxinas é muito difícil reduzir a concentração desses metabólitos nos grãos e nos seus subprodutos (BRYDEN, 2012).

Alguns métodos foram desenvolvidos visando à diminuição dos efeitos deletérios causados pelo consumo das micotoxinas para a produção animal, em geral, através da diminuição da contaminação do alimento, detoxificação do alimento e por produtos que impeçam a absorção das micotoxinas pelo trato digestivo dos animais (CARÃO et al., 2014). A diminuição da contaminação de grãos e/ou dos seus subprodutos pode ocorrer através da diluição com outro substrato que não esteja contaminado. Esse é um método simples, porém em muitos países essa prática não é permitida, e o seu sucesso depende do grau de contaminação e da disponibilidade de um grão que não esteja contaminado (BRYDEN, 2012).

A detoxificação do alimento se dá através de métodos físicos e químicos (ARMANDO et al., 2012). Dessa forma, a micotoxina deve ser inativada em compostos não tóxicos, os fungos se ainda estiverem presentes devem ser inativados para que não haja produção de mais micotoxina. O grão, o subproduto e/ou a ração devem permanecer com seu valor nutritivo, não havendo alteração de suas características, e devem continuar sendo palatáveis (CARÃO et al., 2014).

Os métodos físicos incluem a utilização de solventes e tratamentos térmicos, como o uso de aquecimento (extrusão). Com relação aos solventes, normalmente, se utilizam etanol a 95%, acetona aquosa a 90%, isopropanol a 80%, hexanometanol, metanol-água, acetronitrila-água, hexanoetanol-água e acetona-hexano-água. A utilização desses solventes remove as micotoxinas e não há redução do valor nutritivo do alimento. No entanto, esse é um método caro e há grandes problemas relacionados ao descarte dessas substâncias químicas (ARMANDO et al., 2012; CARÃO et al., 2014).

Com relação ao tratamento térmico, sempre será dependente do nível de contaminação do produto, da temperatura utilizada no substrato, o tempo de exposição, umidade, pH e concentração iônica do alimento. A extrusão também faz parte do tratamento térmico, sendo um método muito utilizado na indústria, que inativa as micotoxinas através de um processamento de cozimento por extrusão, utilizando temperaturas severas. Porém, não são todos os grãos que podem ser extrusados. A irradiação também é um método físico que utiliza três tipos de energia ionizante, como a radiação gama, feixe de elétrons ou raios-X (CARÃO et al., 2014).

Já nos métodos químicos são utilizados gás amoníaco, hidróxido de amônia, solução líquida de hidróxido de sódio e ácido propiônico. A utilização desse método possibilita que as micotoxinas sejam reduzidas a compostos menos tóxicos, contudo são técnicas pouco práticas, inseguras, que necessitam de equipamentos caros e reduz a qualidade nutricional e sensorial do grão e/ou do seu subproduto (ARMANDO et al., 2012; CARÃO et al., 2014).

Aditivos anti-micotoxinas (AAM) são produtos incluídos nas dietas dos animais, que são capazes de adsorver, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas, ainda no trato gastrointestinal dos animais, dessa forma há redução dos seus efeitos deletérios (ARMANDO et al., 2012; CARÃO et al., 2014; KELLER et al., 2012). Aditivos anti-micotoxinas devem reduzir os níveis de micotoxinas no sangue de forma que não haja interferência no desempenho produtivo e/ou reprodutivos dos animais. Logo, os adsorventes têm como atribuição evitar as micotoxicoses (ZAVIEZO, 2006). Além disso, a utilização de AAM é uma alternativa viável que garante que não haja resíduos de compostos químicos no meio ambiente, não havendo nenhum tipo de impacto ambiental, sendo uma alternativa segura, viável e econômica (SELIM et al., 2014).

De acordo com a Portaria nº 13 de 24 de Maio de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi proposto ao Ministério pelo grupo técnico de trabalho sobre micotoxinas em alimentação animal a substituição do termo “adsorvente de micotoxinas” pela denominação geral “Aditivos anti-micotoxinas” (AAM). Para serem considerados AAM e entrarem no mercado, produtos novos devem passar por ensaios individuais *in vitro* e *in vivo* a fim de garantir a seguridade, capacidade e inocuidade do produto em relação à saúde animal (BRASIL, 2006).

Muitas substâncias estão sendo estudadas nos últimos 15 anos e estão sendo utilizadas como produtos adsorventes incluídos na ração dos animais. As substâncias adsorventes podem ser inorgânicas ou orgânicas (CARÃO et al., 2014; JOUANY, 2007).

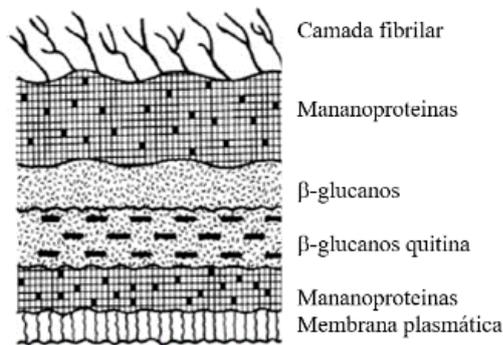
Aluminossilicatos de sódio e cálcio hidratados são exemplos de AAM inorgânicos (CARÃO et al., 2014; JOUANY, 2007), assim como silicatos e aluminossilicatos que são argilas, e ainda há aluminossilicato de magnésio hidratado. Bentonitas e zeólitas são argilas especiais de origem vulcânica. Argilas modificadas com uso de permutas catiônicas também são utilizadas como AAM inorgânicos. Todos esses compostos possuem poros inorgânicos que contém anéis tetraedros de silicato, havendo moléculas de carga positiva e negativa. Dessa forma, as micotoxinas são adsorvidas pelos poros, e ficam ligadas por cargas elétricas (JOUANY, 2007).

As pesquisas feitas com adsorventes inorgânicos mostram alguns resultados positivos, como agentes ligantes às aflatoxinas em experimentos com aves. A capacidade de adsorção é dependente do tamanho da molécula e da carga elétrica da micotoxina, e da estrutura da argila. No entanto, sua eficácia não foi comparada em experimentos com outras micotoxinas, como as fumonisinas e ZEA. Além disso, outros estudos mostram que as argilas adsorvem micronutrientes e possuem efeitos na biodisponibilidade de minerais. E ainda, existem pesquisas que relatam que argilas naturais podem estar contaminadas com dioxinas (JOUANY, 2007).

Portanto, a eficácia dos AAM inorgânicos é relativa, sendo que muitos estudos comprovam que esses produtos não são bons agentes adsorventes de micotoxinas. Logo, uma nova abordagem vem sendo estudada, que são os adsorventes orgânicos. Em 1980, pesquisadores estudaram que fibra de aveia era capaz de reduzir os efeitos tóxicos da ZEA em ratos, porém o mecanismo de ação de como esse efeito de atenuação dos sinais clínicos de hiperestrogenismo acontecia não foi elucidado. Posteriormente, foram feitas pesquisas que apontavam que frações da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* possuíam ampla capacidade de adsorção as micotoxinas. Cepas de *S. cerevisiae* são utilizadas pois são consideradas seguras (ARMANDO et al., 2012; JOUANY, 2007).

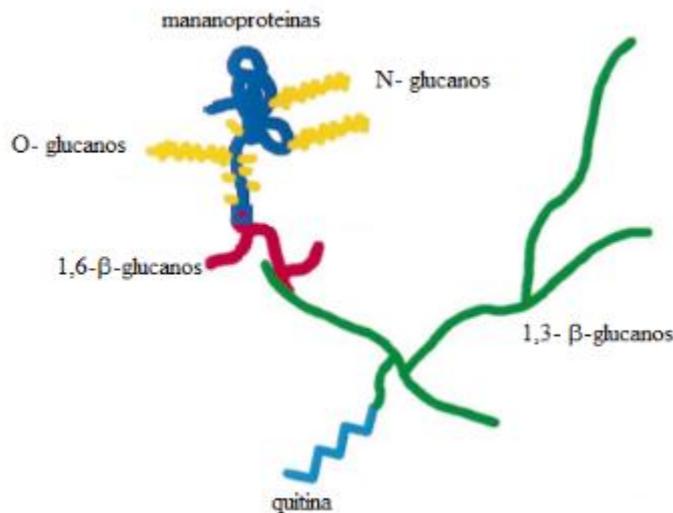
A parede celular de levedura (PCL) está presente em todas as leveduras e funciona como uma proteção física e osmótica. A parede celular garante a estrutura e forma de *S. cerevisiae* durante a formação de pseudohifa e reprodução, e mede 110-200 nanômetros. A PCL é composta de 1,3- β -glucanos e 1,6- β -glucanos e quitina (Figura 10), que juntos constituem de 50-60% do peso seco da parede celular. A outra camada da PCL é formada por mananoproteínas glicosiladas, que são responsáveis pelo reconhecimento célula-célula. Esses componentes estão cruzados em vários sentidos, ligados por ligações covalentes (Figura 11). A parede celular representa 15-30% do peso seco da célula total (ORLEAN, 2012; YIANNIKOURIS et al., 2004; ZHANG et al., 2016).

Figura 10: Esquemática dos componentes da parede celular *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Kogan e Kocher (2007).

Figura 11: Relação entre os componentes de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Lipke e Ovalle (1998).

Os β 1-3, 1-6 glucanos são oligossacarídeos constituídos por monômeros de glicose ligados entre si por meio de ligações β -glicosídicas e separados em frações de acordo com a sua solubilidade. Essas frações possuem quantidades diferentes de β glucanos (ORLEAN, 2012).

O mecanismo envolvido no processo de adsorção das micotoxinas à PCL ainda é pouco conhecido. Alguns pesquisadores relatam que haja uma correlação entre a quantidade de β glucanos e eficácia de ligação às micotoxinas. Estudos feitos com ZEA, aflatoxina B₁, deoxinivalenol mostraram capacidade de adsorção dessas toxinas pelos componentes da parede celular. Por outro lado, pesquisas atribuem que cepas vivas de leveduras são capazes de biodegradar as micotoxinas (ARMANDO et al., 2012; WANG et al., 2012).

Estudos *in vitro* com parede celular de *S. cerevisiae* mostraram que existe uma capacidade de adsorção com as micotoxinas de forma dose dependente, porém há saturação quando não existem mais pontos de ligação disponíveis. A capacidade de adsorção dos mananoligossacarídeos nesse experimento foi de 95%, as micotoxinas que tiveram maior resposta de ligação a PCL foram ZEA e FB₁ (SHETTY e JESPERSEN, 2006).

Parede celular de *S. cerevisiae* possui uma capacidade considerável de adsorção à ZEA, β -glucanos são os principais componentes envolvidos nesse papel de ligação. No entanto, os glucomanos também possuem capacidade de ligação, indicando que existem mais de um alvo no mecanismo de ligação aos componentes da parede celular (SHETTY e JESPERSEN, 2006).

Alguns estudos confirmam que a redução dos efeitos tóxicos decorrentes da ingestão de micotoxinas, quando adicionados na dieta de animais AAM a base de parede celular de *S. cerevisiae* ocorre por adesão aos componentes da PCL ao invés de ocorrer por meio de ligações covalentes ou pelo metabolismo da levedura. Por mais que só haja parede celular, não havendo célula viva, não ocorre uma perda da capacidade de ligação (SHETTY e JESPERSEN, 2006).

Resultados de ensaios *in vivo* com animais de produção utilizando PCL de *S. cerevisiae* mostraram que houve uma melhora no desempenho zootécnico, de parâmetros hematológicos, enzimas hepáticas, creatinina, proteínas plasmáticas quando comparados aos grupos de animais que consumiram somente AFB₁. Nesse estudo os resultados indicam efeito significativo da capacidade de adsorção de micotoxina. E ainda, estudo com frangos de corte mostraram que houve capacidade de ligação de 77% das micotoxinas a PCL de *S. cerevisiae*, quando ocorreu a utilização de mananos oligossacarídeos modificados a capacidade de ligação as micotoxinas foi de 95% (SELIM et al., 2014).

Além disso, cepas de *S. cerevisiae* também estão sendo utilizadas como prebióticos (PCL) e probióticos (células vivas) por serem ricas em vitaminas e aminoácidos que favorecem a microbiota intestinal benéfica. Logo, *S. cerevisiae* possui componentes que fortalecem o sistema imune e as defesas dos animais, favorecendo o desempenho zootécnico de animais de produção (SELIM et al., 2014).

A principal característica das leveduras é a reprodução rápida na presença de açúcares, sendo assim, organismos fermentadores. A biomassa de leveduras é utilizada na produção de fermentos para panificações, de indústrias de bebidas fermentáveis, como cerveja e vinhos. Logo, possuem grande importância industrial, pois possuem ampla variedade de componentes úteis (COSTA, 2004).

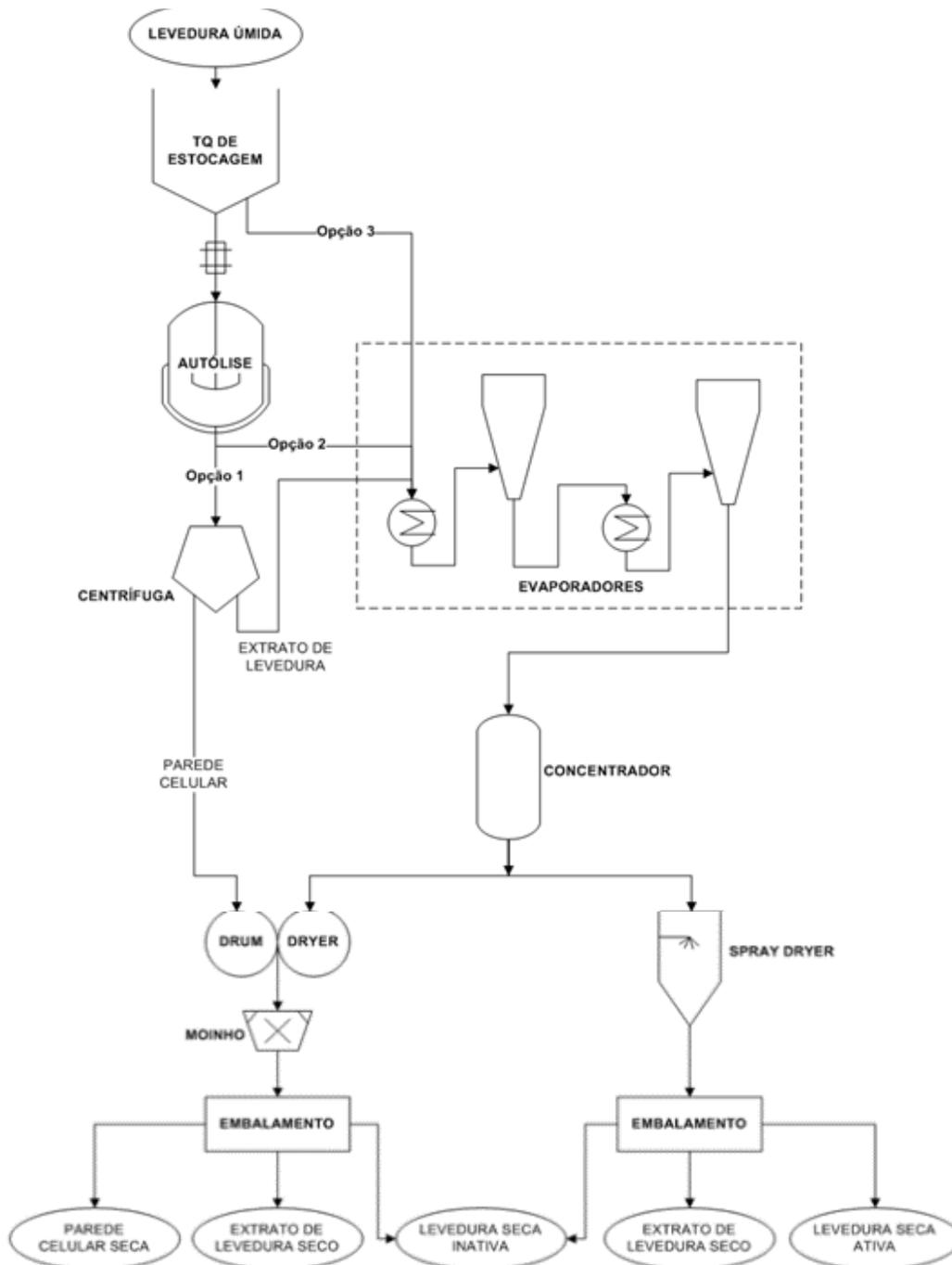
A utilização da biomassa de leveduras pode ser de forma integral, ativa ou inativa, ou de apenas alguns componentes, como parede celular total ou de alguns dos seus conteúdos. Na forma ativa as leveduras são usadas nos processos fermentativos de indústrias para produção de bebidas alcoólicas e na panificação. As leveduras ativas ou vivas, também podem ser fornecidas aos animais na alimentação, como probióticos que favorecem a saúde do trato gastrointestinal. As leveduras não são organismos que fazem parte da microbiota intestinal, não se aderem no epitélio intestinal, mas favorecem a microbiota benéfica, diminuindo a pressão exercida pelos microrganismos patogênicos (COSTA, 2004).

Na forma inativa, as leveduras podem ser usadas na alimentação humana e animal, devido ao seu teor nutricional, alto teor de proteína, vitaminas do complexo B e minerais. As leveduras inativadas ou autolisadas se abrem e geram dois subprodutos que são separados por centrífugas, o extrato de levedura e a parede celular. O extrato de levedura é solúvel e rico em

proteínas, já a parede celular é insolúvel, separada do extrato de levedura, torna-se seca e é ensacada na forma de pó para ser utilizada na dieta de animais de produção (ARAÚJO, 2014; COSTA, 2004).

As leveduras são recebidas das indústrias de bebidas alcoólicas e de panificação. As leveduras são armazenadas, havendo controle da temperatura para que não haja nenhuma interferência negativa na sua qualidade. O fluxograma (Figura 12) a seguir mostra de forma didática todo o processo para obtenção da parede celular (ARAÚJO, 2014; COSTA, 2004).

Figura 12: Fluxograma do sistema de obtenção de Parede Celular de Levedura.



Fonte: <http://www.motrice.ind.br/?id=133> (2013).

O produto final em pó pode ser obtido através de dois equipamentos: o Drum Dryer ou o Spray Dryer. O que determinará qual equipamento será utilizado é o produto final a ser adquirido (ARAUJO, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I (Leitoas Pré-Púberes)

3.1.1 Local do experimento

O local do ensaio *in vivo* foi o Setor de Suinocultura (Figura 13) pertencente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado na cidade de Seropédica/RJ.

Figura 13: Galpão do ensaio *in vivo*.



Fonte: Arquivo pessoal (2012).

3.1.2 Unidades experimentais

Foram utilizadas 48 leitoas pré-púberes Topigs (Reprodutor: Topigs Tyboar; Matriz: Topygs C40), que foram recebidas com trinta e 34 de idade, com peso inicial médio de 8 Kg, as quais foram alojadas em baias do tipo suspensa. Os animais adquiridos estavam vacinados contra os agentes causadores de doenças: *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actynobacillus pleuropneumoniae*.

3.1.3 Produção do núcleo de contaminação por ZEA

O núcleo de ZEA foi produzido no laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM), situado no Projeto Sanidade Animal (PSA), convênio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Utilizou-se a cepa de *Fusarium graminearum* UNC 3639, mantida em placa de Petri em meio BDA (agar batata dextrose) (Figura 14).

Figura 14: *Fusarium graminearum* cultivado em placa de Petri.



Fonte: Arquivo pessoal (2012).

A ZEA foi produzida através da fermentação controlada tendo o arroz branco polido como substrato de acordo com Jiménez et al. (1996). Realizou-se uma solução de água destilada com os esporos fúngicos cultivados, que foi adicionada ao arroz.

Após um período de 30 dias (Figura 15), todo o núcleo foi autoclavado, com o objetivo de inativar os esporos fúngicos, para se obter apenas a micotoxina. Após ser autoclavado, o núcleo foi posto em estufa de secagem a 50°C, durante 15 dias, e triturado. Posteriormente, todo o núcleo foi acondicionado em embalagens plásticas atóxicas, embalado a vácuo e armazenado em freezer, até a sua utilização.

Figura 15: Arroz com cultivo de *Fusarium graminearum*.



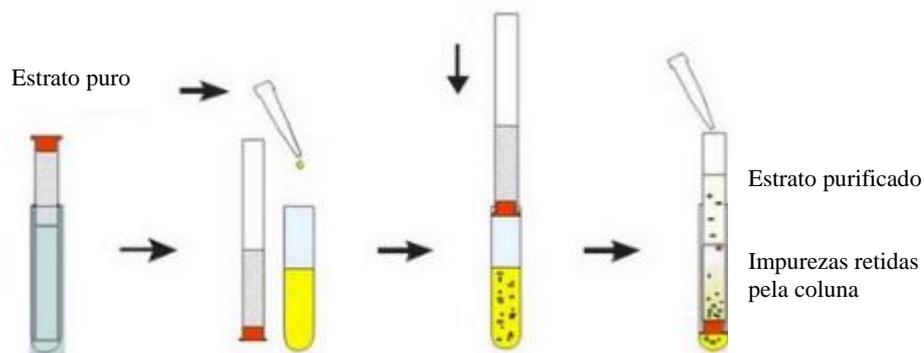
Fonte: Arquivo pessoal (2012).

3.1.4 Extração e quantificação da ZEA

Foi feita uma solução de acetonitrila e água destilada (84 mL de acetonitrila e 16 mL de água destilada), com 25 gramas do núcleo de ZEA. Esta solução foi colocada em *shaker* por 40 minutos, posteriormente, filtrada em papel filtro QUANTY®JP40 12,5 cm. Após a filtragem,

foi retirado 5 mL do filtrado, posto em tubo de ensaio, com mais 50 µl de ácido acético glacial. Posteriormente, houve a purificação (Figura 16) pela coluna de extração MYCOSEP® 226 AFLAZON+ (RomerLabs®) e retirou-se 2 mL do extrato, para a determinação da concentração através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Figura 16: Esquematização da purificação do extrato contendo a micotoxina.



Fonte: <http://www.romerlabs.com/en/products/mycotoxins/mycosep-multisep>

3.1.5 Contaminação da ração experimental

O núcleo foi acrescentado à ração das leitoas na devida proporção, através de um misturador mecânico tipo “Y” (Figura 17), a fim de se obter a concentração de 0,25; 0,6 e de 2,0 ppm de ZEA por Kg de ração.

Figura 17: Misturador mecânico tipo “Y”.



Fonte: Arquivo pessoal (2012).

3.1.6 Aditivo anti-micotoxina

O produto comercial à base de PCL utilizado como AAM no estudo foi o Safwall® (Safwall®, comercializado pela empresa Phileo Lesaffre Animal Care Ltda, São Paulo, Brasil). Trata-se de um produto totalmente livre de resíduos de antibióticos, metais pesados, produtos químicos, e contaminantes microbianos, que apresenta a seguinte composição química:

umidade 5% máx., proteína 28% máx., fósforo 1% mín., β -glucanos 23% mín., MOS 21% mín., matéria seca 95% mín., gordura 20% mín. e cinzas 4% máx. Em sua composição física apresentou-se coloração creme a dourado, odor típico de levedura e sem evidências de impurezas. O nível de inclusão utilizado no experimento seguiu a dose máxima recomendada para o produto pelo fabricante, isto é 2 g Kg^{-1} ou 0,2%.

3.1.7 Delineamento experimental

Os animais passaram por um período de sete dias de adaptação, e o período experimental foi de 21 dias. As leitoas foram distribuídas em delineamento experimental de blocos ao acaso, em um total de oito tratamentos. Cada tratamento tinha seis animais distribuídos em três baias (dois animais por baia) (Figura 18). Os tratamentos consistiram de:

T01 = Dieta com 0 ppm de ZEA e 0,0% de AAM

T02 = Dieta com 0 ppm de ZEA e 0,2% de AAM (2,0 Kg/ton)

T03 = Dieta com 0,25 ppm de ZEA e 0,0% de AAM

T04 = Dieta com 0,25 ppm de ZEA e 0,2% de AAM (2,0 Kg/ton)

T05 = Dieta com 0,6 ppm de ZEA e 0,0% de AAM

T06 = Dieta com 0,6 ppm de ZEA e 0,2% de AAM (2,0 Kg/ton)

T07 = Dieta com 2,0 ppm de ZEA e 0,0% de AAM

T08 = Dieta com 2,0 ppm de ZEA e 0,2% de AAM (2,0 Kg/ton)

A proporção de zearalenona utilizada, o número de animais por tratamento e todas as análises estavam de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dentro da Portaria nº 13 de 24 de Maio de 2006, inclusive, a porcentagem de adsorvente usada seguiu as recomendações do fabricante.

Figura 18: Fêmeas alojadas nas baias.



Fonte: Arquivo pessoal (2012).

3.1.8 Manejo

Cada baia era provida de bebedouro do tipo chupeta e comedouro semi automático, onde as fêmeas receberam água e ração à vontade. As leitoas foram pesadas após o recebimento e distribuídas nas unidades experimentais. Os animais foram monitorados diariamente, três vezes ao dia, ao longo de todo o experimento. Além disso, realizou-se o monitoramento diário da

temperatura (termometro data logger portátil) no local do experimento, com o registro das temperaturas máxima, mínima e atual.

A área experimental dispunha de cortinas, para o controle da ventilação, levando em consideração o conforto térmico dos animais para a fase de creche. E ainda, utilizou-se o sistema de iluminação contínuo da sala, com 24 horas de luz, natural e/ou artificial. Vale mencionar que as baias eram limpas diariamente, com auxílio de pá e vassoura, e pelo menos duas vezes na semana, as baias eram lavadas com lavadora de alta pressão.

3.1.9 Dieta

A dieta utilizada foi formulada atendendo as exigências nutricionais da fase de creche. A composição nutricional encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6: Composição da dieta utilizada durante o período experimental (fase de creche)*.

Ingredientes	Unidade	Fase Inicial (creche)
Milho	Kg	642,93
Farelo de Soja	Kg	280,00
Farinha de Carne	Kg	42,00
Óleo	Kg	23,00
Sal	Kg	5,00
Calcário	Kg	2,00
Lisina	Kg	1,80
Microminerais	Kg	1,00
Vitaminas	Kg	1,00
Metionina	Kg	0,70
Colina 60%	Kg	0,37
Coxistac**®	Kg	0,20
TOTAL	Kg	1000

* Dados fornecidos pelo fabricante ** Coxistac® 12%: anticoccidiano

3.1.10 Abate

No 21º dia de experimento todos os animais foram abatidos, três animais de cada tratamento, tendo sido respeitado o período médio de seis horas de jejum alimentar e dieta hídrica. A insensibilização foi feita por eletronarcese, seguindo os princípios do abate humanitário. Realizou-se a laparotomia para a retirada dos órgãos do trato reprodutor, fígado e rins, para análise histopatológica e histomorfométrica.

3.1.11 Processamento do material para exame histopatológico e histomorfométrico

Todo o processamento e análise histopatológica, e histomorfométrica foi realizado na Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os órgãos coletados primeiramente foram acondicionados em formol 10% tamponado nas primeiras 24 h, e após, em álcool 70%, a fim de inativar as enzimas, conservando assim a estrutura celular mais próxima de como se apresentam *in vivo*, sem a ação autolítica celular. As amostras do fígado, dos rins, da vagina proximal e distal; do útero proximal, médio e distal; do ovário direito e esquerdo das três fêmeas de cada tratamento foram armazenadas até o processamento.

A clivagem foi realizada em todos os fragmentos coletados, no que se refere à vagina, foi clivado aproximadamente 0,5 cm de diâmetro abrangendo todas as camadas desse órgão, obtidos da porção proximal e distal em relação a vulva. Os fragmentos uterinos cortados foram de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, abrangendo todas as camadas uterinas, obtidos da porção proximal, média e distal em relação a cervix. Os ovários (direito e esquerdo) foram cortados medial-longitudinalmente. No que concerne aos demais órgãos, fígado e rins foram seccionados e obtidos dois fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de cada órgão.

Na etapa de diafanização, os fragmentos passaram por um tratamento em solução composta por álcool/xilol (50:50), xilol I e xilol II, sendo que o tempo de processamento em cada uma das etapas foi de uma hora, trinta minutos e trinta minutos, respectivamente. Imediatamente após a retirada do xilol II, os fragmentos dos órgãos foram embebidos em parafina histológica líquida (estufa a 60°C), passando por uma bateria de parafina I, parafina II e parafina III, a temperatura de 60°C. O material processado permaneceu uma hora nesta etapa, sendo vinte minutos em cada bateria de parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo e foram obtidos cortes semifinos (5 µm). Os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina, segundo metodologia de Langeron (1949), com modificações. Após a parafina dos cortes ser removida por duas passagens, de trinta minutos cada, em recipientes contendo xilol, foi feita a hidratação em séries decrescentes de álcoois, permanecendo as lâminas por cinco minutos em cada álcool. Em seguida, após cinco minutos em água corrente, foi realizada a coloração pela hematoxilina e nova lavagem.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram transferidas para recipiente contendo eosina, lavadas em água e desidratadas, por sucessivas e rápidas passagens, em séries crescentes de álcoois. Para a diafanização do material recorreu-se a duas passagens em xilol, cada uma delas com cinco minutos de duração. A montagem das lâminas e das lamínulas foi realizada utilizando o Bálsamo do Canadá.

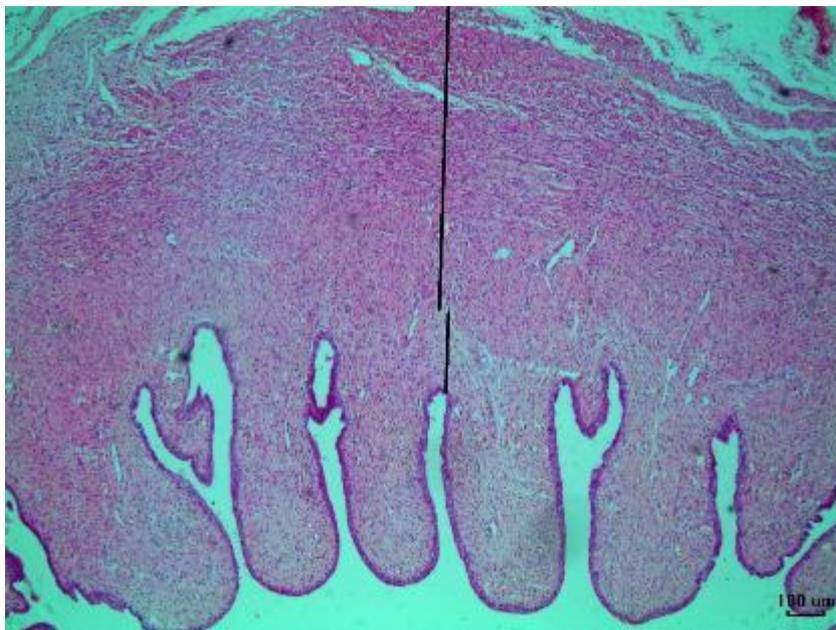
3.1.12 Análises histopatológicas e histomorfométricas

As análises histopatológicas foram feitas com apenas uma secção histológica dos órgãos do trato reprodutivo (vagina proximal e distal; útero proximal, médio e distal; ovário direito e esquerdo), e do fígado e dos rins das leitoas pré-púberes.

As avaliações histopatológicas foram realizadas em microscópio de luz Nikon Eclipse Ci[®], nas objetivas de 4x, 10x e 20x, acoplado ao sistema digitalizador de imagens e software Lumenera INFINITY[®].

No que se refere às análises histomorfométricas das leitoas pré-púberes, a partir da vagina, proximal e distal, e do útero proximal, médio e distal, foi utilizada uma secção histológica e desprezada outras três seções subsequentes, até totalizar quatro secções histológicas. Foram mensuradas as espessuras do epitélio, da mucosa (considerando apenas a base das pregas vaginais como ponto inicial das mensurações), da camada muscular (Figura 19) e da camada adventícia das duas porções da vagina. E ainda, foram mensuradas as espessuras do epitélio luminal, do endométrio (considerando apenas a base das projeções uterinas como ponto inicial das mensurações), do miométrio e do perimétrio, das três porções uterinas. Em cada secção histológica, foram feitas quatro medidas diametralmente opostas para todas as camadas histológicas descritas anteriormente nas duas porções da vagina e nas três porções uterinas. Portanto, a espessura de cada camada foi obtida pela média de 16 medidas. Para a mensuração do epitélio foi utilizada a objetiva de 10x e para as demais camadas foi utilizada a objetiva de 4x.

Figura 19: Fotomicrografia da vagina proximal, para visualização da mucosa e da camada muscular. HE. 20x.

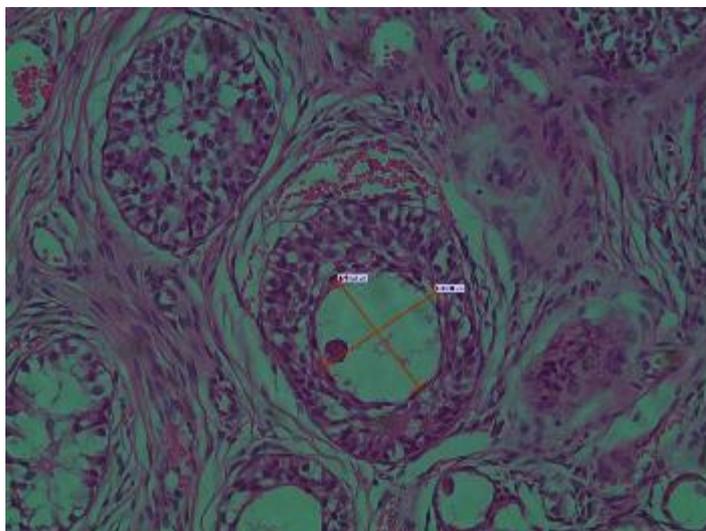


Fonte: Arquivo pessoal (2016).

Para a análise histomorfométrica do ovário direito e esquerdo foi utilizada uma secção histológica e desprezadas outras três subsequentes, até totalizar três secções histológicas. Foram considerados apenas folículos não atresícos. A mensuração foi realizada através do diâmetro folicular e do diâmetro oocitário (Figura 20), expressos pela média entre diâmetro maior e diâmetro mínimo dos folículos primordiais, folículos primários unilaminar e folículos primários multilaminar. A classificação dos folículos ovarianos foi de acordo com as descrições da Tabela 7, segundo Flaws et al. (1997).

Para cada classe de folículo ovariano foram analisados dez folículos, em cada secção. Portanto, as medidas do diâmetro folicular e do diâmetro oocitário para cada classe de folículo foi obtida pela média de 30 medidas. Para as mensurações dos folículos foi utilizada a objetiva de 20x. Não foi possível realizar a histomorfometria dos folículos ovarianos das fêmeas que foram intoxicadas com 2 ppm de ZEA (T07 e T08), por não haver o número suficiente de folículos não atresícos.

Figura 20: Fotomicrografia do folículo primário multilaminar, para visualização da mensuração do diâmetro oocitário. HE. 20x.



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

Tabela 7: Classificação dos tipos de folículos.

Tipos de folículos	
Folículo primordial	Oócito envolvido por uma camada de células foliculares pavimentosas
Folículo primário unilaminar	Oócito circundado por uma única camada de células foliculares cubicas
Folículo primário multilaminar	Oócito envolto por diversas camadas foliculares, mas sem a presença de antro e células da teca em torno do folículo
Folículo atrésico	Presença de núcleos picnóticos e/ou corpos apoptóticos entre as células da granulosa, separação das células da granulosa da membrana basal e alterações na forma do oócito

Fonte: Flaws et al. (1997).

Novamente, as avaliações histomorfométricas foram feitas no microscópio de luz Nikon Eclipse Ci® acoplado ao sistema digitalizador de imagens e software Lumenera INFINITY®.

3.1.13 Análises da bioquímica sérica

Cerca de 4 mL de sangue de cada animal, três leitoas de cada tratamento, foram coletados no momento da sangria, durante a secção dos grandes vasos. O sangue foi imediatamente transferido para tubos sem EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) para obtenção do soro, e estocado em freezer a -20°C, pois o congelamento tem mínimo efeito sobre os analitos que foram analisados.

As amostras foram centrifugadas a (500 x g) por 5 minutos para obtenção do soro. O soro de cada animal foi separado em microtubos e identificados. Sendo assim, foram analisados as seguintes enzimas nas leitoas pré-púberes: alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático CELM-SBA-200.

3.2 Experimento II (Leitões Pré-Púberes)

3.2.1 Local do experimento

O local do ensaio *in vivo* foi o Setor de Suinocultura pertencente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado na cidade de Seropédica/RJ.

3.2.2 Unidades experimentais

Foram utilizados oito leitões pré-púberes da linhagem Topigs, com idade inicial de 44 dias e peso inicial médio de $15 \pm 0,48$ Kg. Os animais foram alojados em baias do tipo suspensa, sendo dois animais alocados em uma baia. Os animais adquiridos foram vacinados contra os agentes causadores de doenças: *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actynobacillus pleuropneumoniae*.

3.2.3 Ensaio *in vivo* em leitões pré-púberes

A produção do núcleo de contaminação por ZEA, a extração e quantificação da ZEA, a contaminação da ração experimental, o manejo e a dieta seguiram os mesmos protocolos do ensaio *in vivo* das leitoas pré-púberes descritos anteriormente.

3.2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, sendo a baia a unidade experimental. Os animais foram alojados em baias do tipo suspensa, sendo dois animais alocados por baia (Figura 21). Os leitões passaram por um período de adaptação de sete dias, e o período experimental foi de 21 dias. Os tratamentos consistiram em quatro níveis de ZEA:

Dieta com 0 ppm de ZEA = Controle Negativo

Dieta com 0,25 ppm de ZEA

Dieta com 0,6 ppm de ZEA

Dieta com 2,0 ppm de ZEA

Figura 21: Machos alojados nas baias.



Fonte: Arquivo pessoal (2014).

3.2.5 Parâmetros analisados no experimento *in vivo*

A biometria do testículo direito e esquerdo foi obtida através da mensuração do comprimento e da largura dos testículos. Para medir o comprimento, foi considerado o testículo, incluindo a cauda e a cabeça do epidídimo, e a largura foi mensurada na região média de cada testículo no sentido latero-medial. A medição foi feita através de um paquímetro digital (Figura 22).

Figura 22: Biometria testicular, mensuração do comprimento e da largura do testículo.



Fonte: Arquivo pessoal (2014).

3.2.6 Abate

Ao final do período experimental de 21 dias todos os animais foram abatidos, dois animais de cada tratamento, vale ressaltar que foi respeitado o período médio de seis horas de jejum alimentar e dieta hídrica, e foi feito insensibilização por eletronarcole, seguindo os princípios do abate humanitário. Realizou-se a laparotomia para a retirada das glândulas sexuais acessórias, e ainda dos órgãos do trato reprodutor, testículos, ducto deferente direito e esquerdo, cabeça, cauda e corpo do epidídimo direito e esquerdo, para análise histopatológica e histomorfométrica.

3.2.7 Processamento do material para exame histopatológico e histomorfométrico

Todo o processamento e análise histopatológica, e histomorfométrica foi realizado na Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os órgãos coletados primeiramente foram acondicionados em formol 10% tamponado nas primeiras 24 h, e após, em álcool 70%, a fim de inativar as enzimas, conservando assim a estrutura celular mais próxima de como se apresentam *in vivo*, sem a ação autolítica celular.

A clivagem foi realizada em todos os fragmentos coletados, no que se refere às amostras do testículo direito e esquerdo; da cauda, do corpo e da cabeça do epidídimo direito e esquerdo; do ducto deferente direito e esquerdo; e da glândula bulbouretral, da vesícula seminal e próstata dos dois machos de cada tratamento que foram armazenados até o processamento. A clivagem dos fragmentos coletados dos leitões foi de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro abrangendo toda porção medial do testículo direito e esquerdo. Já os demais órgãos, os cortes foram de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro de cada.

Na etapa de diafanização, os fragmentos passaram por um tratamento em solução composta por álcool/xilol (50:50), xilol I e xilol II, sendo que o tempo de processamento em cada uma das etapas foi de uma hora, trinta minutos e trinta minutos, respectivamente. Imediatamente após a retirada do xilol II, os fragmentos dos órgãos foram embebidos em parafina histológica líquida (estufa a 60°C), passando por uma bateria de parafina I, parafina II e parafina III, a temperatura de 60°C. O material processado permaneceu uma hora nesta etapa, sendo vinte minutos em cada bateria de parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo e foram obtidos cortes semifinos (5 µm). Os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina, segundo metodologia de Langeron (1949), com modificações. Após a parafina dos cortes ser removida por duas passagens, de trinta minutos cada, em recipientes contendo xilol, foi feita a hidratação em série decrescente de álcoois, permanecendo as lâminas por cinco minutos em cada álcool. Em seguida, após cinco minutos em água corrente, foi realizada a coloração pela hematoxilina e nova lavagem.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram transferidas para recipiente contendo eosina, lavadas em água e desidratadas, por sucessivas e rápidas passagens, em séries crescentes de álcoois. Para a diafanização do material recorreu-se a duas passagens em xilol, cada uma delas com cinco minutos de duração. A montagem das lâminas e das lamínulas foi realizada utilizando o Bálsamo do Canadá.

3.2.8 Análises histopatológicas

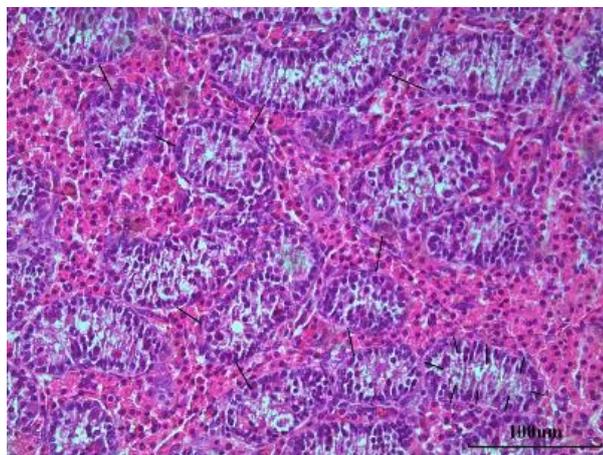
As análises histopatológicas foram feitas com apenas uma secção histológica de cada órgão do trato reprodutivo (testículo direito e esquerdo; ducto deferente direito e esquerdo; cabeça, cauda e corpo do epidídimo direito e esquerdo) e das glândulas acessórias (próstata, glândula bulbouretral e vesícula seminal) dos leitões.

As avaliações histopatológicas foram realizadas em microscópio de luz Nikon Eclipse Ci[®], nas objetivas de 4x, 10x e 20x, acoplado ao sistema digitalizador de imagens e software Lumenera INFINITY[®].

3.2.9 Análises histomorfométricas

Com relação à análise histomorfométrica dos órgãos dos leitões pré-púberes, as mensurações histológicas foram feitas apenas nos testículos, obtendo-se sete imagens equidistantes de uma seção histológica do testículo direito e de uma seção histológica do testículo esquerdo. Em cada imagem, foram realizadas oito mensurações equidistantes da altura do epitélio do túbulo seminífero e oito mensurações equidistantes da distância entre os túbulos seminíferos (Figura 23). Portanto, a altura do epitélio do túbulo seminífero e a distância entre os túbulos seminíferos foram obtidas pela média de 58 medidas cada. A avaliação histomorfométrica foi feita em objetiva de 20x, no microscópio de luz Nikon Eclipse Ci[®] acoplado ao sistema digitalizador de imagens e software Lumenera INFINITY[®].

Figura 23: Fotomicrografia do testículo direito, para visualização das mensurações das variáveis. HE. 20x.



Fonte: Arquivo pessoal (2016).

3.2.10 Análises da bioquímica sérica

Cerca de 4 mL de sangue de cada animal foram coletados no momento da sangria, durante a secção dos grandes vasos. O sangue foi imediatamente transferido para tubos sem EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) para obtenção do soro, e estocado em freezer a -20°C, pois o congelamento tem mínimo efeito sobre os analitos que foram analisados.

As amostras foram centrifugadas a (500 x g) por 5 minutos para obtenção do soro. O soro de cada animal foi separado em microtubos e identificados. Sendo assim, foram analisados as seguintes enzimas nos leitões pré-púberes: fosfatase alcalina (ALP), ureia e creatinina. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semi-automático CELM-SBA-200.

3.3 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados de histomorfometria das leitoas, utilizou-se análise de variância em arranjo fatorial 4x2, usando o teste SNK (Student-Newman-Keuls). O nível de significância para informar as diferenças foi de $p < 0,05$. As análises foram conduzidas usando o programa computacional estatístico InfoStat®, versão 2008.

Já os dados dos leitões, foram conduzidas análises estatísticas para morfometria e histomorfometria testicular. As variáveis foram submetidas a análise de variância em arranjo fatorial 4x2. O nível de significância para informar as diferenças foi de $p < 0,05$. Os dados foram paramétricos e utilizou-se o SNK (Student-Newman-Keuls). As análises foram conduzidas usando o programa computacional estatístico InfoStat®, versão 2008.

E ainda, os dados da bioquímica sérica dos leitões e das leitoas foram submetidos ao Teste exato de Fisher, com nível de significância de $p < 0,05$, para saber se existe uma associação entre a ZEA e cada parâmetro da bioquímica sérica dos animais. As análises foram conduzidas usando o programa computacional R® (R Development Core Team, 2009). Vale mencionar que não foi aplicada a avaliação estatística para as análises histopatológicas, todos os resultados foram apresentados em tabelas únicas. As avaliações histopatológicas foram feitas pelos achados encontrados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados Experimento I (Leitoas Pré-Púberes)

4.1.1 Análise da bioquímica sérica

Os resultados dos efeitos da ZEA sobre a bioquímica sérica das leitoas estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8: Efeito dos tratamentos sobre a bioquímica sérica das leitoas pré-púberes ao 21º dia de experimento¹.

Tratamentos	Bioquímica sérica			
	ALT	ALP	Ureia	Creatinina
T01: 0ppm ZEA + 0.0% AAM*	41,00	260,33	25,00	1,0
T02: 0ppm ZEA + 0.2% AAM	49,33	314,00	28,00	1,0
T03: 0,25ppm ZEA + 0.0% AAM	60,66	283,33	24,33	0,96
T04: 0,25ppm ZEA + 0.2% AAM	62,33	395,66	20,00	0,96
T05: 0,6 ppm ZEA + 0.0% AAM	54,33	367,66	19,33	0,93
T06: 0,6 ppm ZEA + 0.2% AAM	56,33	467,66	19,66	0,96
T07: 2,0ppm ZEA + 0.0% AAM	43,33	271,66	17,00	1,06
T08: 2,0 ppm ZEA + 0.2% AAM	45,66	312,66	29,66	1,06

¹ Resultados expressos em médias

* AAM= Aditivo anti-micotoxina

Teste Exato de Fisher = ALT: p-valor=0,0227; ALP: p-valor=0,3145; Ureia: p-valor=<0,0001; Creatinina:<0,0001
Valores de referência= ALT: 31-58; ALP: 118-395; Ureia: 21-64,2; Creatinina: 1-2,7

Ocorreu associação significativa entre a ZEA e ALT, ureia e creatinina, ocorrendo alteração dos níveis normais desses parâmetros. Os níveis de ALT foram maiores que os valores de referência nos grupos que consumiram 0,25 ppm ZEA com ou sem a adição do AAM (T03 e T04). Os níveis de ureia foram menores nos grupos de animais que consumiram 0,6 ppm ZEA (T05 T06) e no grupo de leitoas que consumiram 2,0 ppm de ZEA (T07). Não houve associação estatística significativa entre a ZEA e alteração dos níveis de ALP, porém os níveis do grupo experimental T06 foram maiores que os níveis normais para a espécie.

Com relação a creatinina houve alteração dos níveis normais, diminuição dos valores, para os grupos experimentais pertencentes ao tratamento T03, T04, T05 e T06. A adição do AAM não demonstrou efeito protetor, já que foi observado alteração dos níveis dos parâmetros bioquímicos em grupos que consumiram o produto a base de parede celular de levedura.

Marin et al. (2013) realizaram um experimento com leitoas pré-púberes de um mês de idade, que foram intoxicadas com 0,3 ppm de ZEA. Nesse estudo os autores avaliaram parâmetros da bioquímica sérica; ureia, creatinina, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), albumina, proteínas totais, gama glutamiltransferase (GGT), e outras enzimas. Os resultados desses autores mostraram que adição de ZEA apenas interferiu na atividade de ALT e GGT, havendo diminuição no grupo de leitoas que consumiram ZEA, o resultado desse estudo observou aumento da enzima ALT.

A ZEA está associada a efeitos hepatotóxicos, provocando diminuição das enzimas hepáticas, o aumento de ALT também está relacionado com necrose e degeneração dos hepatócitos (MARIN et al., 2013).

Em acordo com Sutkevičien et al. (2009) que observaram em suas pesquisas que suínos machos adultos intoxicados com 1 ppm de ZEA, durante 60 dias, tiveram aumento significativo

dos níveis de ALT em comparação com animais do grupo controle, o aumento dessa enzima se dá pelo estímulo que a ZEA provoca nos processos metabólicos do fígado.

A ZEA é metabolizada no fígado, e estudos com ratos indicam que o metabolismo hepático é afetado, ocorrendo aumento de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase no soro sanguíneo dos animais que consumiram essa micotoxina (SUTKEVIČIEN et al., 2009).

4.1.2 Análises histomorfométricas

Os resultados da histomorfometria dos órgãos do aparelho reprodutor das leitoas dos grupos experimentais estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9: Efeito dos tratamentos sobre a histomorfometria do trato reprodutivo das leitoas¹.

Órgão	Tratamentos (µm)								E.E*
	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	
VP- epitélio	14,58 ^a	14,46 ^a	109,73 ^b	87,03 ^b	150,72 ^c	108,42 ^b	262,80 ^c	210,39 ^d	11,3
VP- mucosa	244,78 ^a	217,32 ^a	1544,45 ^{bc}	1304,30 ^b	1352,36 ^b	1385,50 ^b	2128,81 ^d	1723,62 ^c	89,4
VP- muscular	481,65 ^a	522,44 ^a	1188,76 ^b	1055,26 ^b	1445,62 ^b	1255,69 ^b	1311,82 ^b	1170,19 ^b	116,6
VP- adventícia	327,74 ^a	323,10 ^a	307,07 ^a	313,15 ^a	370,95 ^a	398,08 ^a	361,58 ^a	337,76 ^a	21,8
VD- epitélio	14,04 ^a	14,31 ^a	49,26 ^{ab}	34,28 ^{ab}	108,26 ^c	69,28 ^b	29,68 ^{ab}	28,37 ^{ab}	9,5
VD- mucosa	213,71 ^a	207,46 ^a	453,75 ^b	323,56 ^{ab}	462,4 ^b	401,74 ^b	428,04 ^b	327,62 ^{ab}	35,8
VD- muscular	519,52 ^a	553,68 ^a	1507,80 ^b	1575,89 ^b	1576,73 ^b	1410,33 ^b	1882,00 ^b	1288,81 ^b	196,2
VD- adventícia	383,68 ^b	386,95 ^{ab}	561,76 ^{ab}	437,17 ^{ab}	497,68 ^{ab}	445,92 ^{ab}	447,34 ^{ab}	366,59 ^a	38,3
UP- epitélio	15,79 ^a	15,18 ^a	23,23 ^b	19,85 ^{ab}	23,26 ^b	24,60 ^b	24,97 ^b	23,43 ^b	1,7
UP- endométrio	776,85 ^a	758,35 ^a	1170,41 ^{ab}	1172,03 ^{ab}	1056,71 ^{ab}	1339,66 ^b	822,28 ^a	797,33 ^a	93,7
UP- miométrio	479,39 ^{ab}	493,28 ^{ab}	658,29 ^b	629,78 ^{ab}	628,92 ^{ab}	685,89 ^b	423,28 ^a	405,11 ^a	49,5
UP- perimetrio	26,75 ^a	29,41 ^a	31,33 ^a	28,94 ^a	26,94 ^a	26,82 ^a	25,17 ^a	23,14 ^a	1,3
UM- epitélio	18,12 ^{ab}	14,53 ^a	22,26 ^{bc}	21,47 ^{bc}	23,14 ^{bc}	22,89 ^{bc}	28,43 ^c	24,39 ^{bc}	1,8
UM- endométrio	732,81 ^a	771,16 ^a	1078,52 ^{bc}	1188,37 ^c	1151,89 ^c	1164,64 ^c	1097,07 ^{bc}	926,72 ^{abc}	83,7
UM- miométrio	413,56 ^a	473,87 ^{abc}	566,14 ^{bcd}	592,26 ^{cd}	639,26 ^d	665,38 ^d	449,23 ^{ab}	387,73 ^a	33,3
UM- perimetrio	27,49 ^a	33,88 ^a	29,29 ^a	27,22 ^a	27,32 ^a	25,94 ^a	24,36 ^a	23,73 ^a	2,1
UD- epitélio	16,49 ^a	16,44 ^a	22,01 ^{bc}	20,72 ^{bc}	22,26 ^{bc}	24,20 ^{bc}	25,34 ^c	25,28 ^c	0,95
UD- endométrio	733,01 ^a	778,81 ^a	1054,53 ^a	1079,59 ^a	1085,38 ^a	1060,82 ^a	1007,79 ^a	834,00 ^a	78,7
UD- miométrio	489,54 ^a	438,22 ^a	477,92 ^a	489,45 ^a	474,16 ^a	463,10 ^a	472,72 ^a	473,67 ^a	43,0
UD- perimetrio	29,16 ^a	30,60 ^a	38,53 ^a	26,84 ^a	26,0 ^a	24,27 ^a	28,85 ^a	24,58 ^a	2,4
OD- FP - DF	35,89 ^b	32,32 ^a	33,4 ^a	34,29 ^{ab}	33,88 ^a	35,85 ^b	-	-	0,48
OD-FP- DO	31,11 ^c	27,30 ^b	29,02 ^{abc}	29,78 ^{cb}	28,43 ^{ab}	30,71 ^{cb}	-	-	0,54
OD-FPU- DF	64,29 ^a	62,62 ^a	66,07 ^a	65,52 ^a	64,51 ^a	68,40 ^a	-	-	1,5
OD-FPU- DO	48,72 ^b	41,52 ^a	46,38 ^b	44,73 ^{ab}	41,28 ^a	47,81 ^b	-	-	1,0
OD-FPM- DF	118,26 ^a	116,82 ^a	120,25 ^a	114,82 ^a	125,35 ^a	118,09 ^a	-	-	2,5
OD-FPM-DO	63,5 ^a	59,15 ^a	65,96 ^a	63,16 ^a	58,39 ^a	66,57 ^a	-	-	2,2
OE-FP- DF	34,55 ^{bc}	31,83 ^a	33,63 ^b	36,78 ^c	34,51 ^{bc}	36,13 ^c	-	-	0,57
OE-FP- DO	29,46 ^{ab}	27,43 ^a	28,86 ^{ab}	30,71 ^b	28,81 ^{ab}	30,49 ^{ab}	-	-	0,53
OE-FPU- DF	66,91 ^a	64,88 ^a	65,41 ^a	65,04 ^a	66,07 ^a	67,81 ^a	-	-	1,51
OE-FPU-DO	44,48 ^{ab}	41,06 ^a	45,85 ^{ab}	43,24 ^{ab}	44,93 ^{ab}	48,43 ^b	-	-	1,3
OE-FPM-DF	123,25 ^a	118,91 ^a	122,00 ^a	114,69 ^a	130,45 ^a	118,19 ^a	-	-	6,7
OE-FPM-DO	60,83 ^a	56,69 ^a	65,18 ^a	59,04 ^a	60,16 ^a	62,18 ^a	-	-	2,6

¹ Resultados expressos em médias

^a Médias com letras distintas nas linhas diferem estatisticamente pelo Teste SNK (p<0,05)

* Erro padrão da média

VP, vagina proximal; VD, vagina distal; UP, útero proximal; UM, útero médio; UD, útero distal; OD, ovário direito; FP, folículo primordial; DO, diâmetro folicular; DO, diâmetro oocitário; FPU, folículo primário unilaminar; FPM, folículo primário multilaminar.

Houve diferença estatística significativa em três camadas histológicas da vagina proximal, não havendo diferença entre os tratamentos na camada adventícia desse órgão. O epitélio da vagina proximal foi mais sensível a ZEA, não havendo diferença significativa entre os animais dos grupos controle (T01 e T02), que foram significativamente diferentes dos demais

grupos. Não ocorreu diferença significativa entre as leitoas do grupo T03 e T04, por mais que a espessura do epitélio das leitoas que consumiram ZEA com a adição do AAM foi menor (T04). O mesmo não ocorreu na concentração de 0,6 e 2,0 ppm, houve diferença significativa entre as leitoas do grupo T05 e T06, e entre as leitoas do grupo T07 e T08, com menor espessura do epitélio no grupo de animais que consumiram ZEA + AAM. No epitélio da vagina proximal podemos observar o efeito dose dependente relacionado ao aumento da concentração de ZEA, a espessura do epitélio aumentou conforme o aumento dos níveis de ZEA.

Com relação a mucosa, novamente não houve diferença significativa entre os grupos controles, as leitoas intoxicadas com 0,25 e 0,6 ppm de ZEA foram estatisticamente iguais. O efeito de redução da espessura da mucosa da vagina devido a inclusão do AAM foi observado no grupo de leitoas T08. Já na camada muscular desse órgão, a diferença estatística observada ocorreu apenas entre os grupos controles com os demais grupos, não havendo diferença entre os animais intoxicados com as três concentrações de ZEA, com ou sem a inclusão do AAM.

Na vagina distal a atenuação dos efeitos hiperestrogênicos devido a inclusão do aditivo a base de PCL ocorreu apenas na concentração de 0,6 ppm, já que foi observada diferença significativa entre as leitoas do grupo T05 e T06, sendo que as leitoas do grupo T06 (ZEA+AAM) tiveram menor espessura do epitélio. O mesmo resultado não foi observado nos demais grupos (T03, T04, T07 e T08), já que houve igualdade estatística no epitélio dessas leitoas com as leitoas dos grupos controle (T01 e T02). Na mucosa da vagina distal, as leitoas cuja a dieta houve inclusão do AAM, T04 e T08, houve igualdade estatística com a mucosa das leitoas do grupo T01 e T02, o mesmo não foi observado na concentração de 0,6 ppm de ZEA. E ainda, não foi observado diferença significativa entre as três doses de ZEA, o efeito hiperestrogênico nessa camada foi igual para as três concentrações de ZEA. Com relação a camada muscular desse órgão, não houve diferença estatística entre os grupos intoxicados com ou sem a presença do AAM, apenas entres esses grupos com os animais do grupo controle, novamente os efeitos deletérios provocados pela ZEA foram constantes, não havendo um efeito dose dependente. A camada adventícia não sofreu influência da ZEA, pois as leitoas que consumiram ZEA com ou sem a presença do AAM possuíram igualdade estatística com as leitoas dos grupos T01 e T02, com exceção das leitoas do grupo T08 que possuíram igualdade estatística apenas com o grupo controle (T01) e com os demais tratamentos que consumiram ZEA e ZEA com AAM.

Com relação as três porções uterinas, os resultados foram os mesmo no perimétrio não havendo diferença entre os tratamentos. No epitélio do útero proximal não foi observado diferença estatística entre as leitoas que consumiram as três concentrações ZEA com ou sem a inclusão do AAM, apenas o grupo T04 apresentou igualdade estatística com os grupos controles. No endométrio a igualdade estatística das leitoas intoxicadas com ZEA ocorreu entre os grupos T03, T04, T05, T07 e T08 com as leitoas do grupo controle, apenas as leitoas do grupo T06 tiveram maior espessura de endométrio, não havendo igualdade estatística com as leitoas do grupo T01 e T06. O miométrio também não foi um bom indicador dos efeitos hiperestrogênicos da ZEA, já que a histomorfometria das leitoas que consumiram ZEA com ou sem a presença do AAM possuíram igualdade estatística com as leitoas dos grupos T01 e/ou T02.

O epitélio do útero médio das leitoas que consumiram a maior concentração de ZEA sem a inclusão do aditivo a base de PCL (T07) tiveram a maior espessura, sendo o único grupo que não teve igualdade estatística com as leitoas do grupo controle, os demais tratamentos possuíram igualdade estatística com o grupo T01, não ocorreu diferença estatística entre os animais intoxicados com ZEA. E ainda sobre o epitélio do útero médio, as leitoas do grupo T03, T07 e T08 tiveram igualdade estatística com as leitoas do grupo T02. Já no miométrio as leitoas do grupo T05 e T06 tiveram a maior espessura de miométrio, não havendo diferença entre esses grupos, que também foram iguais estatisticamente as leitoas que consumiram 0,25 ppm de ZEA

com ou sem a inclusão do AAM. As leitoas dos grupos T07 e T08 tiveram igualdade estatística com as leitoas do grupo controle, o mesmo ocorreu com as leitoas T03 e T04 que foram iguais estatisticamente com o grupo T02.

Com relação ao útero distal não houve diferença histomorfométrica significativa entre os tratamentos no endométrio e no miométrio. Já no epitélio do útero distal ocorreu diferença significativa entre as leitoas dos grupos controle (T01 e T02) com relação aos demais tratamentos, não foi observada diferença entre as três concentrações de ZEA, independente da inclusão do AAM. E ainda, as leitoas que consumiram 2,0 ppm de ZEA (T07 e T08) tiveram a maior espessura epitelial.

Logo, o efeito hiperplásico foi observado no epitélio do útero proximal nos três níveis de inclusão de ZEA, não havendo diferença entre as doses, sem efeito dose dependente. Já nas outras camadas uterinas o efeito hiperestrogênico foi pontual em uma ou duas doses, não sendo observado nas três porções do útero.

Já que no endométrio do útero proximal o efeito hiperplásico ocorreu apenas na concentração de 0,6 ppm. Já no útero médio houve hiperplasia significativa no epitélio apenas das leitoas que consumiram 2,0 ppm de ZEA. No endométrio do útero médio o resultado significativo de hiperplasia ocorreu na concentração de 0,25 e 0,6 ppm de ZEA. No miométrio desse órgão o espessamento significativo ocorreu apenas na concentração de 0,6 ppm. E ainda, no útero distal o efeito hiperplásico foi observado apenas no epitélio, sendo que as leitoas que consumiram 2,0 ppm tiveram a maior espessura de epitélio, seguidas pelas leitoas que consumiram 0,25 e 0,6 ppm, porém não houve diferença significativa entre os três níveis de ZEA.

Na histomorfometria do ovário direito os resultados do folículo primordial (DF) indicaram que houve diferença estatística significativa entre os grupos controle (T01 e T02). Porém a ZEA não alterou a histomorfometria desses folículos, já que as leitoas do grupo T03 e T05 apresentaram igualdade estatística com as leitoas do grupo T02, as leitoas do grupo T04 apresentam igualdade estatística com os grupos controle (T01 e T02), e por fim as leitoas do grupo T06 apresentaram igualdade estatística com o grupo controle (T01).

Os resultados foram similares com relação a histomorfometria do folículo primordial (DO) havendo diferença significativa entre as leitoas dos grupos controle (T01 e T02). A ZEA não influenciou na histomorfometria desse folículo, já que as leitoas do grupo T03 e T04 apresentaram igualdade estatística com os grupos controle, as leitoas do grupo T05 apresentaram igualdade estatística com o grupo T02, e as leitoas do grupo T06 apresentaram igualdade estatística com o grupo T01.

Novamente houve diferença estatística significativa no folículo primário unilaminar entre os grupos controle (T01 e T02). Como também a inclusão de ZEA não provocou alterações nesse parâmetro, já que as leitoas do grupo T03 e T06 apresentaram igualdade estatística com as leitoas do grupo T01, as leitoas do grupo T05 apresentaram igualdade estatística com o grupo T02, e T04 com os grupos controle (T01 e T02). Não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos com relação a histomorfometria do folículo primário unilaminar (DF) e no folículo primário multilaminar (DF e DO).

Já no ovário esquerdo, a histomorfometria do folículo primordial (DF) diferiu significativamente entre os grupos controle (T01 e T02), todos os tratamentos que consumiram ZEA com ou sem a inclusão do AMM apresentaram igualdade estatística apenas com o grupo T01. Já no DO do folículo primordial os grupos controle apresentaram igualdade estatística, sendo que as leitoas do grupo T03, T05 e T06 apresentaram igualdade estatística com os grupos controle, e o grupo T04 apresentou igualdade estatística apenas com o grupo T01.

Com relação ao folículo primário unilaminar (DO), os grupos controle também apresentaram igualdade estatística, assim como a histomorfometria desse folículo no grupo T03, T04 e T05 não diferiram significativamente dos grupos controle (T01 e T02), o grupo T06

apresentou igualdade estatística apenas com o grupo T01. O diâmetro folicular e oocitário dos demais folículos do ovário esquerdo não diferiram significativamente entre os tratamentos.

Observando os resultados das três concentrações de ZEA, verifica-se o efeito dose dependente, aumento da dose aumento da resposta, no epitélio da vagina proximal, sendo uma região com uma alta sensibilidade a ZEA. As demais camadas desse órgão sofreram influência da ZEA, tendo um aumento bem expressivo, mas com valores próximos de altura de mucosa e camada muscular entre os seis grupos intoxicados. A atenuação dos efeitos da ZEA devido a inclusão do AAM na dieta das leitoas ocorreu na concentração de 0,6 e 2,0 ppm.

Com relação a vagina distal, não houve efeito dose dependente, e os valores das camadas histológicas são próximos nas três concentrações de ZEA. A camada muscular desse órgão demonstrou ser a região mais sensível de resposta a exposição por ZEA, já no epitélio não foi observado um efeito hiperplásico como observados na vagina proximal. Por se tratar de uma região de transição entre a vagina e o útero, a resposta da vagina distal foi similar ao do útero.

Em acordo com Wang et al. (2012), que também evidenciaram o sinal clássico de hiperestrogenismo em leitoas, e o seu decréscimo pelo uso de uma substância adsorvente, que sequestra a ZEA ainda no trato gastrointestinal, reduzindo o efeito estrogênico da ZEA. Jiang et al. (2012) também obtiveram o mesmo resultado, metaplasia celular vaginal.

Em fêmeas sexualmente imaturas, como as leitoas desse estudo, que possuem níveis basais de estrógeno endógeno, em razão do alto metabolismo e da baixa taxa de síntese de estrogênio, quando intoxicadas com ZEA, respondem rapidamente as biotransformações provocadas pela substância exógena, e os efeitos são rapidamente notados no trato reprodutivo, em especial na vagina (GAJECKA et al., 2012).

Muitos trabalhos na literatura mostram que o efeito da ZEA no útero está relacionado ao aumento do peso desse órgão em leitoas pré-púberes (MALLMANN e DILKIN, 2007; MOSTROM, 2012; TEIXEIRA et al., 2011). Porém, os resultados encontrados neste estudo mostraram que as alterações histomorfométricas provocadas pela ZEA no útero estão presentes no epitélio, sem haver um aumento muito pronunciado na espessura, inferior a 11 micrometros quando comparado a espessura do epitélio dos grupos controle, e nem sempre estão presentes nas outras camadas uterinas. O aumento do peso do útero pode estar associado com aumento da secreção glandular pelas glândulas uterinas.

Em acordo com Teixeira et al. (2011) que também descreveram em seu estudo aumento significativo da espessura do epitélio uterino em leitoas que consumiram 0,75 ppm de ZEA. Esses autores relatam que a ZEA funciona estimulando a síntese de proteína pelo útero, em especial na histologia do útero as alterações de hipertrofia e hiperplasia ficam restritas as células epiteliais da mucosa e das glândulas uterinas.

Porém, Doll et al. (2004) não encontraram aumento na altura do epitélio uterino e na altura do epitélio das glândulas uterinas, porém houve aumento do peso do útero nas leitoas que consumiram 0,42 ppm de ZEA.

Gajecka et al. (2012) concluíram em seus estudos que a ZEA induz um aumento da espessura de todas as camadas uterinas, com exceção do miométrio. O útero é sensível a substâncias estrogênicas, que desencadeiam um processo inflamatório que pode lesionar permanentemente esse órgão (STOPA et al., 2014).

A histomorfometria uterina pode não ser um parâmetro crucial para estudo dos efeitos tóxicos da ZEA. Através da histomorfometria dos órgãos do aparelho reprodutivo podemos determinar com precisão quais são os órgãos mais sensíveis a exposição a ZEA, pela produção de efeitos tóxicos importantes. Dessa forma, pelo monitoramento desses órgãos podemos tanto monitorar a contaminação natural da ZEA no campo, como também estabelecer e regulamentar limites mínimos aceitáveis de ZEA nas rações destinadas a suínos aqui no Brasil.

Resultados similares com desse estudo foram descritos por Stopa et al. (2014), os efeitos hiperestrogênicos no útero foram mais pronunciados nas menores doses de ZEA do que não

maior concentração. Esses autores explicam que a ZEA pode exercer um efeito estimulante ou adaptativo no número e na atividade das glândulas endometriais, sendo que concentrações altas dessa toxina tem um efeito inibidor na atividade glandular. E ainda, a quantidade de receptores estrogênicos no útero diminuem com o aumento da concentração de ZEA, porque devido a redundância funcional causada pelos altos níveis de substâncias análogas ao estrógeno de várias origens.

O epitélio da vagina proximal é sensível a ZEA, o mesmo não ocorre no epitélio da porção distal desse órgão. O epitélio do útero também não demonstrou ser sensível a toxina, já que não foi observado hiperplasia das células epiteliais. A ausência de resposta hiperestrogênica pelo epitélio da vagina distal pode estar associada ao fato de ser uma região muito próxima e já de transição ao útero, tendo dessa forma a mesma resposta que o útero.

A ZEA na concentração de 0,25 e 0,6 ppm não afetou o diâmetro folicular e o diâmetro oocitário dos folículos ovarianos, já que os diâmetros desses animais foram estatisticamente iguais aos dos animais dos grupos controle. Esse resultado pode ter ocorrido pois só foram considerados folículos não atresícos. A ZEA interfere na histologia ovariana, há um aumento no número de folículos atresícos, pois nos animais que consumiram 2,0 ppm de ZEA não houve número suficiente de folículos não atresícos para a mensuração dos diâmetros.

Em acordo com Schoevers et al. (2012), a integridade dos folículos diminuiu com o aumento das concentrações de ZEA. A ZEA foi responsável por diminuir a quantidade de folículos não atresícos. O efeito deletério dessa toxina nos ovários está relacionado com danos nos folículos primordiais, primários e secundários, a degeneração ocorre principalmente no oócito, pelo processo de autofagia (SHOEVERS et al., 2012). Cortinovis et al. (2013) reportaram que a ZEA em diferentes doses causou um efeito dose dependente na degeneração dos folículos. Altas concentrações de ZEA provocam diminuição da proliferação de células da granulosa, provocando apoptose e necrose nos folículos, resultado similar ao desse estudo.

Muitos pesquisadores afirmam através de suas pesquisas que a ZEA interfere principalmente no aparelho reprodutivo, sem que haja nenhuma alteração significativa em parâmetros zootécnicos e no desempenho produtivo dos animais (ANDRETTA et al. 2008; DOLL et al., 2004; SPERANDA et al. 2006; TEIXEIRA et al., 2011). Sendo assim, o impacto da ZEA fica restrito a reprodutores, podendo interferir diretamente no desempenho reprodutivo, provocando grandes prejuízos econômicos para o produtor.

Os resultados desse estudo propõem que houve um efeito de atenuação devido ao uso do AAM, nas três concentrações de ZEA, principalmente na vagina, que foi o órgão mais sensível aos efeitos hiperestrogênicos. Zhang et al. (2016) mostraram em seu trabalho que *S. cerevisiae* biodegrada a ZEA, pelo mecanismo de adsorção dos componentes presentes em sua parede celular (β -glucanos e manonoproteínas). Armando et al. (2012) reportaram em seu estudo que existe uma variação da capacidade de adsorção entre diferentes cepas de *S. cerevisiae*, mas que todas as cepas testadas foram capazes de adsorver a ZEA. Em concentrações baixas de ZEA (1 e 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a capacidade adsorção entre as cepas variou de 48 a 87%, em concentrações altas dessa toxina (20 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a variação foi 41 a 6.7%. O fator determinante para a maior capacidade de adsorção a ZEA foi a espessura da parede celular, quanto mais espessa maior capacidade de a ligação.

Jouany et al. (2005) relataram em seu estudo que os β -glucanos desempenham o papel mais importante na adsorção a mictotoxina, devido a sua estrutura 3-D com a existência de eletroestática e interações hidrofóbicas entre unidades de glicose são os fatores chave da eficiência de adsorção a ZEA.

4.1.3 Análises histopatológicas

Não foram observadas alterações macroscópicas no fígado e nos rins dos animais. As alterações histopatológicas (e seus graus) presentes no fígado das leitoas dos oito tratamentos estão apresentados na Tabela 10.

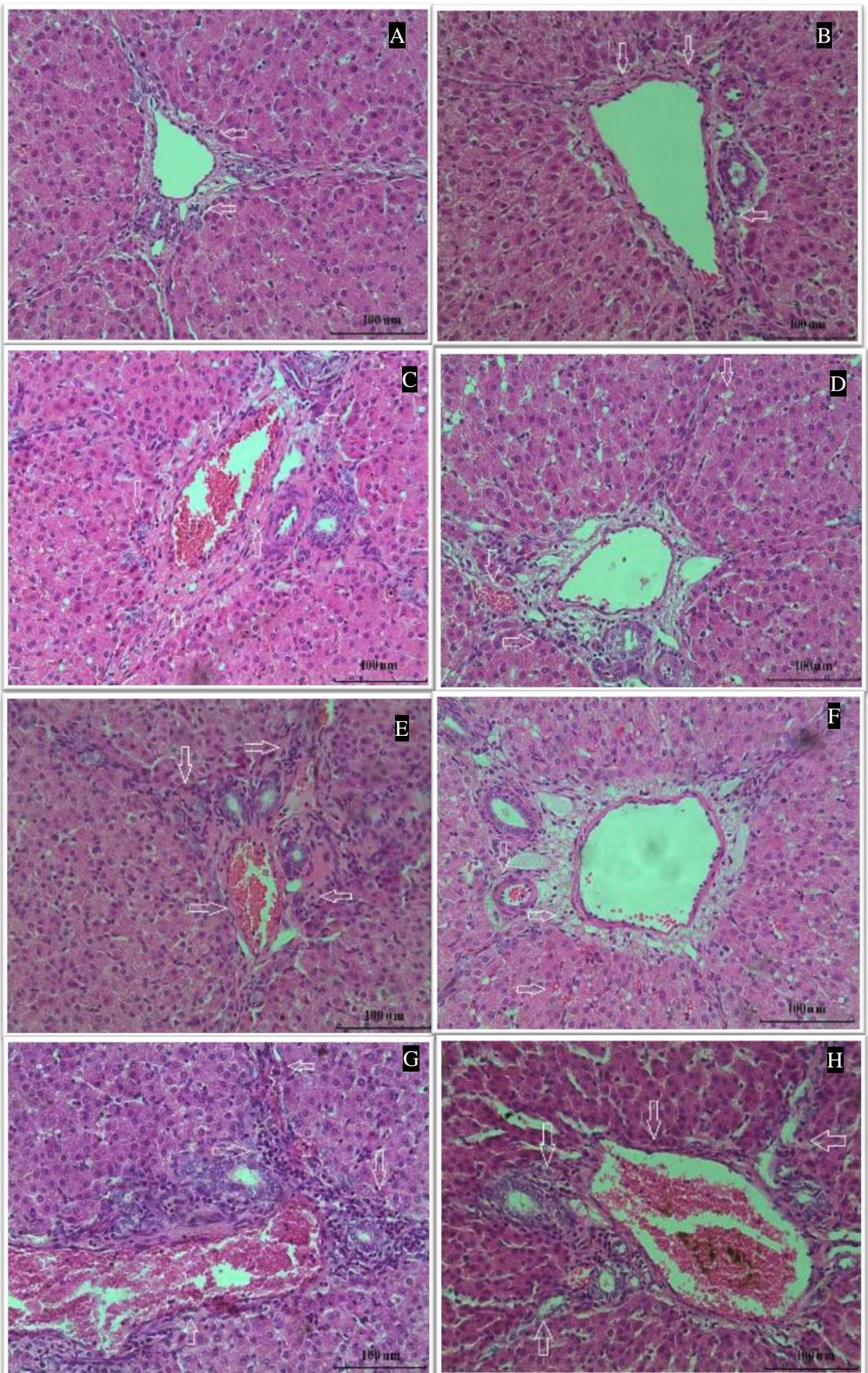
Tabela 10: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Infiltrado de células basofílicas no espaço porta	+	+	+	+	++	++	+++	+++
Ectasia de capilares sinusoides	-	-	+	-	++	+	+++	+++
Espessamento de tecido conjuntivo no espaço interlobular	-	-	+	-	++	+	++	++
Hiperemia da veia centro lobular e no espaço porta	-	-	-	+	++	+	+++	+++

^aLegenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Nos cortes histológicos do grupo controle (T01) e dos animais que receberam dieta base com 0,2% do AAM (T02) foram observadas apenas uma alteração, infiltrado discreto de células basofílicas no espaço porta. Nos animais intoxicados com 0,25 e 0,6 ppm de ZEA (T03 e T05) sem a adição do AAM as lesões encontradas tiveram maior intensidade quando comparadas as lesões presentes nos grupos que foram administrados nas dietas o AAM. Os resultados já não foram os mesmos para os animais que ingeriram a maior concentração de ZEA (T07 e T08), as alterações histopatológicas tiveram o mesmo grau de intensidade, não havendo mais o efeito de atenuação das alterações histopatológicas pelos animais que ingeriram o AAM (Figura 24).

Figura 24: Fotomicrografia do espaço porta do fígado das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Espaço porta com discreto infiltrado (seta), T01-T02; C - Hiperemia e infiltrado inflamatório no espaço porta (seta), disposição normal dos hepatócitos e espaço porta normal, T03; D - Hiperemia, infiltrado inflamatório no espaço porta, ectasia dos capilares sinusoides (seta), T04; E-F-G-H - Hiperemia, infiltrado inflamatório no espaço porta, ectasia dos capilares sinusoides, espessamento do espaço interlobular (seta), T05-T06-T07-T08. HE. 20x.



Os resultados apresentados referentes a histopatologia do fígado foram similares aos descritos por Dumitrescu et al. (2014), que relataram muitas das alterações morfohistopatológicas descritas no presente estudo, como espessamento de tecido conjuntivo no espaço interlobular, infiltrado inflamatório, ectasia de capilares sinusoides, em leitões intoxicados experimentalmente com 0,25 ppm de ZEA durante 18 dias.

No entanto, Tiemann et al. (2008), observaram apenas um discreto espessamento de tecido conjuntivo no espaço interlobular, como lesão microscópica do tecido hepático de fêmeas suínas que consumiram trigo naturalmente contaminado com 0,358 ppm de ZEA por 35 dias. Chatopadhyay et al. (2012), relataram danos hepáticos em camundongos que consumiram doses diárias de 50 ppb, 100 ppb e 200 ppb de ZEA por Kg de peso corporal, durante 14 dias.

Dados na literatura mostram que existe hepatotoxicidade causada pela ZEA, havendo aumento das concentrações das aminotransferases hepáticas (alanina-aminotransferase e aspartato aminotransferase) no plasma sanguíneo. O processo exato que desencadeia a injúria hepática é complexo, sabe-se que ocorre ativação dos hepatócitos, e conseqüentemente injúria tecidual mediada por radicais livres e ainda há peroxidação de lipídeos (CHATOPADHYAY et al., 2012).

A inclusão de 0,2% de AMM na dieta dos animais que consumiram as duas menores doses de ZEA (0,25 e 0,6 ppm) foi responsável pela atenuação das alterações vistas nos animais que não receberam o aditivo. O AAM diminuiu a intensidades dos efeitos da ZEA sobre o parênquima hepático, pois diminuiu a biodisponibilidade dessa toxina diminuindo sua absorção.

As lesões histopatológicas (e seus graus) presentes nos rins das leitoas dos oito tratamentos estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11: Alterações histopatológicas observadas nos rins dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Processo degenerativo das células tubulares	-	-	-	-	+	-	+++	+++
Infiltrado intersticial, peritubular e perivascular inflamatório	-	-	+	+	++	+	+++	++
Hiperemia	-	-	+	-	++	+	+++	+++
Aumento do espaço capsular	-	-	-	-	+	+	+++	+++
Corpúsculo renal de tamanho diferente	+	+	+	+	++	++	+++	+++

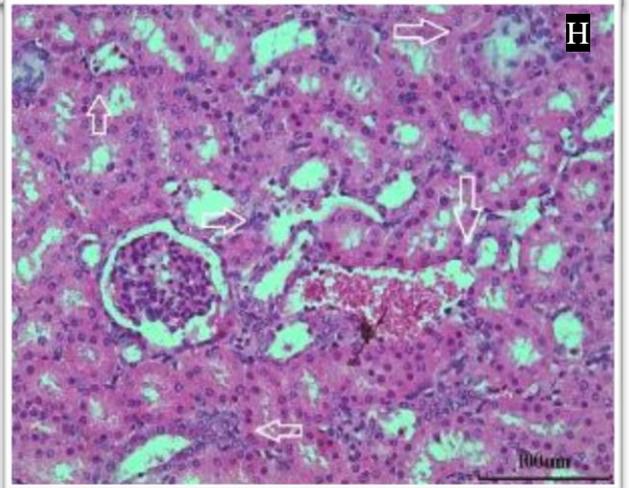
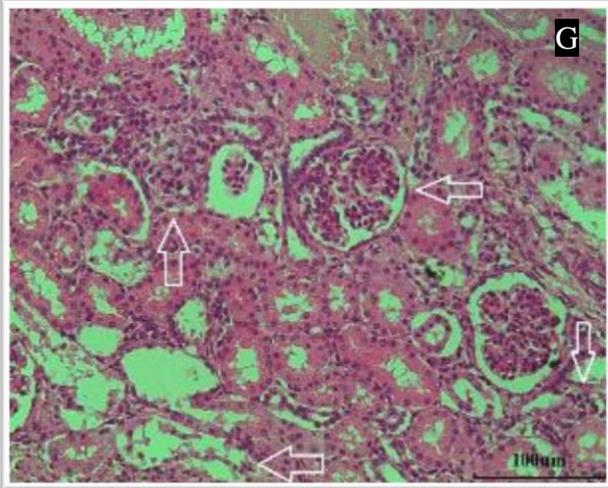
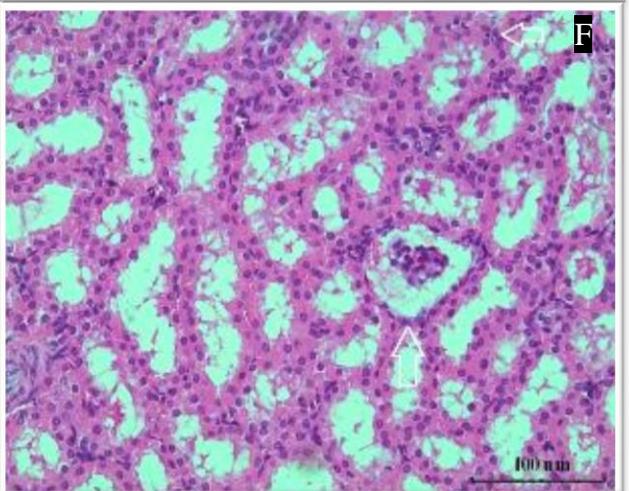
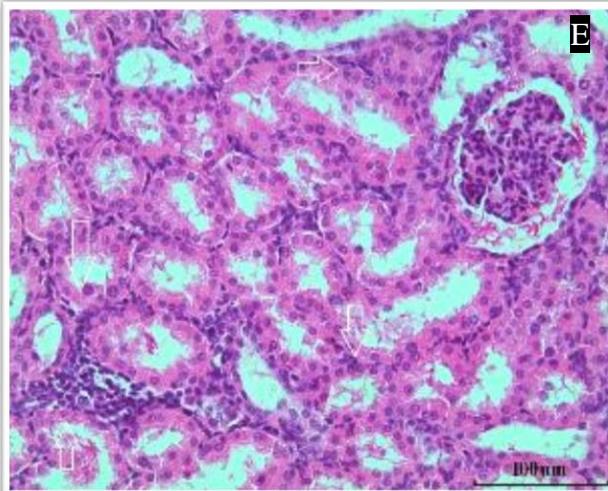
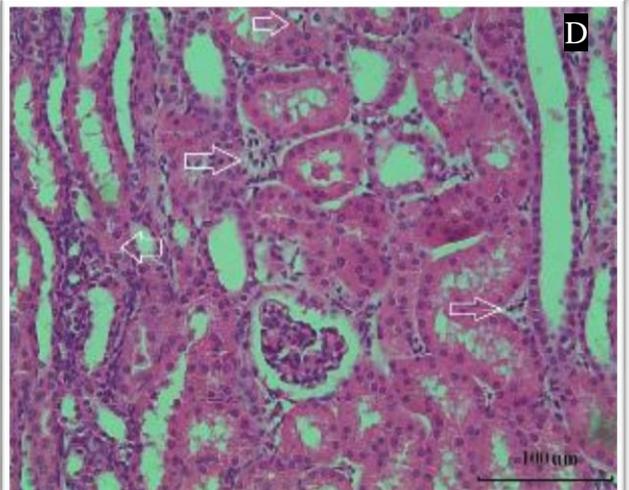
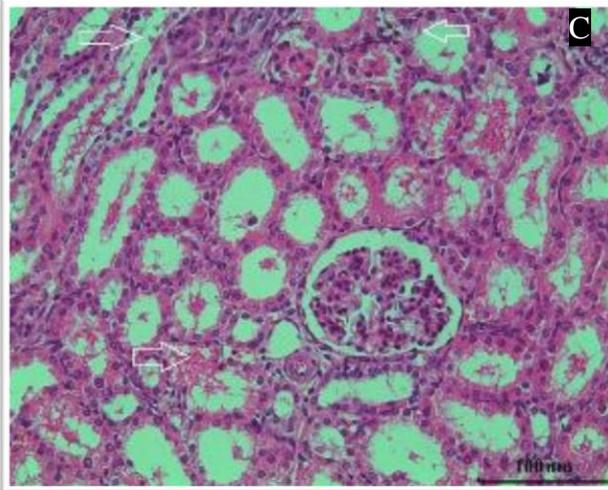
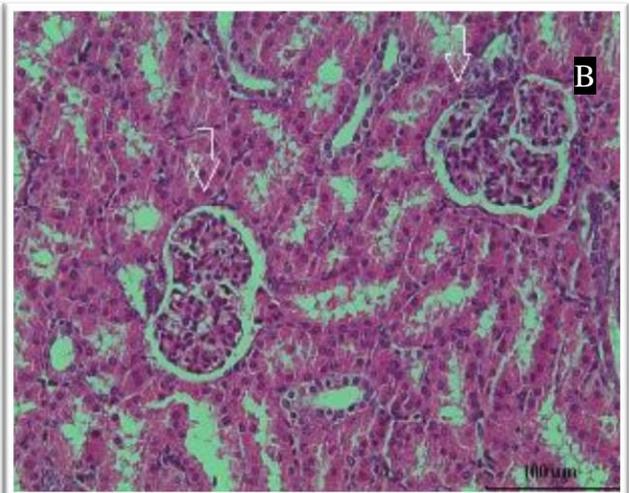
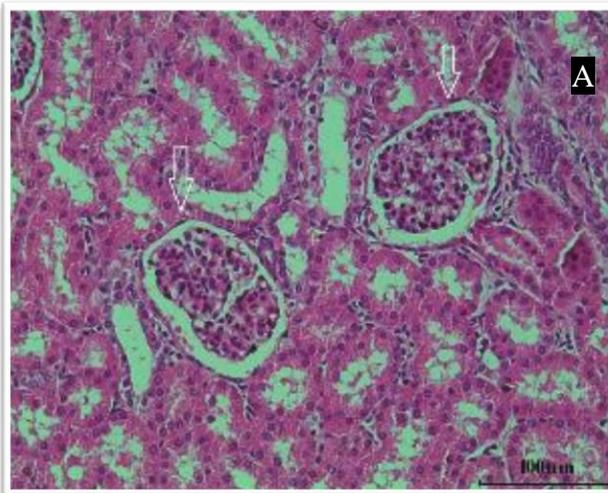
^a Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Novamente, no grupo T01 e T02 ocorreu apenas uma única alteração, corpúsculos renais de tamanhos diferentes no parênquima renal. Nos animais intoxicados com 0,25 ppm de ZEA (T03) foram observadas alterações, de intensidade discreta. Houve o efeito protetor no grupo de leitoas T04 (0,25 ppm de ZEA+ 0,2% de AAM), visto que não foi observado em nenhuma das secções histológicas hiperemia (Figura 26).

Já no grupo de animais intoxicados com o segundo nível de inclusão de ZEA sem adição do AAM (T05) ocorreram mais alterações no parênquima renal, que na sua grande maioria foram moderadas. A inclusão de 0,2% de AAM no grupo T06 foi suficiente para reverter lesões, degeneração das células tubulares, diminuir a hiperemia renal e o infiltrado inflamatório. As leitoas que consumiram 2,0 ppm de ZEA com ou sem a adição do AAM (T07 e T08)

apresentaram as mesmas alterações em grau intenso, havendo apenas diminuição na intensidade do infiltrado inflamatório nas fêmeas que consumiram AAM (Figura 25).

Figura 25: Fotomicrografia do córtex renal das leitoas dos oito tratamentos A-B - Túbulos renais e glomérulos sem particularidades, corpúsculo renal de tamanhos diferentes glomérulos (seta), T01 e T02; C - Hiperemia, infiltrado linfoplasmocitário multifocal (seta), T03; D - Infiltrado linfoplasmocitário multifocal (seta), T04; E - Infiltrado linfoplasmocitário multifocal, células tubulares degeneradas (seta), T05; F - Infiltrado linfoplasmocitário multifocal e aumento do espaço capsular, T06; G-H - Aumento da celularidade em tufo glomerular, infiltrado linfoplasmocitário na zona medular e cortical, hiperemia e fibrose, T07 e T08. HE. 20x.



No parênquima renal, Dumitrescu et al. (2014), encontraram resultados iguais ao deste estudo. Os leitões do grupo controle, que consumiram dieta base ou dieta base com a adição de um produto adsorvente, apresentaram corpúsculos renais de diferentes dimensões. Nos animais intoxicados com ZEA, os resultados desses autores mostram que houve compressão glomerular e metaplasia.

As modificações histopatológicas no parênquima renal provocadas pela ZEA se dão sobre a membrana do epitélio das células, tendo impacto na ação das mitocôndrias celulares e na composição de fluidos intra e extracelulares (DUMITRESCU et al., 2014).

As alterações histopatológicas (e seus graus) presentes nas duas porções da vagina das leitões dos oito tratamentos estão apresentados na Tabela 12 e 13.

Tabela 12: Alterações histopatológicas observadas na vagina proximal dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Espessamento da camada muscular	-	-	+	+	+++	+	+++	+++
Espessamento do epitélio	-	-	++	+	++	++	+++	+++
Infiltrado inflamatório na submucosa	+	+	+	+	++	++	+++	+++
Infiltrado inflamatório na camada adventícia	-	-	+	+	++	++	+++	+++
Hiperemia na camada adventícia	-	-	+	+	++	++	+++	++
Hiperemia na submucosa	-	-	+	+	++	++	+++	+++
Infiltrado inflamatório na camada muscular	-	-	+	-	++	++	+++	+++

^aLegenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Tabela 13: Alterações histopatológicas observadas na vagina distal dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Espessamento da camada muscular	-	-	++	+	+++	++	+++	+++
Espessamento do epitélio	-	-	+	-	++	+	-	-
Infiltrado inflamatório na submucosa	+	+	+	+	++	++	+++	+++
Infiltrado inflamatório na camada adventícia	-	-	+	+	++	++	+++	+++
Hiperemia na camada adventícia	-	-	+	+	++	++	+++	+++
Hiperemia na submucosa	-	-	+	-	++	++	+++	+
Infiltrado inflamatório na camada muscular	-	-	+	-	++	++	+++	+++

^aLegenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

As análises histopatológicas mostraram a presença de um discreto infiltrado inflamatório na submucosa das duas porções vaginais dos grupos controles. De modo geral os graus de intensidade das lesões foram mais evidentes a medida que a concentração de ZEA aumentou. O AAM foi responsável pela atenuação da intensidade de algumas lesões nas concentrações de 0,25; 0,6 e 2 ppm de ZEA (Figura 26 e 27).

Figura 26: Fotomicrografia da vagina proximal das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Epitélio, camada muscular e serosa sem particularidades, e camada submucosa superficial há um leve infiltrado linfoplasmocitário, T01-T02; C-D-F-G-H - Epitélio de revestimento exhibe hiperplasia, camada submucosa há hiperemia e infiltrado linfoplasmocitário, T03-T04-T05-T06-T07-T08. HE. 4X.

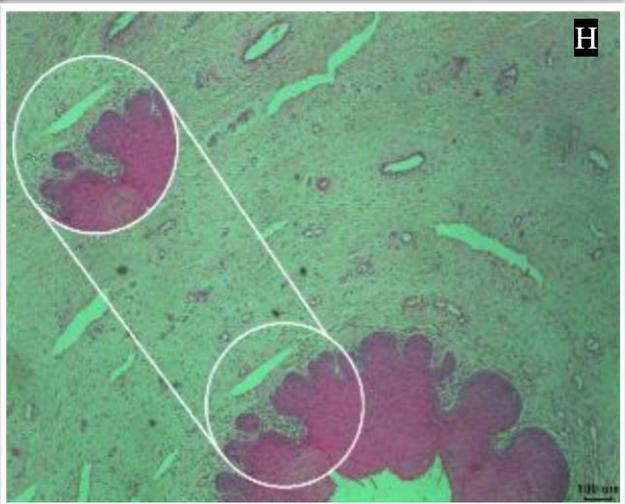
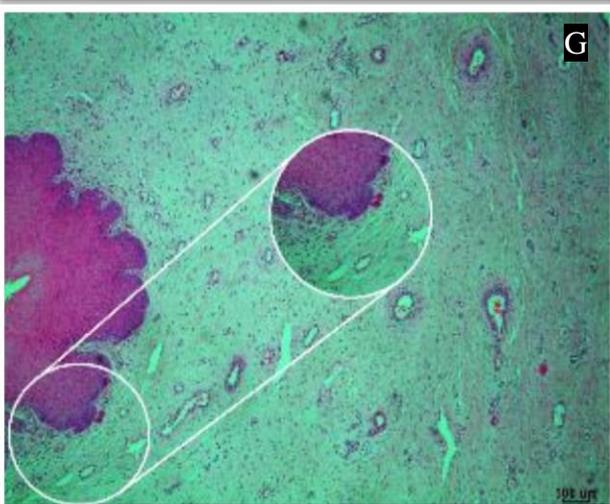
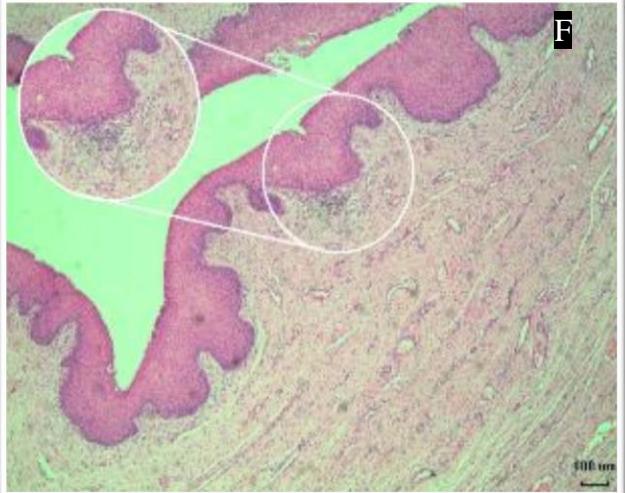
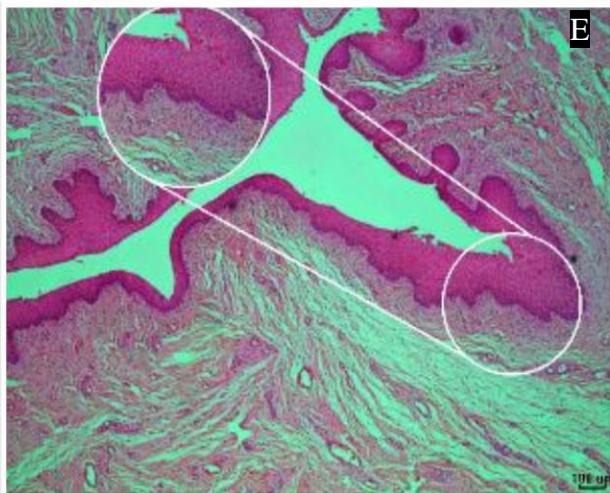
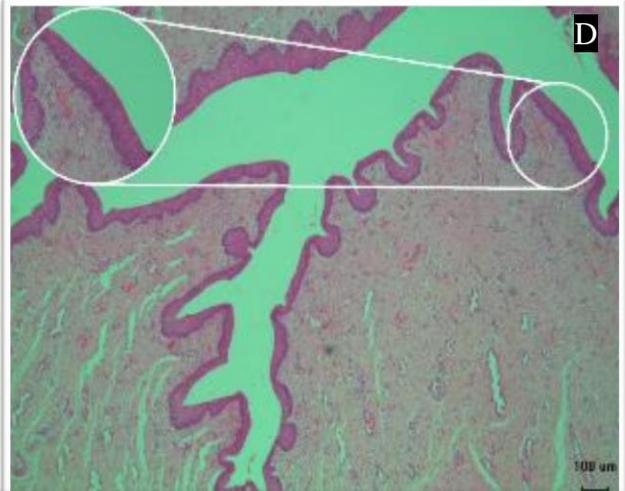
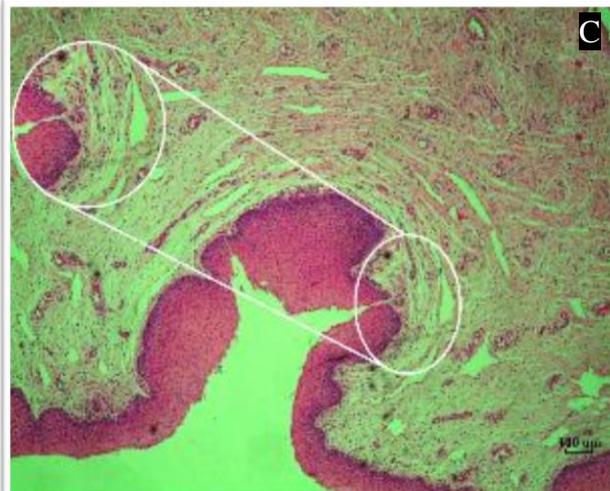
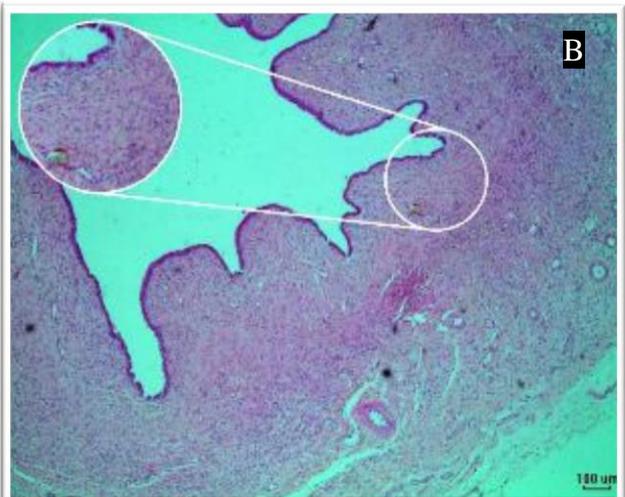
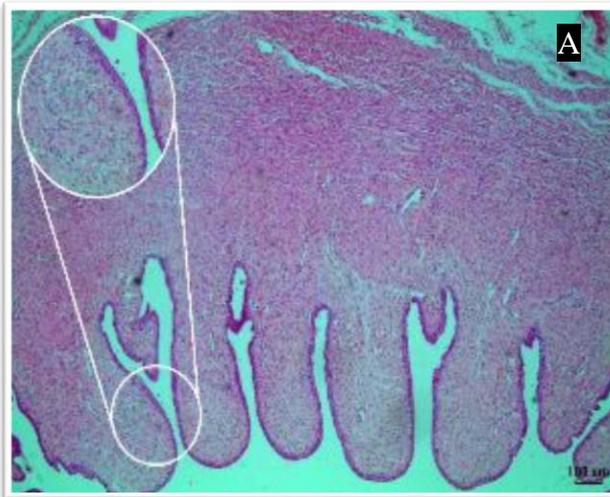
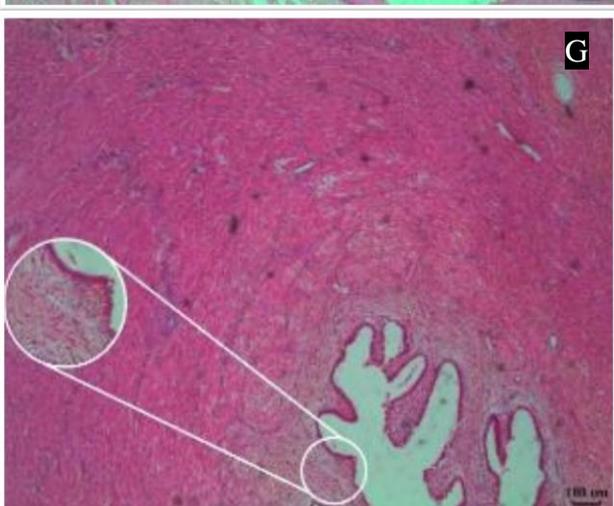
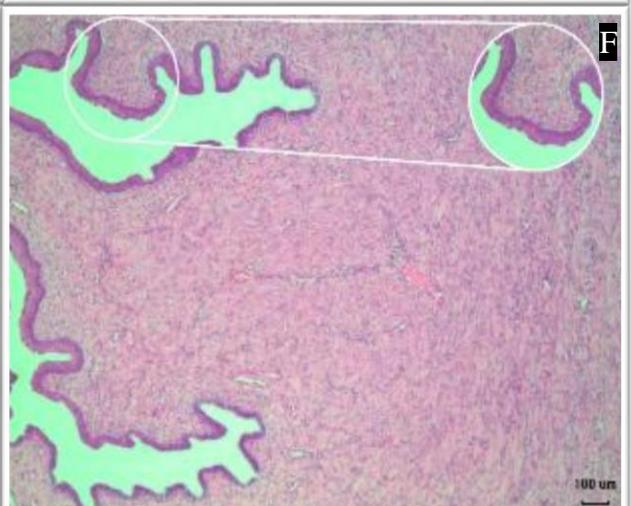
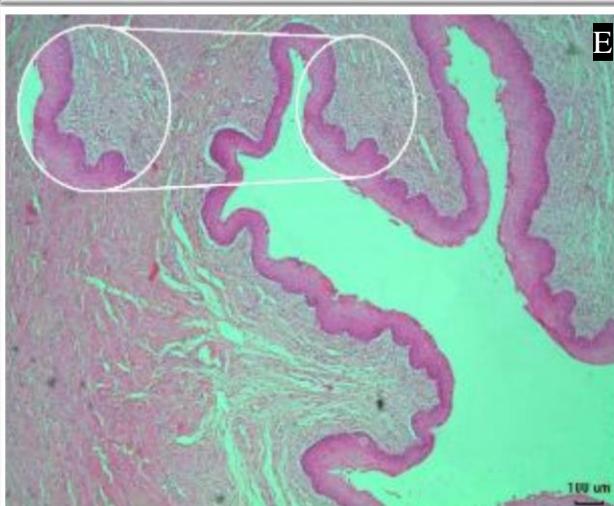
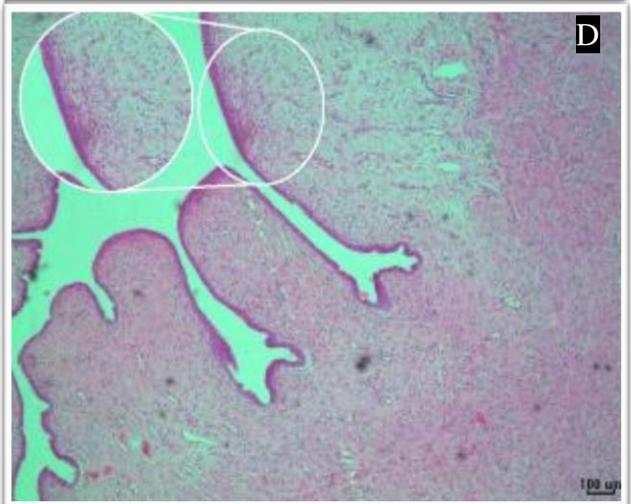
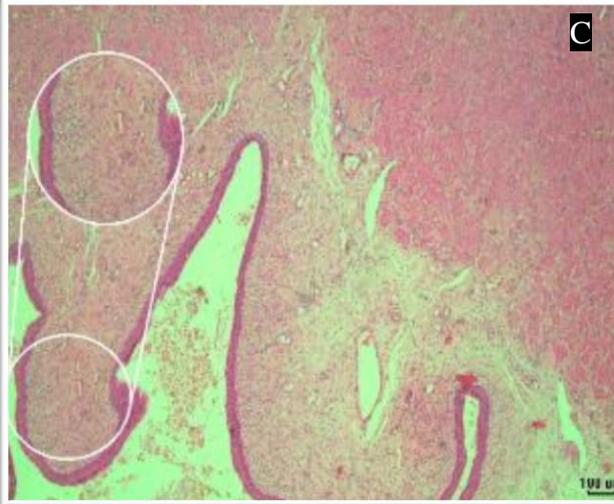
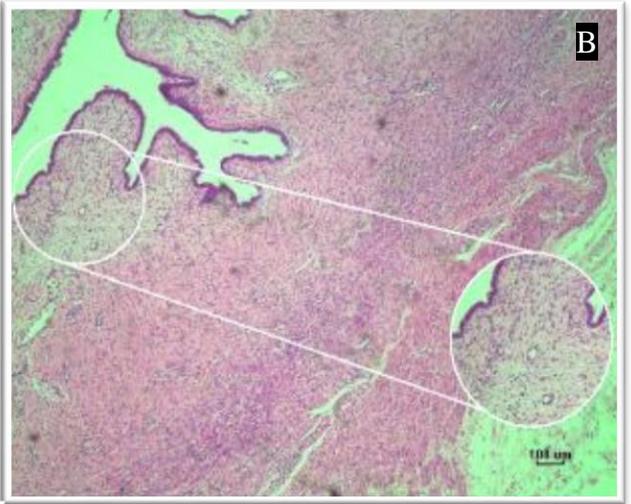
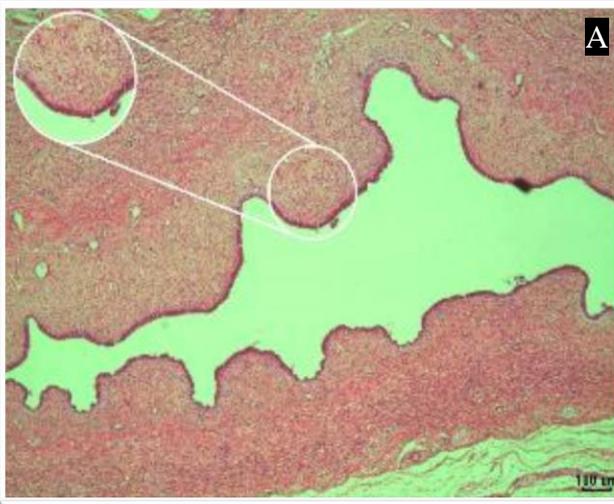


Figura 27: Fotomicrografia da vagina distal das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Epitélio, camada muscular e serosa sem particularidades, e camada submucosa superficial há um leve infiltrado linfoplasmocitário, T01-T02 ; C - Epitélio de revestimento com hiperplasia, na camada submucosa há infiltrado linfoplasmocitário, camada muscular espessada e hiperêmia, T03, D - Epitélio de revestimento com hiperplasia, na camada submucosa há infiltrado linfoplasmocitário, camada muscular espessada, T04; E-F-G-H - Epitélio de revestimento com hiperplasia, na camada submucosa há infiltrado linfoplasmocitário, camada muscular espessada e hiperemia, T06-T07. HE. 4x.



Os sinais de hiperestrogenismo foram evidentes na porção proximal da vagina. Teixeira et al. (2011), também evidenciaram na histologia vaginal hiperplasia e irregularidade do epitélio em leitoas intoxicadas com 0,75 ppm de ZEA. Em acordo com Marin et al. (2013), os autores relatam que a ZEA é indutora de inflamação em órgãos reprodutivos de leitoas.

A síndrome estrogênica é mais evidente em leitoas pré-púberes e induz lesões como hiperemia e espessamento do tecido vaginal (MINERVINI e DELL'AQUILA, 2008). Essas alterações ocorrem devido ao baixo desenvolvimento do sistema endócrino endógeno, que irão causar intensa proliferação celular, levando a metaplasia vaginal (JIANG et al., 2012).

A Tabela 14 mostra os resultados referentes as alterações histopatológicas nos dois ovários.

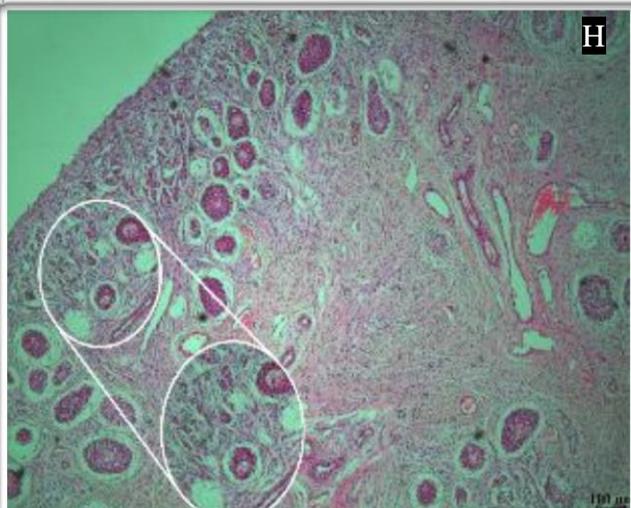
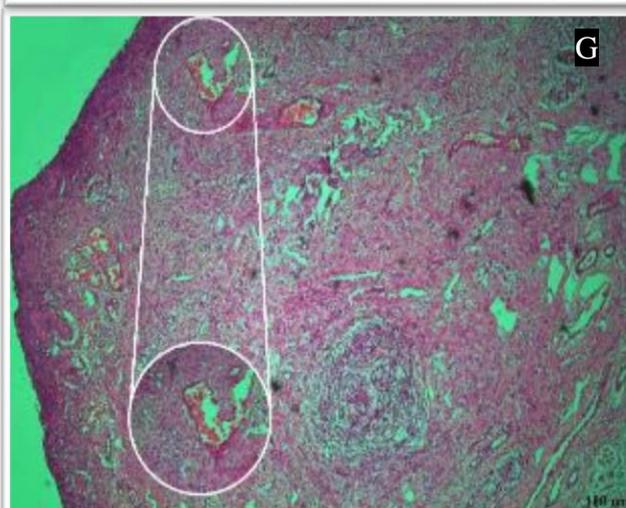
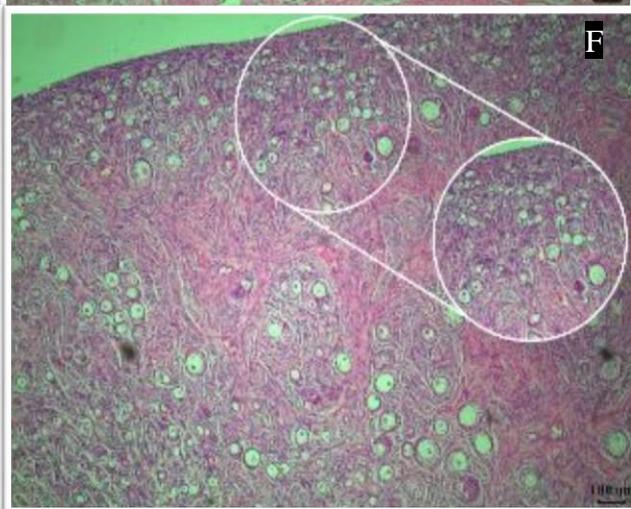
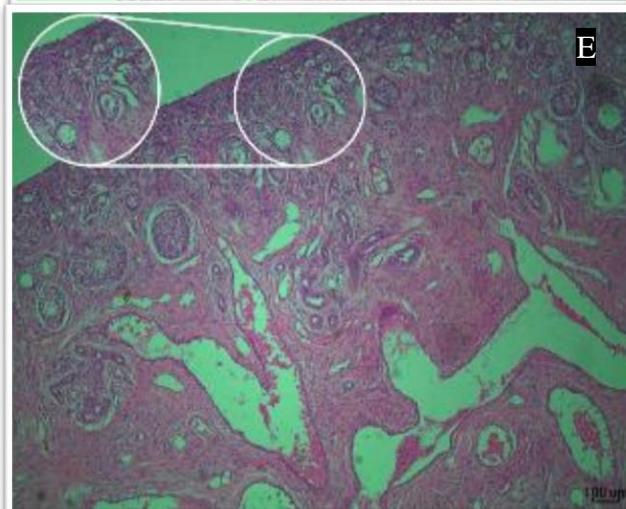
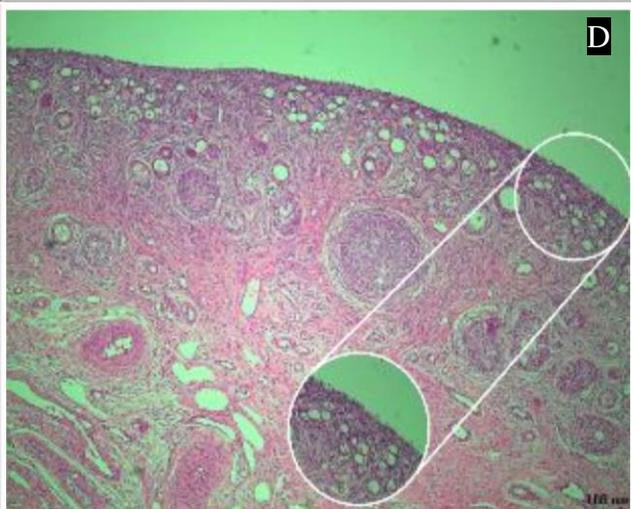
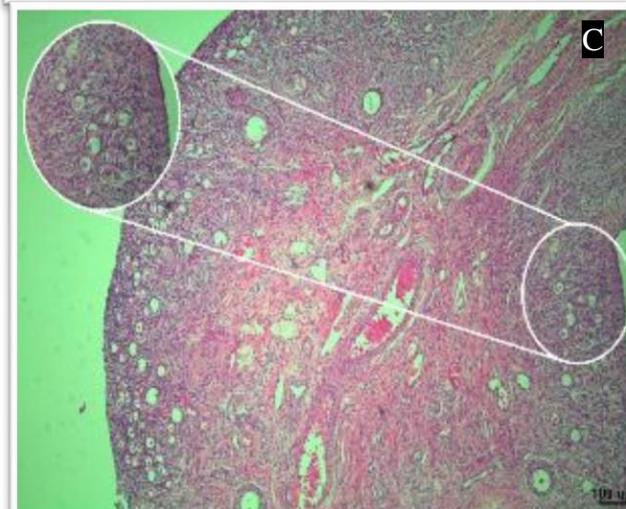
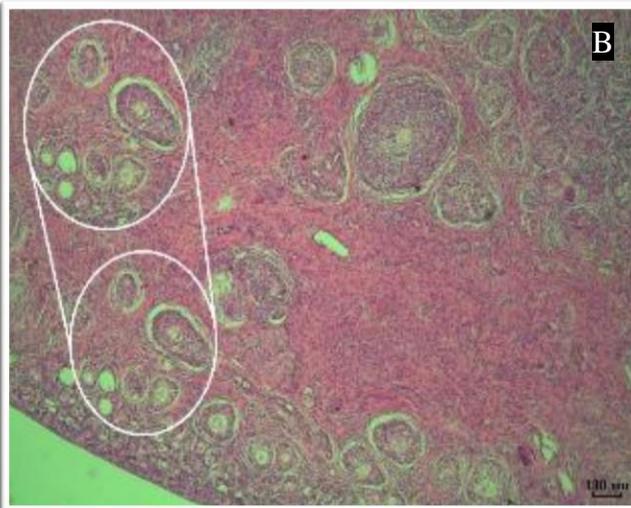
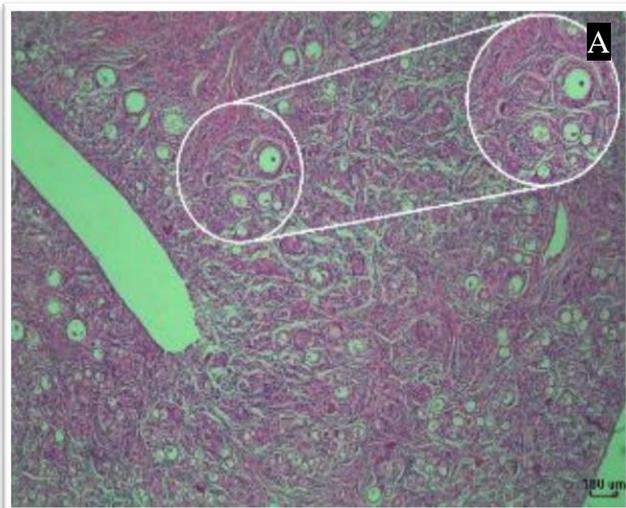
Tabela 14: Alterações histopatológicas observadas no ovário direito e esquerdo dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Hiperemia	+	+	++	+	++	++	+++	++
Desenvolvimento folicular	+++	+++	+++	+++	+	++	-	-
Oócitos danificados	+	+	++	++	+++	++	+++	+++
Folículo ovariano danificado	+	+	++	++	+++	++	+++	+++
Aglomerados de folículos primordiais com distribuição regular	+++	+++	++	+++	+	++	-	-
Estroma de tecido conjuntivo	-	-	-	-	-	-	+++	+++

^a Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Foram observados os mesmos resultados para os grupos controles. Os resultados entre os grupos intoxicados com 0,25 ppm de ZEA foram os mesmos, diferindo apenas em algumas alterações com menor grau de intensidade nos animais aonde houve a inclusão do aditivo. As mesmas alterações foram observadas nos animais que consumiram 0,6 ppm de ZEA, mais uma vez houve um efeito protetor, observado na histopatologia das leitoas do grupo T06. Os ovários das leitoas intoxicadas com 2 ppm tiveram escasso desenvolvimento folicular, os folículos presentes apresentavam-se degenerados, e também foi observado tecido conjuntivo em abundância. Não houve diferença histopatológica entre as leitoas do grupo T07 e T08 (Figura 28).

Figura 28: Fotomicrografia dos ovários das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Aspecto histológico habitual, com leve hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários, T01-T02; C - Hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários degenerados, T03; D - Hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários degenerados, T04; E-F - Hiperemia dos vasos, sendo observados folículos primordiais e folículos primários degenerados, T05 e T06; G-H - Abundante estroma de tecido conjuntivo e escasso desenvolvimento folicular, hiperemia dos vasos ovário, T07-T08. HE. 4x.



Gajecka et al. (2011) realizaram um experimento com leitoas, com duas concentrações de ZEA (20 e 40 ppb por Kg de peso corporal) os danos observados nos ovários foram mais expressivos na maior concentração da micotoxina, resultado similar ao encontrado neste estudo. Os autores relataram principalmente danos nas células da granulosa dos folículos, oócitos danificados, necrose e atresia dos folículos ovarianos.

A ZEA diminui as atividades proliferativa das células dependentes de estrogênio, e causa um processo de degeneração nas células da granulosa, e ainda inibe a secreção de hormônio folículo-estimulante (FSH) em animais sexualmente imaturos. Nos ovários de leitoas pré-púberes o dano ocorre principalmente em folículos em desenvolvimento (GAJECKA et al., 2011).

No entanto, Chen et al. (2015) obtiveram resultados diferentes na intoxicação experimental de leitoas pré-púberes que consumiram 1,1 ppm de ZEA, nessas fêmeas houve estímulo de desenvolvimento folicular. Porém, nos grupos experimentais de leitoas intoxicadas com 2 e 3,2 ppm de ZEA foi observado numerosos folículos ovarianos atrésicos, em acordo com os resultados encontrados neste estudo. O que observamos no nosso estudo foi um aumento gradativo de folículos atrésicos, como também uma diminuição gradativa no desenvolvimento folicular, até que as leitoas que consumiram 2 ppm de ZEA não houve desenvolvimento folicular.

De acordo com esses pesquisadores, a ZEA na concentração de 2 e 3,2 ppm causa um rápido desenvolvimento folicular de folículos primordiais e também a formação de folículos atrésicos em um curto período de tempo, por essa razão que não é possível identificar na análise histopatológica folículos ovarianos (CHEN et al., 2015).

Com relação ao desenvolvimento folicular, Chen et al. (2015) descreveram que as leitoas do grupo controle foram observados um grande número de folículos em vários estágios de desenvolvimento, com a presença de muitos folículos primordiais, poucos folículos primários e nenhum folículo maduro. Os resultados descritos pelos autores anteriormente foram similares aos deste estudo.

Chen et al. (2015) descreveram que as leitoas que foram intoxicadas com 1,1 ppm de ZEA houve desenvolvimento de folículos primordiais no córtex dos ovários, oócitos de tamanhos regulares com formado oval ou redondo. Neste estudo a partir da concentração de 0,25 ppm já observamos a presença de folículos primordiais degenerados, e com aumento de ZEA nas dietas ocorreu aumento no número de folículos primordiais e primários degenerados.

O número de folículos primordiais e de folículos primários observados no córtex ovariano foi estatisticamente menor nos tratamentos que consumiram 2 e 3,2 ppm de ZEA quando comparados ao grupo controle, no estudo de Chen et al. (2015). E ainda, as leitoas que consumiram 3,2 ppm de ZEA foi observado oócitos com atrofia ou degenerados em folículos primordiais (CHEN et al., 2015). Resultados similares aos encontrados neste estudo, já que na análise histopatológica também observamos um número menor de folículos primordiais e de folículos primários nas leitoas que consumiram ZEA na concentração de 0,6 ppm (T05) e nas leitoas que consumiram 2 ppm de ZEA (T07 e T08).

Chen et al. (2015) também investigaram o número de células apoptóticas presentes nos ovários em sua pesquisa, as leitoas que consumiram 1,1 ppm de ZEA tiveram um número significativamente menor de células apoptóticas do que as leitoas do grupo controle. As leitoas que consumiram 2 e 3,2 ppm de ZEA houve um número alto de células normais, sem haver células apoptóticas.

As lesões histopatológicas (e seus graus) presentes nas três porções uterinas das leitoas dos oito tratamentos foram iguais e estão expostas em uma tabela única (Tabela 15).

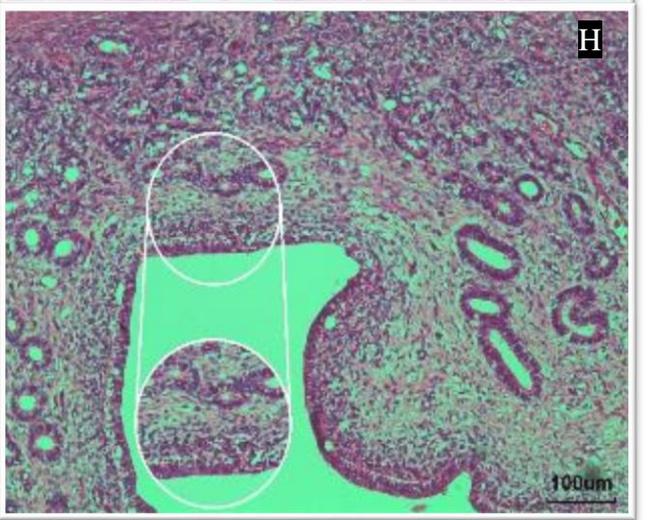
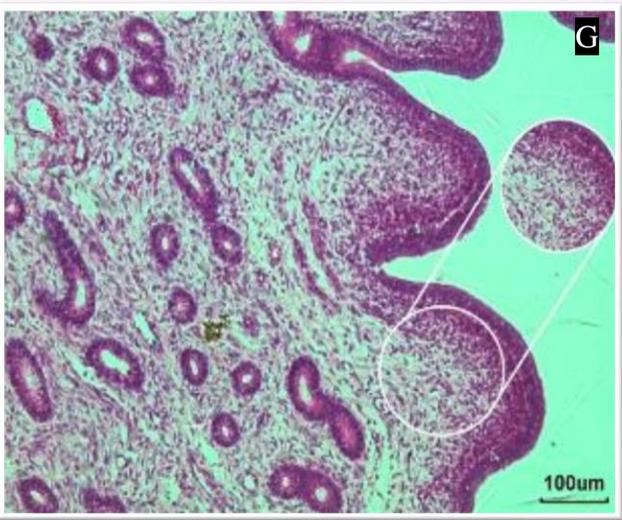
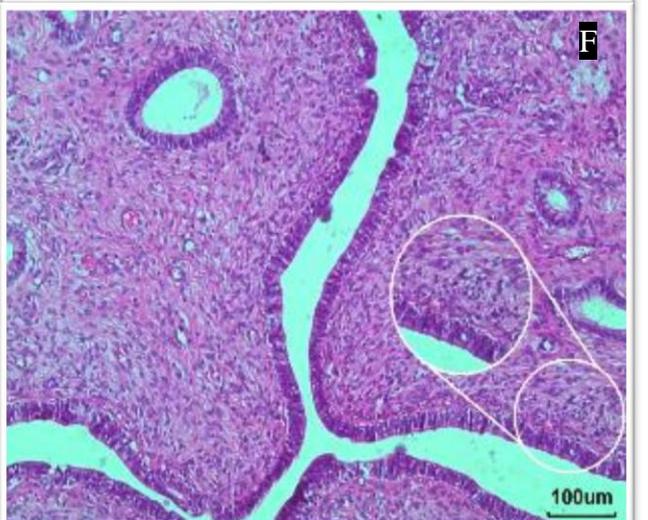
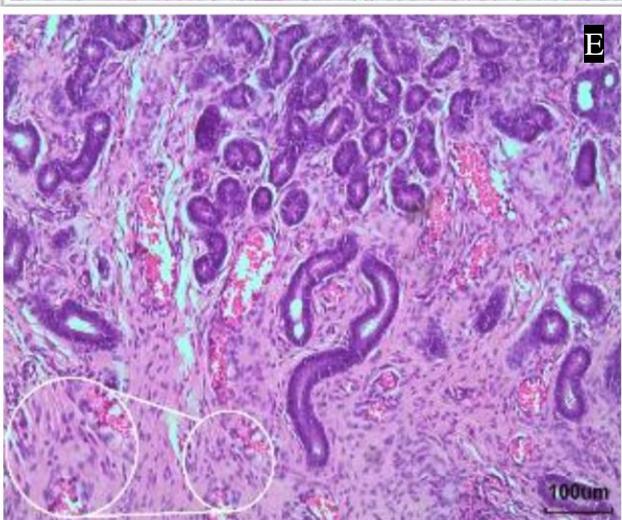
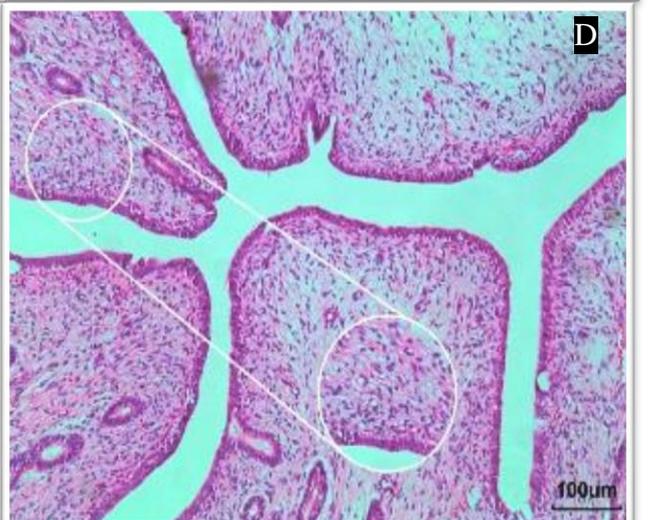
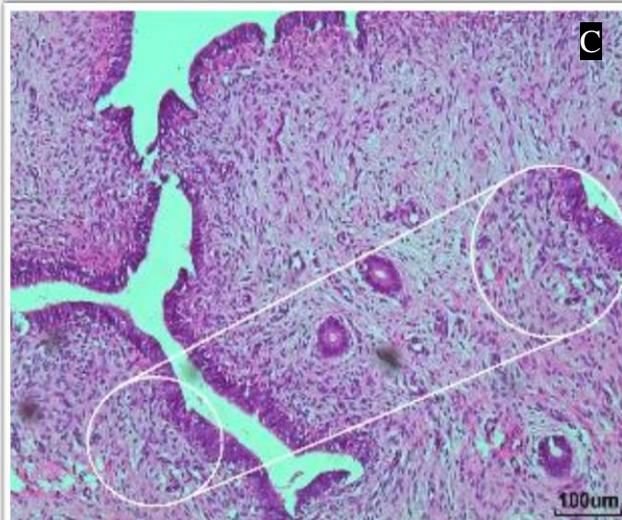
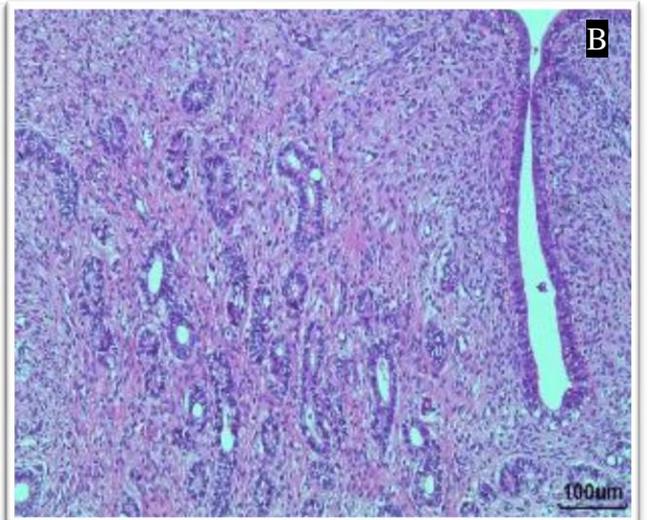
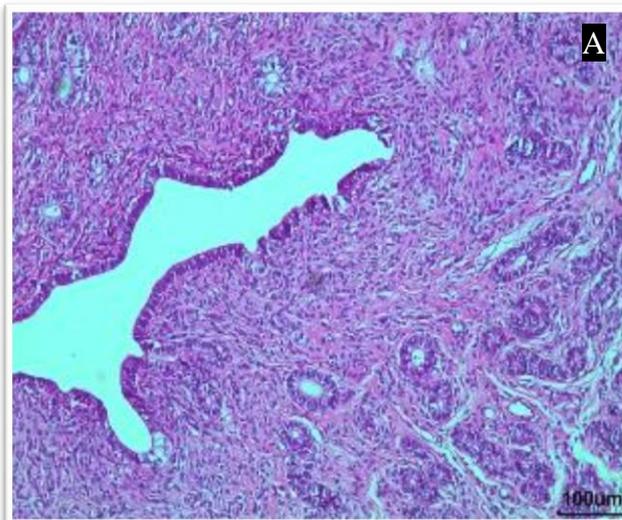
Tabela 15: Alterações histopatológicas observadas no útero proximal, médio e distal dos animais dos oito tratamentos, abatidos aos 21 dias.

Alterações histopatológicas	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
Hiperemia	-	-	+	+	++	++	+++	++
Endométrio com infiltrado inflamatório	+	+	+	+	++	++	+++	++
Irregularidade no epitélio uterino	+	+	++	+	++	++	++	+
Lúmen das glândulas uterinas dilatadas	-	-	+	-	++	++	++	+

^aLegenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Foram observadas poucas alterações nas três porções uterinas dos animais dos grupos controles (T01 e T02). O efeito dose dependente foi observado nas três porções uterinas, ocorrendo maior intensidade das alterações histológicas, conforme o aumento da concentração da micotoxina. Nos animais intoxicados com 0,25 ppm de ZEA (T03) as análises histológicas mostraram os mesmos resultados para as três porções uterinas, sendo que no grupo T04 ocorreu atenuação da irregularidade do epitélio e ausência de dilatação no lúmen das glândulas uterinas. Os resultados referentes aos grupos T05, T06, T07 e T08 evidenciam a presença de todas as alterações histopatológicas. Não foram observadas diferenças no grau de intensidade das alterações entre os grupos T05 e T06. Nas leitoas do grupo T08 foi observado discreta irregularidade no epitélio uterino e o lúmen das glândulas com discreta dilatação, já no grupo T07 essas alterações foram moderadas. Logo, o uso do AAM está associado a um menor grau de intensidade das alterações histopatológicas nas concentrações de 0,25 e 2,0 ppm de ZEA (Figura 29)

Figura 29: Fotomicrografia do útero das leitoas dos oito tratamentos: A-B - Aspecto histológico habitual com endométrio, miométrio e perimétrio sem particularidades, T01-T02; C - Endométrio com infiltrado linfoplasmocitário, hiperemia e glândulas com lúmen dilatados, T03; D - Endométrio com infiltrado linfocitário e hiperêmico, T04; E-F-G-H - Endométrio com infiltrado linfoplasmocitário, hiperemia e glândulas com lúmen dilatados, T05-T06-T07-T08. HE. 10x.



Gajecka et al. (2012), relataram que também houve presença discreta de infiltrado inflamatório abaixo do epitélio do grupo controle no exame histopatológico do útero. O experimento realizado por esses pesquisadores foi feito com duas concentrações de ZEA (20 e 40 ppb por Kg de peso corporal) em leitões pré-púberes. As alterações observadas nos dois grupos intoxicados experimentalmente estão em acordo com o presente estudo, havendo hiperemia, infiltrado inflamatório no endométrio, irregularidade no epitélio uterino e dilatação das glândulas uterinas. No grupo intoxicado com a maior dose ainda foi relatado, necrose no miométrio e fibrose endometrial.

Alterações na estrutura morfológica do útero, também foram descritas por Chen et al. (2015), ZEA pode afetar o desenvolvimento e a estrutura morfológica das camadas uterinas em leitões pré-púberes, porque essa micotoxina reduz a secreção de hormônios luteinizantes e de progesterona.

O aumento do nível estrógeno (endógeno ou exógeno) provoca vasodilatação e neovascularização, sendo essas umas das principais alterações histopatológicas observadas no útero observadas de fêmeas intoxicadas por ZEA (STOPA et al., 2014), em acordo com este estudo.

Leitões pré-púberes possuem baixos níveis de estrógeno endógeno, o que possibilita efeitos deletérios, como lesões e proliferação de células dependentes de hormônio, para a saúde do animal, quando o organismo é suplementado com doses de estrógeno exógeno. Já em fêmeas adultas a combinação da atividade do estrógeno endógeno com o fitoestrogênio causa alterações leves no útero (GAJECKA et al., 2012). E ainda, a ZEA é um análogo do estrogênio, esses compostos parecem regular a resposta imune presente no trato reprodutivo de fêmeas. Portanto, as células de defesa e a intensa hiperemia observadas nos animais intoxicados são decorrentes dos níveis circulantes desse análogo do estrógeno (CAMARGO et al., 2009).

A atenuação das lesões histopatológicas nos grupos de animais que consumiram o AAM também foi demonstrada por Jiang et al. (2012). Os autores evidenciaram as alterações histopatológicas no trato reprodutivo de leitões e mostraram que a adição do AAM na dieta reduziu os efeitos deletérios causados pelo consumo da ZEA.

4.2 Resultados Experimento II (Leitões Pré-Púberes)

4.2.1 Análises da bioquímica sérica

Os resultados obtidos nas análises da bioquímica sérica dos leitões pré-púberes estão apresentados na Tabela 16. No que se refere a cada parâmetro analisado, fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina, não ocorreu associação entre a ZEA e desses parâmetros. Os valores de uréia dos animais que consumiram 2 e 0,25 ppm de ZEA ficaram abaixo dos valores de referência, porém não houve associação estatística significativa entre o consumo de ZEA com a alteração dos níveis de uréia. Os valores de ALP e creatinina ficaram dentro dos valores de referência.

Tabela 16: Efeito dos tratamentos sobre a bioquímica sérica dos leitões pré-púberes ao 21º dia de experimento¹.

Tratamentos	Bioquímica sérica		
	ALP	Ureia	Creatinina
Controle negativo	324,5	23,5	1,25
0,25 ppm ZEA	307,0	16,0	1,05
0,6 ppm ZEA	359,5	23,0	1,10
2,0 ppm ZEA	268,5	13,5	1,20

¹ Resultados expressos em média

Teste Exato de Fisher = ALP: p-valor=1,00005; Ureia: p-valor=0,4286; Creatinina: p-valor=1,0000

Valores de referência = Ureia: 21-64,2; ALP: 118-395; Creatinina: 1-2,7

Teixeira et al. (2011), não observaram diferença significativa para os parâmetros da bioquímica sérica de leitões intoxicadas com 0,75 ppm de ZEA, em acordo com os resultados deste estudo. Esses autores relatam em seu trabalho que leitões expostas a 3 ppm de ZEA ocorreu um aumento dos níveis de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase e gama glutamil transferase), havendo ação tóxica para o fígado. No entanto, estudos que mostram a influência da ZEA sobre parâmetros da bioquímica sérica de suínos é escasso (TEIXEIRA et al., 2011).

4.2.2 Análises histomorfométricas

Com relação ao comprimento testicular direito e esquerdo (Tabela 17 e 18), não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais no 1º dia de experimento, como também não foi observado diferença estatística no 21º de experimento.

Tabela 17: Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular direita (comprimento) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento¹.

Comprimento Testicular (mm)	Tratamentos				p-valor
	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA	
1º Dia	58,24 ^a ±1,83	50,48 ^a ±0,25	60,18 ^a ±1,07	55,50 ^a ±402	0,14
21º Dia	72,83 ^a ±7,47	59,01 ^a ±1,16	66,60 ^a ±6,18	67,94 ^a ±2,06	0,19

¹ Resultados expressos em médias± Desvio padrão

^a Médias com mesma letra nas linhas indicam igualdade pelo Teste de Fisher para p>0,05
ZEA = zearalenona (ppm or mg kg⁻¹).

Tabela 18: Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular esquerda (comprimento) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento¹.

Comprimento Testicular (mm)	Tratamentos				p-valor
	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA	
1º Dia	56,30 ^a ±6,04	51,04 ^a ±0,52	60,27 ^a ±1,05	57,87 ^a ±5,37	0,30
21º Dia	68,65 ^a ±7,21	59,10 ^a ±0,76	65,93±6,34	65,57 ^a ±2,34	0,38

¹ Resultados expressos em médias± Desvio padrão

^a Médias com mesma letra nas linhas indicam igualdade pelo Teste de Fisher para p>0,05
ZEA = zearalenona (ppm or mg kg⁻¹).

Comparações com dados de pesquisas anteriores não são possíveis, pois este estudo representa o primeiro acerca da biometria testicular.

De acordo com Benzoni et al. (2008), a intoxicação experimental por baixas doses de ZEA em leitões pré-púberes causa diminuição da libido, redução do nível de testosterona no plasma sanguíneo e retarda o aparecimento do comportamento sexual. Os autores ainda relatam que em ensaios *in vivo* com machos suínos adultos ocorreu diminuição do peso testicular e diminuição da motilidade espermática nos animais que consumiram ZEA.

Existe uma diferença, ainda não explicada, na metabolização da ZEA por machos e fêmeas, visto que administrando a mesma dose em machos e fêmeas suínas, a concentração de ZEA e de seus metabólitos no plasma sanguíneo das fêmeas é maior que nos machos (BENZONI et al. 2008).

Os resultados foram os mesmos que os anteriores, não ocorreu diferença estatística significativa entre os grupos intoxicados com diferentes concentrações de ZEA para largura do testículo direito e esquerdo no 1º e no 21º dia de experimento (Tabela 19 e 20). A inclusão das três concentrações de ZEA não interferiu no comprimento e na largura testicular dos leitões pré-púberes, já que houve igualdade estatística com o grupo controle.

Tabela 19: Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular direita (largura) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento¹.

Largura Testicular (mm)	Tratamentos				p-valor
	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA	
1º Dia	25,97 ^a ±1,73	26,61 ^a ±1,24	29,00 ^a ±0,14	26,97 ^a ±0,91	0,19
21º Dia	30,13 ^a ±3,00	32,89 ^a ±0,47	34,00 ^a ±5,62	28,53 ^a ±0,40	0,41

¹ Resultados expressos em médias± Desvio padrão

^a Médias com mesma letra nas linhas indicam igualdade pelo Teste de Fisher para p>0,05

ZEA = zearalenona (ppm or mg kg⁻¹).

Tabela 20: Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a biometria testicular esquerda (largura) dos leitões ao 1º e 21º dia de experimento¹.

Largura Testicular (mm)	Tratamentos				p-valor
	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA	
1º Dia	25,80 ^a ±2,72	26,24 ^a ±0,78	29,06 ^a ±0,69	25,68 ^a ±2,20	0,26
21º Dia	30,70 ^a ±0,66	31,65 ^a ±1,55	32,35 ^a ±4,07	28,08 ^a ±1,28	0,28

¹ Resultados expressos em médias± Desvio padrão

^a Médias com mesma letra nas linhas indicam igualdade pelo Teste de Fisher para p>0,05

ZEA = zearalenona (ppm or mg kg⁻¹).

Pesquisadores apontam que o testículo é sensível a ZEA. O consumo de ZEA leva a uma diminuição da produção de testosterona, no entanto o mecanismo de como a ZEA interfere no metabolismo de machos ainda é desconhecido (LIU et al. 2014).

A análise dos resultados do histomorfometria dos testículos não detectou nenhuma significância estatística quanto a distância entre os túbulos seminíferos e a altura do epitélio dos túbulos seminíferos para os quatro níveis de inclusão de ZEA (Tabela 21 e 22). Portanto, a inclusão de ZEA nas dietas não afetou a histomorfometria dos órgãos.

Tabela 21: Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a espessura do epitélio dos túbulos seminíferos dos leitões ao 21° dia de experimento¹.

Espessura do epitélio dos túbulos seminíferos (µm)	Tratamentos				p-valor
	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA	
Testículo direito	11,88 ^a ±0,79	11,37 ^a ±0,54	11,41 ^a ±0,69	11,11 ^a ±1,10	0,82
Testículo esquerdo	12,10 ^a ±0,97	10,72 ^a ±1,09	11,14 ^a ±0,77	10,35 ^a ±1,23	0,45

¹ Resultados expressos em médias± Desvio padrão

^a Médias com mesma letra nas linhas indicam igualdade pelo Teste de Fisher para p>0,05

ZEA = zearalenona (ppm or mg kg⁻¹).

Tabela 22: Efeito das diferentes doses de ZEA sobre a distância entre os túbulos seminíferos dos leitões ao 21° dia de experimento¹.

Distância entre os túbulos seminíferos (µm)	Tratamentos				p-valor
	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA	
Testículo direito	13,38 ^a ±0,07	14,07 ^a ±0,83	14,01 ^a ±0,21	14,43 ^a ±0,87	0,24
Testículo esquerdo	14,76 ^a ±2,52	15,57 ^a ±1,61	13,50 ^a ±0,42	13,04 ^a ±0,13	0,41

¹ Resultados expressos em médias± Desvio padrão

^a Médias com mesma letra nas linhas indicam igualdade pelo Teste de Fisher para p>0,05

ZEA = zearalenona (ppm or mg kg⁻¹).

Novamente não existem dados na literatura mundial para serem comparados com os resultados deste estudo, acerca da histomorfometria testicular de leitões experimentalmente intoxicados por ZEA.

Segundo Wang et al. (2014) pouco se sabe sobre os efeitos da ZEA sobre parâmetros reprodutivos de machos. Em seus estudos os autores mostraram através de ensaios *in vitro* que a exposição a baixas doses de ZEA causa autofagia das células Leydig presentes nos testículos, sendo um mecanismo de proteção contra a citotoxicidade dessa micotoxina, causando uma diminuição das células intersticiais do testículo de ratos.

De modo geral, os poucos trabalhos que abordam estudos com machos intoxicados por ZEA mostram que o consumo dessa micotoxina reduz em 30% o peso dos testículos, reduz a qualidade e a viabilidade espermática. Em cachos ocorre diminuição da produção de testosterona (MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008).

Os valores obtidos nas mensurações dos animais sugerem que não existem alterações no parênquima testicular. A ausência de resposta a ZEA por esses animais pode ser atribuída ao fato de que leitões pré-púberes ainda não possuem ação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. Portanto, ainda não há desenvolvimento do parênquima testicular, como também não existe a produção de testosterona e de células espermáticas. A interferência da ZEA sobre parâmetros histomorfométricos poderia ocorrer através de um maior tempo de ingestão da micotoxina, ou através da intoxicação experimental de machos jovens no início ou durante a fase reprodutiva.

A variação do “n” amostral de duas repetições por cada grupo experimental pode levar a um aumento do intervalo de confiança das medidas nas comparações entre os grupos. Com isso pode-se estar igualando valores que são distintos quando há aumento da amostragem para limites superiores ao grau de liberdade dez na variância do erro. Nos valores observados o grau de liberdade do erro é 7. A ausência de repetições dos tratamentos ocorreu devido a limitações orçamentárias não sendo respeitado o grau de liberdade do erro.

4.2.3 Análises histopatológicas

As alterações histopatológicas (e seus graus) presentes nas glândulas acessórias dos leitões dos quatro tratamentos experimentais estão apresentadas nas Tabelas 23, 24 e 25.

Tabela 23: Alterações histopatológicas observadas na vesícula seminal dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações Histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Infiltrado inflamatório	-	++	-	-
Hiperemia	++	++	++	++

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Tabela 24: Alterações histopatológicas observadas na glândula bulbouretral dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações Histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Infiltrado inflamatório em tecido adiposo periglandular	-	+	-	-
Hiperemia	-	+	+	-

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

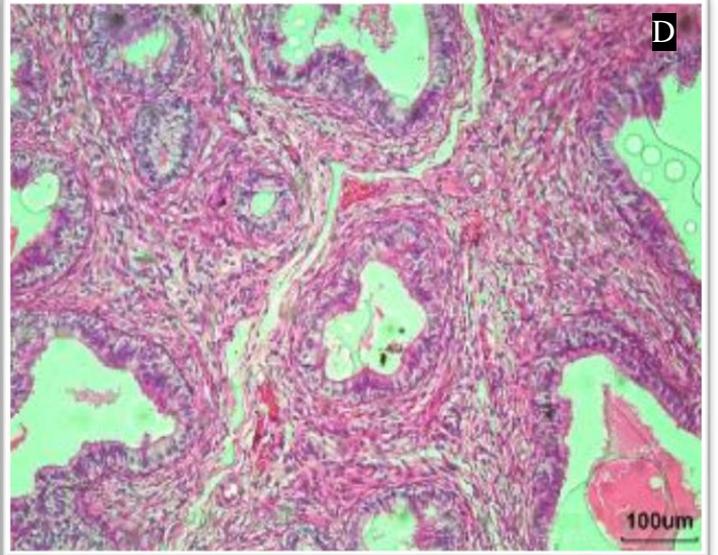
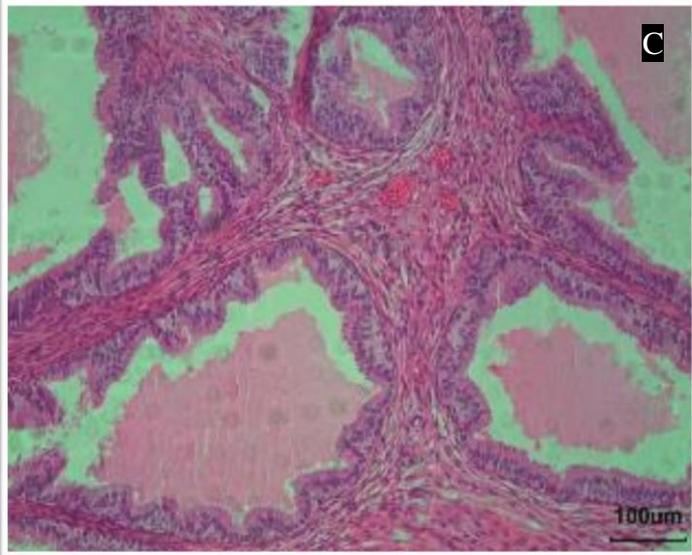
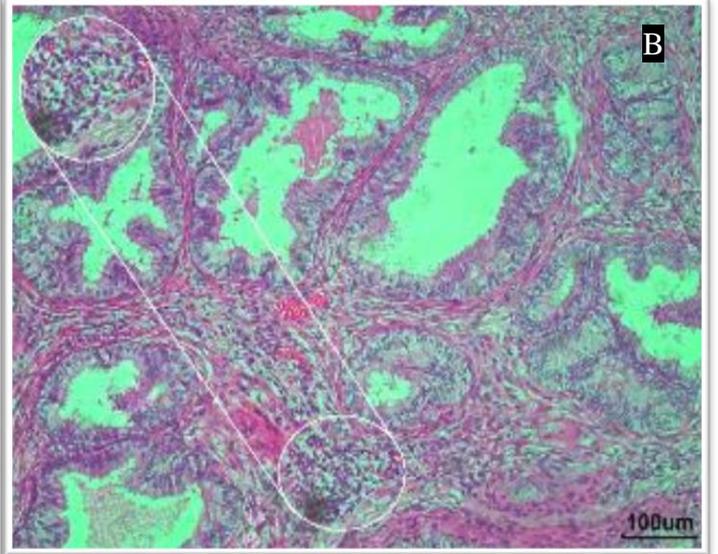
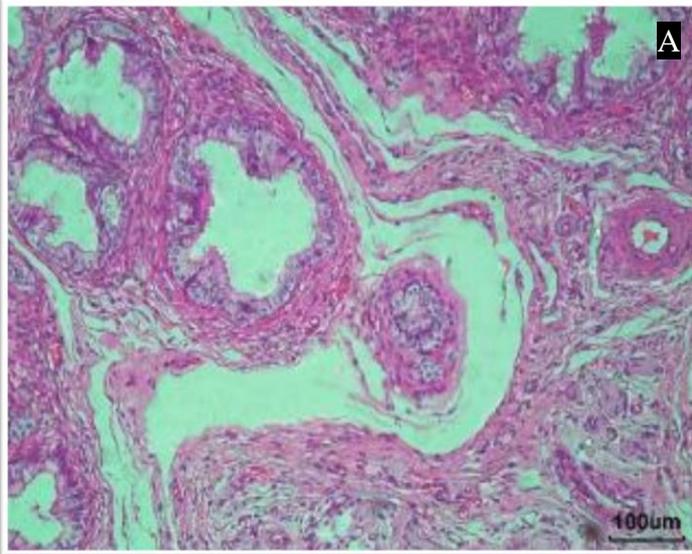
Tabela 25: Alterações histopatológicas observadas na próstata dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações Histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Hiperemia	-	+	++	++
Infiltrado inflamatório	-	+	+	+
Hemorragia	-	+	-	+

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

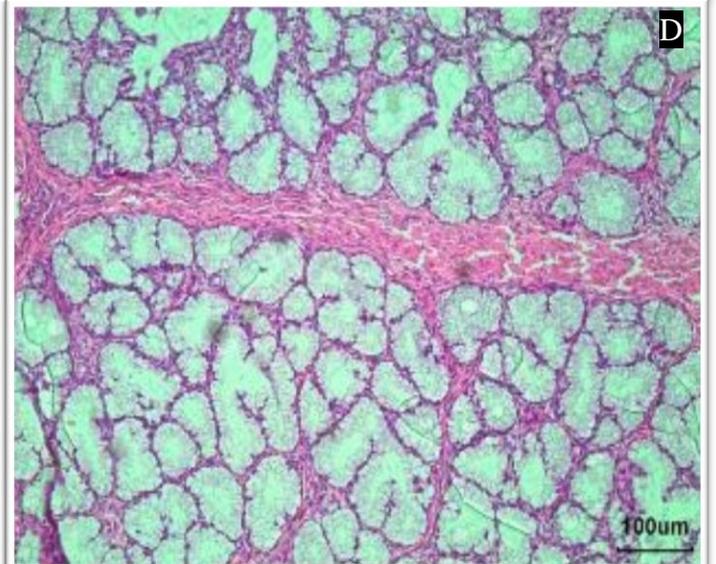
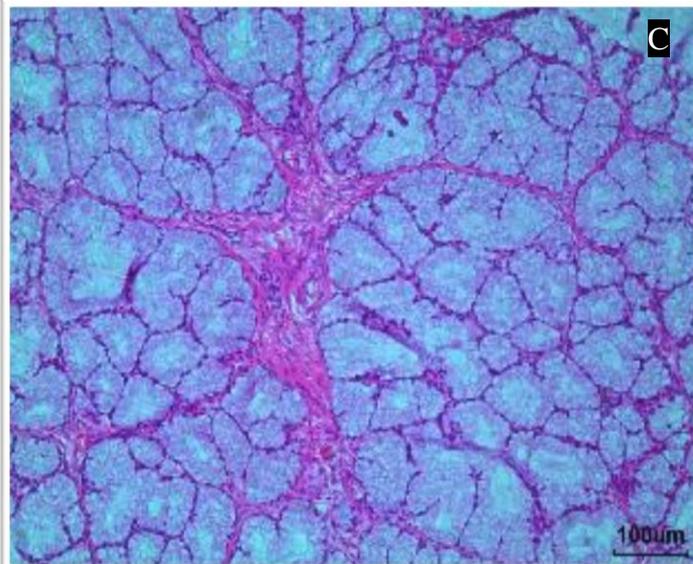
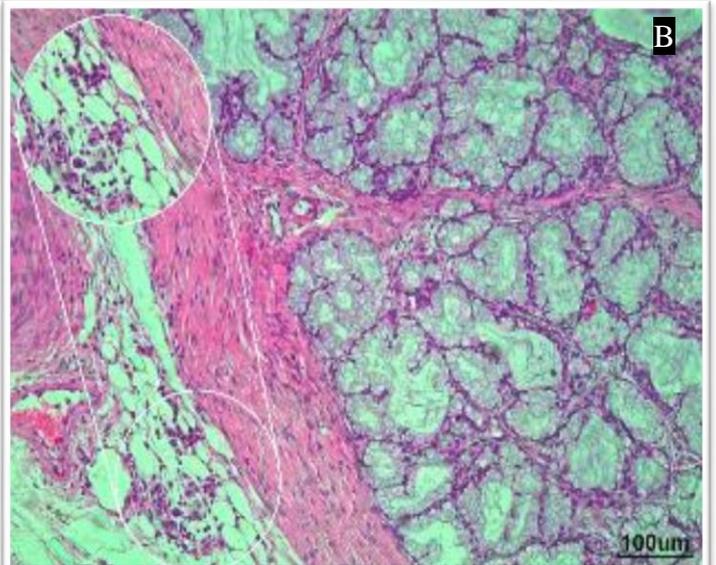
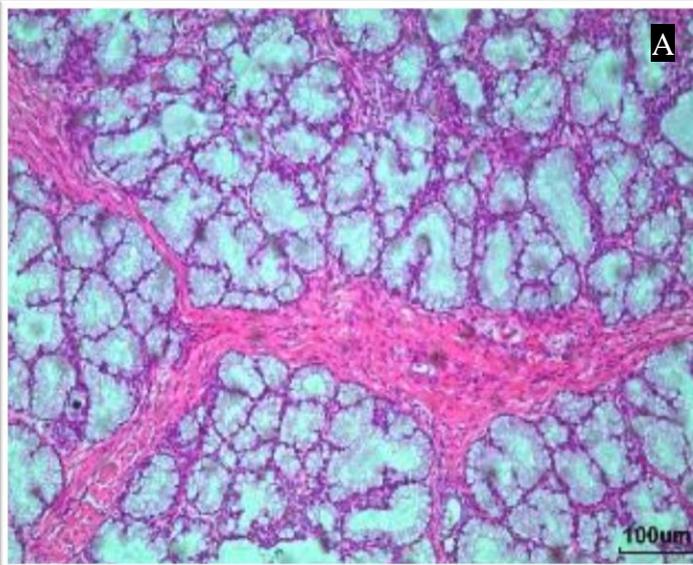
Com relação a vesícula seminal, os animais do grupo controle apresentaram apenas hiperemia, alteração que também foi observada nos animais dos demais grupos. Nos leitões que consumiram 0,25 ppm de ZEA ainda foi observado infiltrado inflamatório no estroma da vesícula seminal (Figura 30).

Figura 30: Fotomicrografia da vesícula seminal dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual com mucosa pregueada, e por vezes exibindo secreção eosinofílica na luz dos túbulos. A - controle negativo, hiperemia; B - ZEA 0,25 ppm, infiltrado linfoplasmocitário multifocal e hiperemia; C - ZEA 0,6 ppm, hiperemia; D - ZEA 2,0 ppm, hiperemia. (HE). 10X.



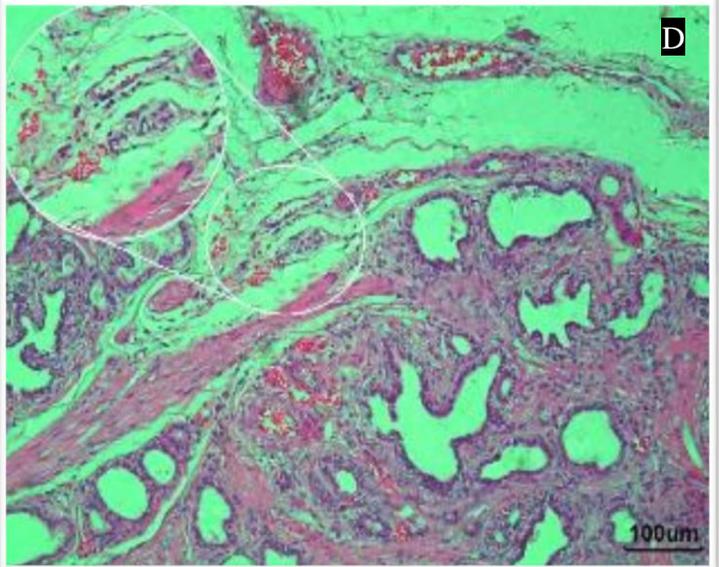
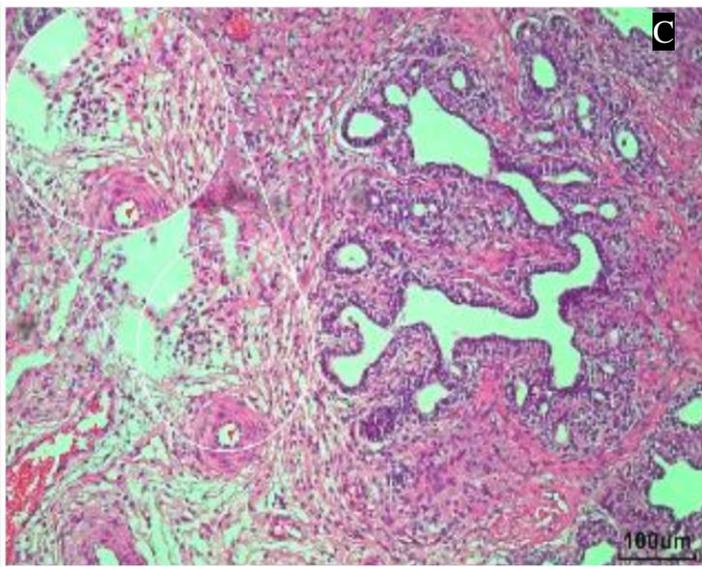
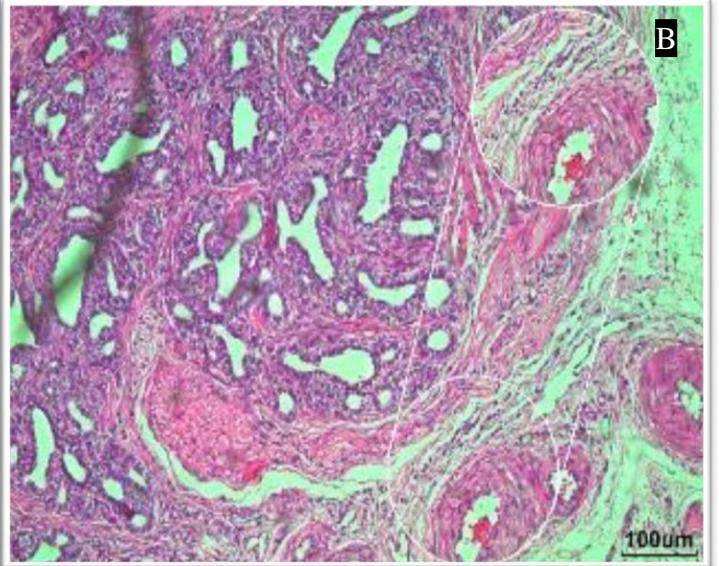
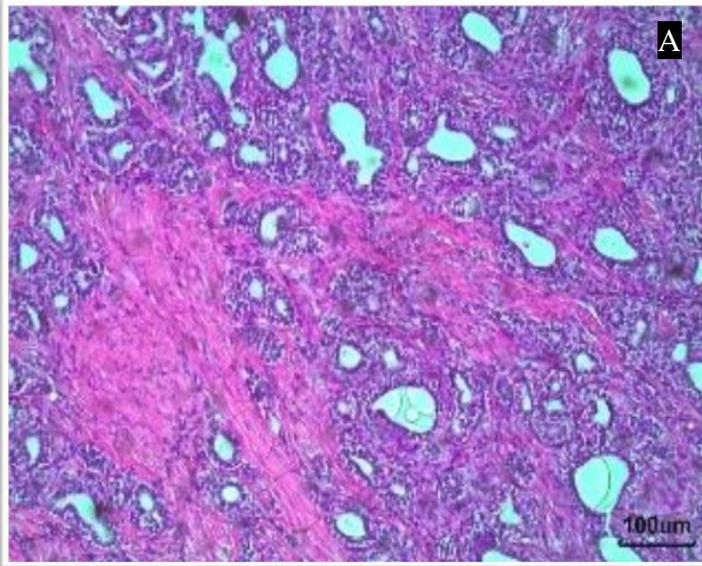
Com relação a glândula bulbouretral, não foram observadas alterações histológicas nos animais do grupo controle negativo, assim como nos animais que consumiram a maior concentração de ZEA (2,0 ppm). Apenas os animais que ingeriram 0,6 ppm e 0,25 ppm de ZEA apresentaram modificações na glândula bulbouretral (Figura 31), com hiperemia, e hiperemia e infiltrado inflamatório, respectivamente.

Figura 31: Fotomicrografia da glândula bulbouretral dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual exibindo epitélio secretor. A - controle negativo, sem alterações; B - ZEA 0,25 ppm, infiltrado linfoplasmocitário em tecido adiposo periglandular; C - ZEA 0,6 ppm, hiperemia; D - ZEA 2,0 ppm, sem alterações. HE. 10X.



Com relação a próstata, não foram verificadas alterações histopatológicas neste órgão nos leitões do grupo controle. Nos animais dos grupos 2,0 ppm ZEA e 0,25 ppm ZEA as modificações histológicas encontradas na próstata foram hiperemia, infiltrado inflamatório e hemorragia, ocorrendo apenas diferença no grau de intensidade desses achados. Já no grupo tratado com 0,6 ppm de ZEA foram observadas duas alterações histopatológicas no órgão, hiperemia e infiltrado inflamatório. (Figura 32).

Figura 32: Fotomicrografia da próstata dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual por vezes exibindo secreção eosinofílica na luz dos túbulos: A - controle negativo, sem alterações. B - 0,25 ppm ZEA, hiperemia, infiltrado linfoplasmocitário e hemorragia multifocal no estroma fibromuscular; C - 0,6 ppm ZEA, hiperemia e infiltrado linfoplasmocitário no estromacfibromuscular; D - 2,0 ppm ZEA, hiperemia, infiltrado linfoplasmocitário próximo as trabéculas e pontos hemorrágicos. HE. 10X



A inclusão de ZEA nas dietas não provocou alteração histológica dessas glândulas. De modo geral os achados encontrados nesses tecidos foram discretos a moderados. Não foi observado maior grau de alteração conforme o aumento na concentração de ZEA, não havendo um efeito dose dependente.

Baixos níveis de estrogênio existem no sistema reprodutivo de machos, e são responsáveis por estimular a espermatogênese e a síntese de esteroides. A ZEA interfere nas ações mediadas pelo estrógeno endógeno, e causa efeitos negativos em órgãos reprodutivos de machos (JIANG et al., 2012). A exposição dos machos a análogos do estrógeno causa inflamação de glândulas acessórias, como a próstata e outras mudanças que afetam a fertilidade e a função reprodutiva destes indivíduos (KLINFELTER e HESS, 1988). Klinefelter e Hess (1988), relataram que a ZEA provoca efeito deletério nos órgãos do aparelho reprodutivo de machos suínos jovens, resultado similar ao encontrado neste estudo.

Farnworth e Trenholm (1983) realizaram um experimento com 12 leitões recém desmamados com peso inicial médio de 10,95 Kg, a ZEA foi administrada em cápsulas de gelatina por via oral durante 4 dias consecutivos, nas concentrações de 0, 5, 10 e 15 ppm por Kg de peso corporal. Os resultados desses autores mostraram que os animais do grupo controle tiveram os órgãos do aparelho reprodutivo (testículos, glândula bulbouretral e vesícula seminal) mais pesados do que os animais que consumiram a ZEA, embora essa diferença não foi significativa, nenhuma análise histopatológica foi realizada.

As alterações histopatológicas (e seus graus) presentes no testículo direito e esquerdo dos leitões pré-púberes foram iguais, e estão apresentados em uma tabela única (Tabela 26).

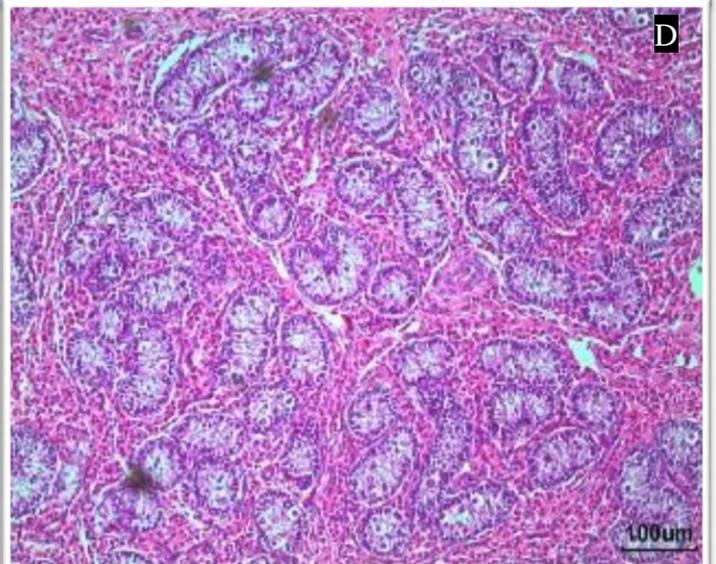
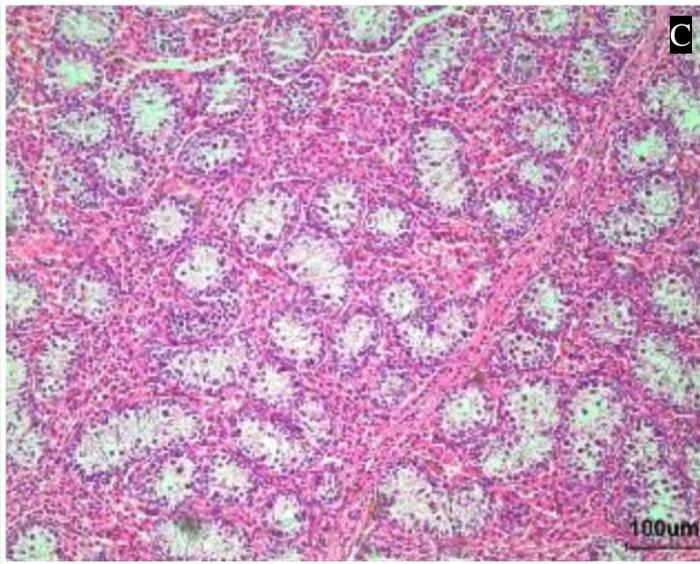
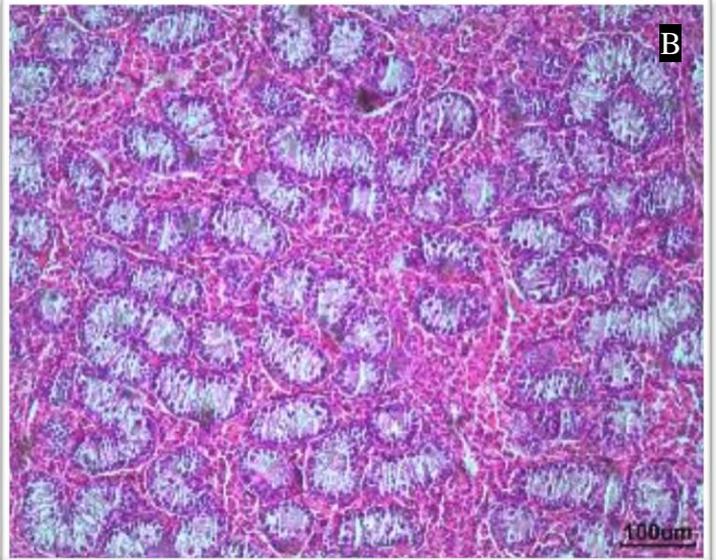
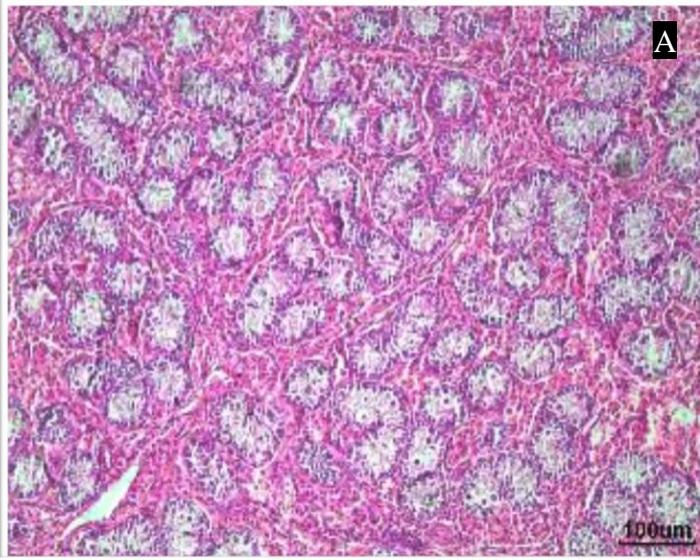
Tabela 26: Alterações histopatológicas observadas no testículo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações Histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Hiperemia	+	+	+	+

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Ocorreu hiperemia discreta nos testículos dos animais dos quatro tratamentos (Figura 33). A hiperemia pode ser um processo fisiológico ou patológico, quando patológico está relacionada com processo inflamatório agudo. Nesse estudo os resultados encontrados não se tratam de um processo patológico, pois não foi observado infiltrado inflamatório, degeneração ou necrose. As alterações inespecíficas observadas nas lâminas testiculares podem estar relacionadas com o aumento de fluxo sanguíneo e/ou diminuição da resistência pré-capilar, não podendo ser atribuída a ingestão de ZEA.

Figura 33: Fotomicrografia dos testículos dos leitões dos quatro tratamentos com parênquima imaturo com presença de túbulos seminíferos em desenvolvimento e grande quantidade de células de Leydig no tecido intersticial, ausência de espermatogênese. A - controle negativo, vasos hiperêmicos; B - 0,25 ppm ZEA, vasos hiperêmicos; C - 0,6 ppm ZEA, vasos hiperêmicos; D - 2,0 ppm ZEA, vasos hiperêmicos. HE. 10X.



Jiang et al. (2012) realizaram um ensaio *in vivo* com 18 leitões com idade inicial de 21 dias, que foram intoxicados com 1 ppm de ZEA e o experimento teve duração total de 22 dias. Na análise histopatológica dos testículos desses animais os autores não encontraram nenhuma alteração, no grupo intoxicado e no grupo controle.

Na tabela 27 estão relacionadas as alterações (e seus graus) histopatológicas encontradas no ducto deferente direito e esquerdo dos leitões pré-púberes, as lesões e seus graus foram iguais e estão disposto em uma tabela única.

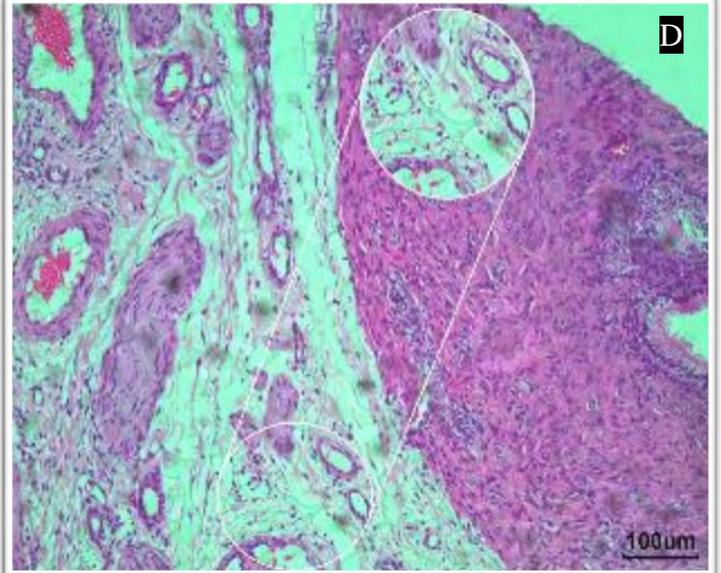
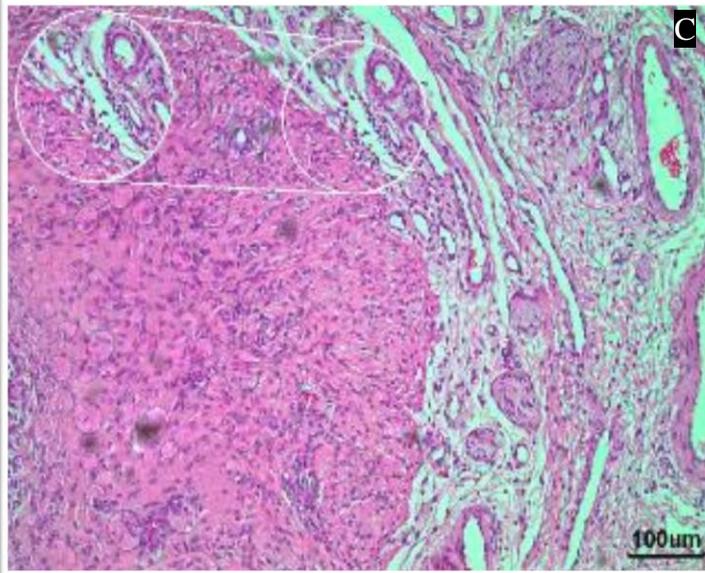
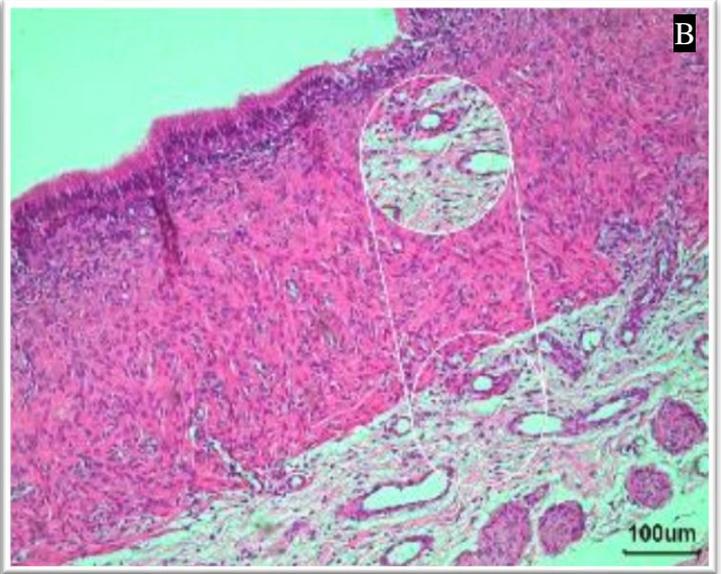
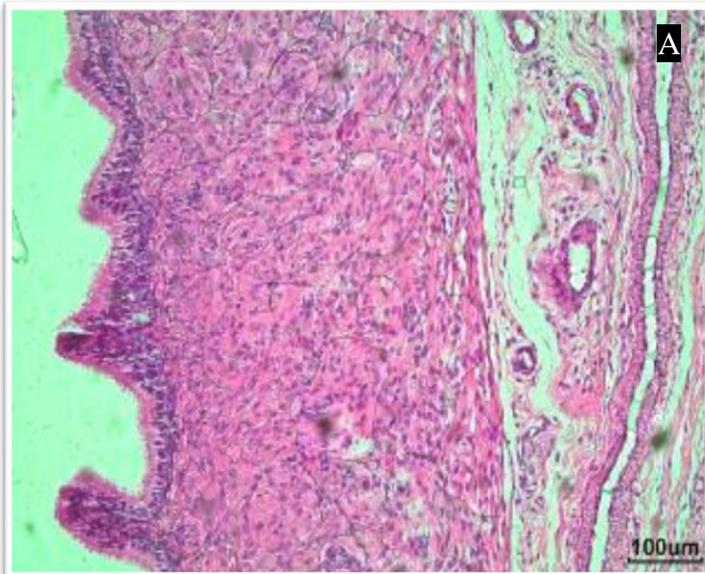
Tabela 27: Alterações histopatológicas observadas no ducto deferente direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Hiperemia	-	-	+	++
Infiltrado inflamatório na submucosa	-	+	+	+
Infiltrado inflamatório na serosa	-	+	+	+

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

A ZEA provocou alterações nos ductos deferentes, as lesões encontradas foram discretas, havendo apenas hiperemia moderada nos animais do intoxicados com 2 ppm de ZEA, e ausência de hiperemia no grupo que ingeriu 0,25 ppm de ZEA. Pode ter ocorrido um efeito dose dependente na hiperemia dos ductos deferentes, porém o mesmo não ocorreu com o infiltrado inflamatório (Figura 34). Nos leitões do grupo controle não foram encontradas modificações histopatológicas.

Figura 34: Fotomicrografia dos ductos deferentes dos leitões dos quatro tratamentos de aspecto histológico habitual exibindo epitélio pseudoestratificado e camada muscular espessada: A - controle negativo, sem alterações; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado linfoplasmocitário na submucosa e na serosa; C - 0,6 ppm ZEA, hiperemia dos vasos, infiltrado linfoplasmocitário na submucosa e na serosa; D - 2,0 ppm ZEA, hiperemia dos vasos, infiltrado linfoplasmocitário na submucosa e na serosa. HE. 10X.



Muitos estudos abordam os efeitos da ZEA em fêmeas, porém pouco ainda se sabe sobre os efeitos dessa *Fusarium* toxina em machos (WANG et al., 2014, BENZONI et al., 2008). Não existem dados científicos para serem comparados com os resultados deste estudo, referentes a histopatologia de ducto deferente de leitões pré-púberes intoxicados com ZEA.

Segundo Marin et al. (2013), a ZEA pode induzir a inflamação em órgãos e tecidos, sendo responsável por resposta inflamatória no baço, na corrente sanguínea e em órgãos reprodutivos. No presente estudo ocorreu indução do processo inflamatório em órgãos do trato reprodutivo.

Nas Tabelas 28, 29 e 30 estão relacionadas as alterações histopatológicas encontradas nas três porções (cabeça, corpo e cauda) do epidídimo direito e esquerdo, as lesões foram iguais e estão dispostas em tabela única para cada porção epididimal.

Tabela 28: Alterações histopatológicas observadas na cabeça do epidídimo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Infiltrado inflamatório no estroma peritubular	+	++	++	++
Hiperemia	+	+	+	+

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Tabela 29: Alterações histopatológicas observadas no corpo do epidídimo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Infiltrado inflamatório no estroma peritubular	+	++	++	++
Hiperemia	+	+	+	+

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Tabela 30: Alterações histopatológicas observadas na cauda do epidídimo direito e esquerdo dos animais dos quatro tratamentos após 21 dias de experimento.

Alterações histopatológicas	Controle negativo	0,25 ppm ZEA	0,6 ppm ZEA	2,0 ppm ZEA
Infiltrado inflamatório no estroma peritubular	+	+++	++	++
Hiperemia	+	++	++	++

Legenda: ausente (-); discreta (+); moderada (++); intensa (+++).

Hiperemia e infiltrado inflamatório discretos foram encontrados na microscopia do epidídimo dos leitões do grupo controle negativo. Nos demais tratamentos esses achados foram discretos a moderados, na porção da cabeça e corpo do epidídimo direito e esquerdo. Na porção caudal epididimária foram observadas alterações mais intensas nos animais que consumiram 2,0 ppm de ZEA, nos demais grupos a intensidade das alterações foi moderada (Figuras 35, 36 e 37).

Figura 35: Fotomicrografia da cabeça do epidídimo dos leitões dos quatro tratamentos, túbulos epididimários de aspecto histológico habitual, exibindo na luz de poucos túbulos material eosinofílico e ausência de espermatozoides. A - controle negativo, sem alterações; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; C - 0,6 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; D - 2,0 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos. HE. 10X.

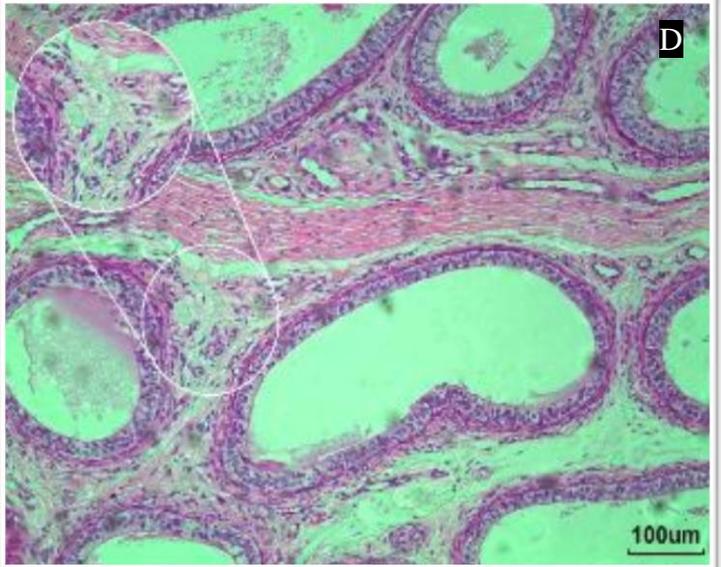
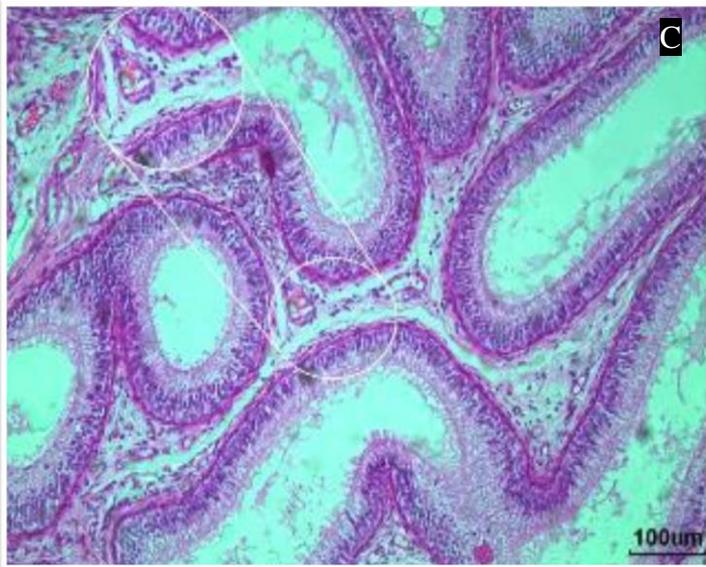
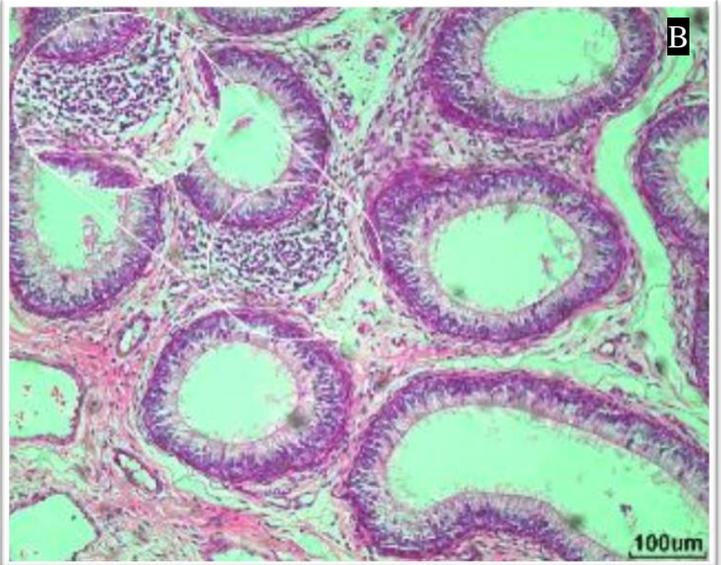
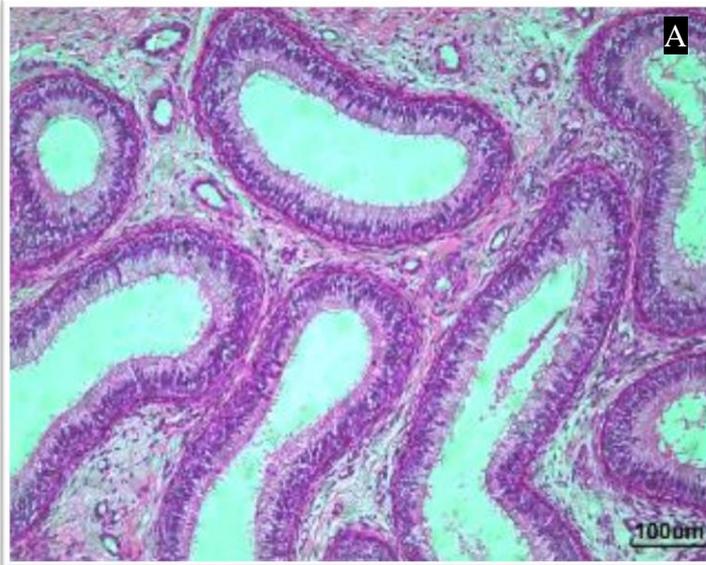


Figura 36: Fotomicrografia do corpo do epidídimo dos leitões dos quatro tratamentos, túbulos epididimários de aspecto histológico habitual, exibindo na luz de poucos túbulos material eosinofílico e ausência de espermatozoides: A - controle negativo, sem alterações; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; C - 0,6 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; D - 2,0 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos. HE. 10x.

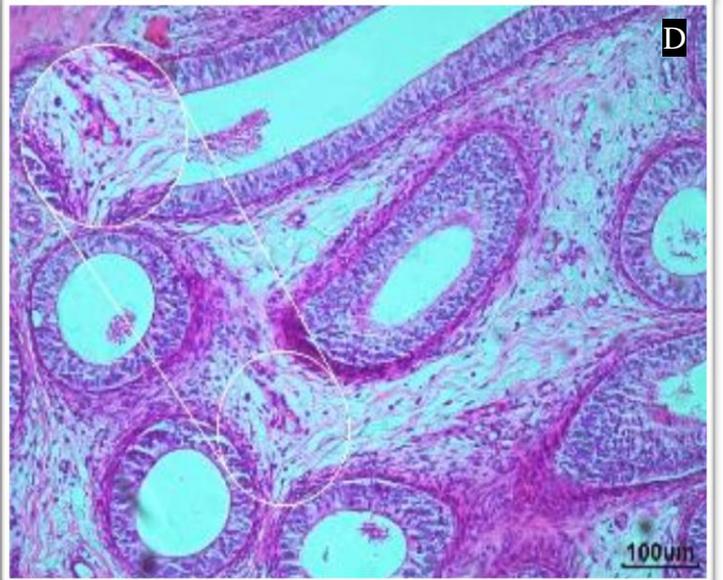
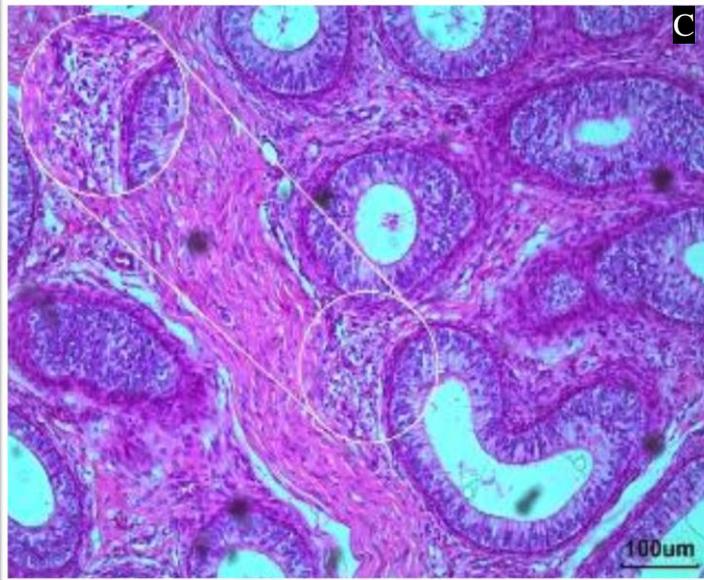
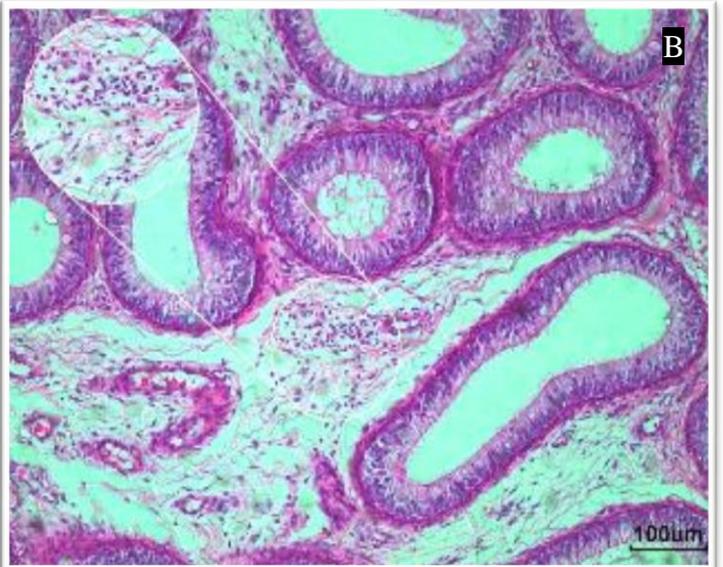
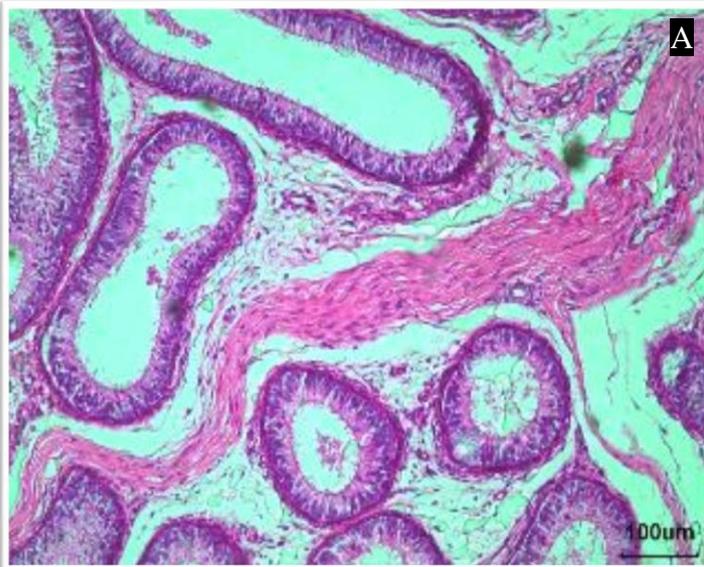
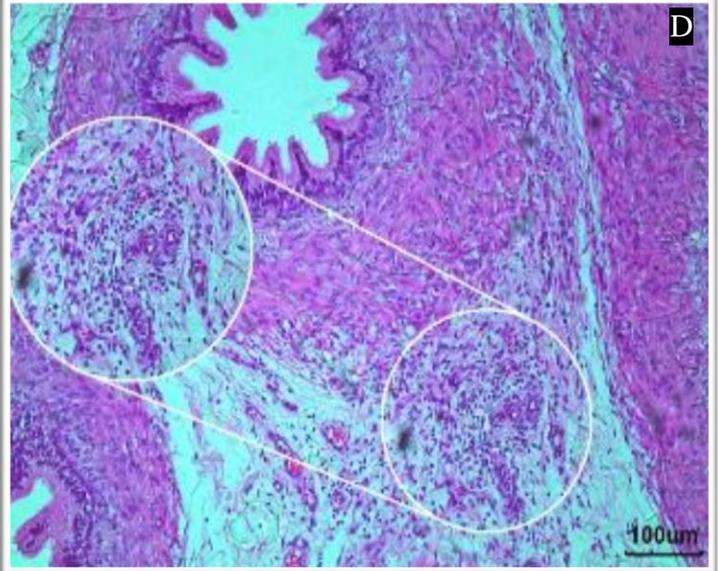
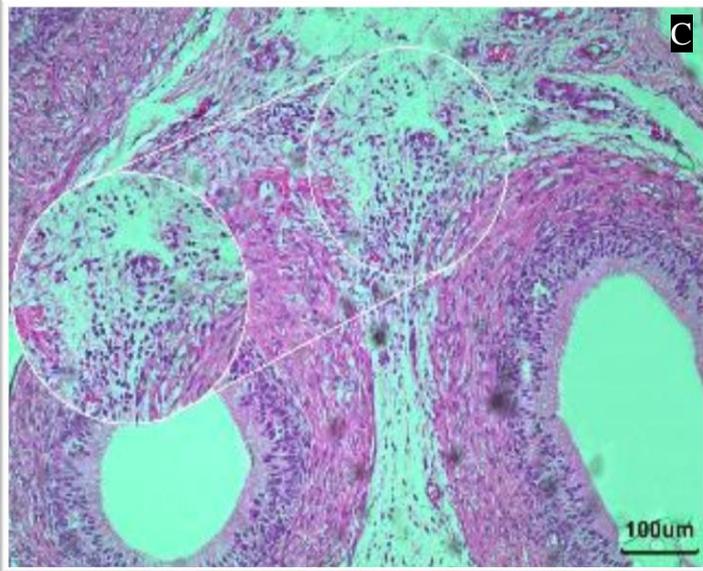
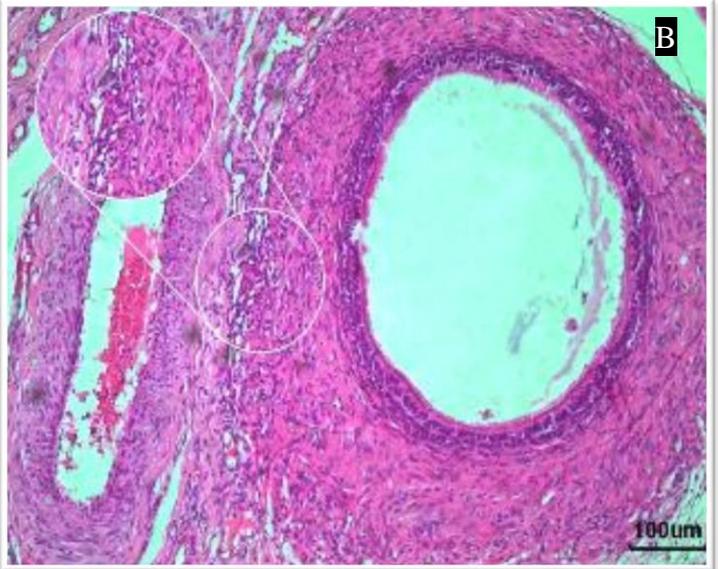
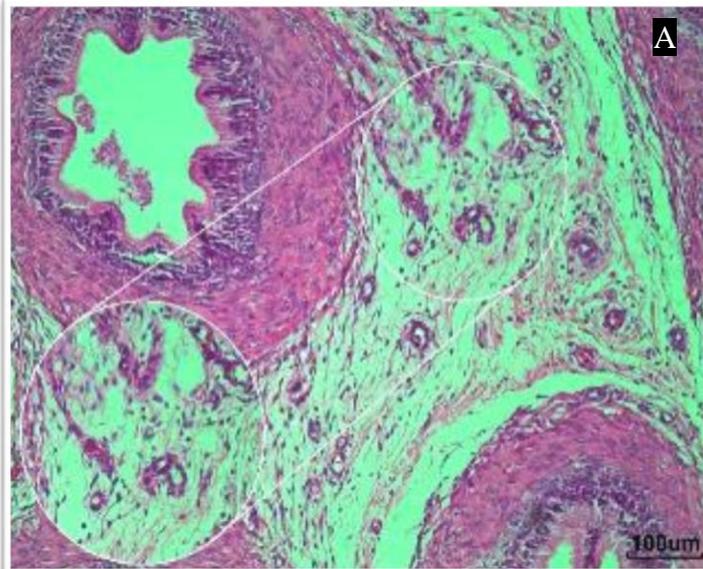


Figura 37: Fotomicrografia da cauda do epidídimo dos leitões dos quatro tratamentos, túbulos epididimários de aspecto histológico habitual, exibindo na luz poucos túbulos de material eosinofílico e ausência de espermatozoides: A - controle negativo, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; B - 0,25 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; C - 0,6 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos; D - 2,0 ppm ZEA, infiltrado leucocitário linfoplasmocitário no estroma peritubular e hiperemia dos vasos. HE. 10x.



Benzoni et al. (2008) sugeriram em seu trabalho que a ZEA interferiu na função epididimal, após ingestões contínuas de baixas doses dessa toxina por cachaços. Os achados histopatológicos encontrados nesse trabalho não podem ser atribuídos a ZEA, pois as mesmas alterações foram encontradas nos animais do grupo controle.

A ingestão crônica de ZEA pode comprometer a puberdade e fertilidade de suínos machos visto que alterações inflamatórias foram observadas nas glândulas acessórias e nas três porções do epidídimo. Mais trabalhos sobre este tema são necessários para definir claramente o papel da ZEA sobre histologia dos órgãos reprodutivos de machos suínos, sendo necessário maior número de animais e mais repetições por tratamento.

5 CONCLUSÕES

A inclusão de ZEA não altera os níveis normais da bioquímica sérica dos leitões pré-púberes, porém o consumo de ZEA pelas leitoas foi suficiente para alterar os níveis normais de ureia, creatinina e alanina aminotransferase, afetando a bioquímica sérica desses animais.

A ZEA induz respostas distintas de espessamento ou ausência de estímulo proliferativo em cada camada histológica dos órgãos do trato reprodutivo, como também em cada porção do aparelho reprodutor das leitoas pré-púberes. O AAM utilizado nesse estudo foi eficaz nas diferentes concentrações de ZEA, pois reduz as alterações hiperestrogênicas nos órgãos do trato reprodutivo.

As lesões são expressivas conforme o aumento da concentração de ZEA, tendo um efeito dose-dependente, quanto maior a concentração maior foi o efeito deletério para os órgãos do trato reprodutivo, fígado e rins das leitoas. O AAM teve como função de atenuar os efeitos tóxicos decorrentes da ingestão da ZEA, sua eficácia é comprovada perante a diminuição das alterações histopatológicas, e não pela ausência total de lesões e/ou alterações quando comparados aos animais controles.

As inclusões crescentes de ZEA na dieta de leitões pré-púberes não alteram a morfometria e histomorfometria dos testículos. No entanto, causa alterações inespecíficas na estrutura histológica de órgãos do sistema reprodutor e glândulas acessórias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, M. **Ecological role of mycotoxins produced by *Fusarium graminearum*: consequences of the presence of deoxynivalenol (DON) in crop residues on the soil microflora and soil fauna.** Dijon, Bourgogne: Université de Bourgogne, 2012. Originalmente apresentada como tese de Doutorado (Ciências Agrárias). 183p.
- ABRUNHOSA, L.; MORALES, H.; SOARES, C.; CALADO, T.; VILA-CHÃ, A. S.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A. Micotoxinas detectadas em productos alimentícios em Portugal: Revision. **Revista Bio Ciências**, v. 2, n. 1, p. 5-31, 2012.
- ANDRETTA, I.; LOVATTO, P. A.; HAUSCHILD, L.; DILKIN, P.; GARCIA, G. G.; LANFERDINI, E.; CAVAZINI, N. C.; MALLMANN, C. A. Alimentação de leitões pré-púberes com dietas contendo ZEA. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1227-1233, 2008.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 de agosto de 2006, Seção 2, p. 6.
- ARAUJO, V. B. S. **Obtenção de manoproteína e β -glucana de levedura descartada em cervejaria com potencial para aplicação em alimentos.** Joao Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 2014. Originalmente apresentada como dissertação de Mestrado (Tecnologia de Alimentos). 58p.
- ARMANDO, M. R.; PIZZOLITTO, R. P.; DOGI, C. A.; CRISTOFOLINI, A.; MERKIS, C. V. POLONI, C. V.; A.M. DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 256–264, 2012.
- Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual.** Publicações, 2016. Disponível em: http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- BENZONI, E.; MINERVINI, F.; GIANNOCCARO, A.; FORNELLI, F.; VIGO, D.; VISCONTI, A. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 461-467, 2008.
- BIERNATH, A. Justiça à carne de porco. **Saúde**, n. 363, p. 26-29, 2013.
- BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 134-158, 2012.
- BURANATRAGOOL, K.; POAPOLATHEP, S.; ISARIYODOM, S.; IMSILP, K.; KLANGKAEW, N.; POAPOLATHEP, A. Dispositions and tissue residue of zearalenone and its metabolites α -zearalenol and β -zearalenol in broilers. **Toxicology reports**, v. 2, p. 351-356, 2015.

BUREL, C.; TANGUY, M.; GUERRE, P.; BOILLETOT, E.; CARIOLET, R.; QUEGUINER, M.; POSTOLLEC, G.; PINTON, P.; SALVAT, G.; OSWALD, I. P.; FRAVALO, P. Effect of low dose of fumonisins on pig health: immune status, intestinal microbiota and sensitivity to *Salmonella*. **Toxins**, v. 5, n. 4, p. 841-864, 2013.

CAMARGO, I. C. C.; GASPAR, A. L. C.; FREI, F.; MESQUITA, S. F. P. Efeito dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 47, n. 9, p. 453-460, 2009.

CARÃO, A. C. P.; BURBARELLI, M. F. C.; POLYCARPO, G. V.; Amanda Ramos dos SANTOS, A. R.; ALBUQUERQUE, R.; OLIVEIRA, C. A. F. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 699-705, 2014.

CHATOPADHYAY, P.; PANDEY, A.; CHAURASIA, A. K.; UPADHYAY, A.; KARMAKAR, S.; SINGH, L. Hepatic hyperplasia and damages induces by zearalenone *Fusarium* mycotoxins in balb/c mice. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 49, n. 1, p. 77-81, 2012.

CHEN, X. X.; YANG, C. W.; HUANG, L. B.; NIU, Q. S.; JIANG, S. Z.; CHI, F. Zearalenone altered the serum hormones, morphologic and apoptotic measurements of genital organs in post-weaning gilts. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 28, n. 2, p. 171-179, 2015.

CORTINOVIS, C.; CALONI, F.; SCHREIBER, N. B.; SPICER, L. Effects of fumonisin B₁ alone and combined with deoxynivalenol or zearalenone on porcine granulosa cell proliferation and steroid production. **Theriogenology**, v. 81, p. 1042-1049, 2014.

CORTINOVIS C.; PIZZO, F.; SPICER, L. J.; CALONI, F. *Fusarium* mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals – A review. **Theriogenology**, v. 80, p. 557-564, 2013.

COSTA, F. B. **O fogo sagrado e os alcaloides de Ergot**. I-flora, 1998. Disponível em:< http://www.i-flora.iq.ufrj.br/hist_interessantes/ergot.pdf>. Acesso em 20 jul. 2016.

COSTA, L. F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2004.

COVER, J. S.; TEIXEIRA, M. L.; SOUZA, L. F. O.; FUENTEFRIA, A. M. Zearalenone determination in high performance liquid chromatography: a new standardization method for commercial swine rations. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 37, n. 3, p. 369-375, 2010.

DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. **InfoStat**, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

DOLL, S.; DANICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n.2, p. 132-145, 2011.

DOLL, S.; DANICKE, S.; SCHNURRBUSCH, U. The effect of increasing concentrations of Fusarium toxins in piglet diets on histological parameters of the uterus and vagina. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, p. 413-417, 2004.

DUMITRESCU, G.; ȘTEF, L.; ȘTEF D. S.; DRINCEANU, D.; PETCULESCU, C. L.; ȚĂRANU, I.; ISRAEL, R. F.; PEȚ, E.; VOIA, O. S. Histological modifications induced by the mycotoxin ZEA in weaned piglets and the counteraction of its toxic effect by the use of pre- and probiotics. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 19, p. 9715-972, 2014.

FAGANELLO, E. **A história do porco**. Suinocultura Industrial, 2016. Disponível em: <<http://www.suinoculturaindustrial.com.br/imprensa/ahistoriadoporco/20091117135856-T091>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

FARNWORTH, E. R.; TRENHOLM, H. L. The metabolism of the mycotoxin zearalenone and its effects on the reproductive tracts of young male and female pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 63, p. 967-975, 1983.

FLAWS, J. A.; ABBUD, R.; MANN, R. J.; NILSON, J. H.; HIRSHFIELD, A. N. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p.1233-1237, 1997.

FELS- KLERX, H. J.; KANDHAI, M. C.; BRYNESTAD, S.; DREYER, M.; BORJESSON, T.; MARTINS, H. M.; UITERWIJK, M.; MORRISON, E.; BOOIJ, C. J. H. Development of European system for identification of emerging mycotoxins in wheat supply chains. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 2, p. 119-127, 2009.

FRIZZEL, C.; UHLIG, S.; MILES, C. O.; VERHAEGEN, S.; ELLIOTT, C. T.; ERIKSEN, G. S.; SORLIE, M.; ROPSTAD, E.; CONNOLLY, L. Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 575-581, 2015.

GAJECKA, M.; SLAWUTA, P.; NICPON, J.; KOLACZ, R.; KIELBOWICZ, Z.; ZIELONKA, L.; DABROWSKI, M.; SZWEDA, W.; GAJECKI, M.; NICPON, J. Zearalenone and its metabolites in the tissues of female wild boars exposed per os to mycotoxins. **Toxicon**, v. 114, p. 1-12, 2016.

GAJECKA, M.; RYBARCZYK, L.; JAKIMIUK, E.; ZIELONKA, L.; OBREMSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, W.; GAJECKI, M. The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 537-542, 2012.

GAJECKA, M.; RYBARCZYK, L.; ZWIERZCHOWSKI, W.; JAKIMIUK, E.; ZIELONKA, L.; OBREMSKI, K.; GAJECKI, M. The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. **Theriogenology**. v. 75, p. 1085-1094, 2011.

GASTARDELO, A. R.; Melz, J. A suinocultura industrial no mundo e no Brasil. **Revista UNEMAT de Contabilidade**, v. 3, n. 6, p. 72-92, 2014.

GEREZ, J. R.; PINTON, P.; CALLU, P.; GROSJEAN, F.; OSWALD, I. P.; BRACARENSE, A. P. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 89-98, 2015.

GOMES, T. Canal Rural - **Estudo mostra raio-x da suinocultura no Brasil**. 2016. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/suino/estudo-mostra-raio-x-suinocultura-brasil-64817>>. Acesso em: 29 set. 2016.

GONÇALVES, R. G.; PALMEIRA, E. M. Suinocultura Brasileira. **Revista académica de economia**, n. 71, p. 1-11, 2006.

GUERRE, P. Fusariotoxins in avian species: toxicokinetics, metabolismo and persistence in tissues. **Toxins**, v. 7, n. 6, p. 2289-2305, 2015.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

InfoStat versión 2008. **Grupo InfoStat**, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponível em: <<http://www.infostat.com.ar>>. Acesso em 20. set. 2016

JI, J.; ZHU, P.; CUI, F.; PI, F.; ZHANG, Y.; LI, Y.; WANG, J.; SUN, X. The Antagonistic Effect of Mycotoxins Deoxynivalenol and Zearalenone on Metabolic Profiling in Serum and Liver of Mice. **Toxins**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2017.

JIANG, S. Z.; YANG, Z. B.; YANG, W. R.; WANG, S. J.; LIU, F. X.; JOHNSTON, L. A.; CHI, F.; WANG, Y. Effect of purified zearalenone with or without modified montmorillonite on nutrient availability, genital organs and serum hormones in post-weaning piglets. **Livestock Science**, v. 144, p. 110-118, 2012.

JIMÉNEZ, M.; MÁÑEZ, M.; HÉRNANDEZ, E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 417-421, 1996.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342-362, 2007.

JOUANY, J. P.; YIANNIKOURIS, A.; BERTIN, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Archiva Zootechnica**, v. 8, p.26-50, 2005.

KELLER, K. M.; OLIVEIRA, A. A.; ALMEIDA, T. X.; KELLER, L. A. M.; QUEIROZ, B. D.; NUNES, L. M. T.; CAVAGLIERI, L. R.; ROSA, C. A. R. Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com Aflatoxina B₁. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 101-105, 2012.

KLINFELTER, G. R.; HESS R. A. Toxicity of excurrent ducts and accessory organs in the male. In: KORACH, K. S. **Reproductive and developmental toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 553-591.

KOGAN, G.; KHOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, n. 1-3, p. 161-165, 2007.

LANGERON, M. **Precis de Microscopie**. Paris: Masson & Cie, 1949. 1429 p.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, 1998.

LIU, Q.; WANG, Y.; GU, J.; YUAN, Y.; LIU, X.; ZHENG, W.; HUANG, Q.; LIU, Z.; BIAN, J. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 647-656, 2014.

LYRA, T. **Brasil deve manter 4º lugar em produção e exportação de carne suína até 2018**. Agrolink, 2015. Disponível em: < http://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-deve-manter-4-lugar-em-producao-e-exportacao-de-carne-suina-ate-2018_221416.html>. Acesso em 20. jul. 2016

LATTANZIO, V. M.; VISCONTI, A.; HAIDUKOWSKI, M. PASCALE, M. Identification and characterization of new Fusarium masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 47, p. 466-475, 2012.

LOPES, D. V. **Parâmetros hematológicos e bioquímicos em matrizes suínas com e sem infecção urinária tratadas com ácido cítrico e cloreto de amônio**. Goiana, Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2009. Originalmente apresentada como tese de Mestrado (Medicina Veterinária). 75p.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Palloti, 2007. 238 p.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Portaria nº 13 de 24 de maio de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de maio de 2006, Seção 2, p. 6.

MARIN, D. E.; TARANU, I.; BURLACU, R.; MANDA, G.; MOTIU, M.; NEAGOE, I.; DRAGOMIR, C.; STANCU, M.; CALIN, L. Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1981-1988, 2013.

MARIN, S; RAMOS, AJ; CANO-SANCHO, G; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.218-237, 2013.

MARROQUIN-CARDONA, A. G.; JOHNSON, N. M.; PHILLIPS, T. D.; HAYES, A. W. Mycotoxins in a changing global environment- a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M. A. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2570-2584, 2008.

MOK, C. H.; SHIN, S. Y.; KIM, B. G. Aflatoxin, deoxynivalenol, and zearalenone in swine diets: predictions on growth performance. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 26, p. 243-254, 2013.

MOSTROM, M. S. Zearalenone. In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**. 2 ed. London: Academic Press, 2012. p. 1266-1271.

MOTRICE. **Secagem de levedura**. Motrice, 2013. Disponível em: <<http://www.motrice.ind.br/?id=133>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

NATHANAIL, A. V.; GIBSON, B.; HAN, L.; PELTONEN, K.; OLLILAINEN, V.; JESTOI, M. LAITILA, A. The lager *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms Fusarium trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. **Food Chemistry**, v. 203, p. 448-455, 2016.

NATHANAIL, A.; SYVAHUOKO, J.; MALACHOVA, A.; JESTOI, M.; VARGA, E.; MICHELMAYR, H.; ADAM, G.; SIEVILAINEN, E.; BERTHILLER, F.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4745-4755, 2015.

OLIVER, W. T.; MILES, J. R.; DIAZ, D. E.; DIBNER, J. J.; ROTTINGHAUS, G. E.; HARRELL, R. J. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, p. 79-85, 2012.

ORLEAN, P. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces* cell wall. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 775-818, 2012.

OSTRY, V.; MALIR, F.; RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins**, v. 5, n. 9, p. 1574-1586, 2013.

PIERRON, A.; ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P. Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 63-68, 2016.

PINTON, P.; OSWALD, I. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1616-1643, 2014.

PLEADIN, J.; SOKOVIC, M.; PERSI, N.; ZADRAVEC, M.; JAKI, V.; VULIC, A. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. **Food Control**, v. 28, p. 94-98, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p. 3-10, 2007.

REN, Z. H.; DENG, H. D.; WANG, Y. C.; DENG, J. L.; ZUO, Z. C.; WANG, Y.; PENG, X.; CUI, H. M.; FANG, J.; YU, S. M.; SHEN, L. H.; HU, Y. C. The Fusarium toxin zearalenone

and deoxynivalenol affect murine splenic antioxidant functions, interferon levels, and T-cell subsets. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 195-200, 2016.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001.

SANTANA, M. C. A. Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 13, n. 7, 2012.

SELIM, K. M.; EL-HOFY, H.; KHALIL, R. H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1 induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 523-540, 2014.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 48-55, 2006.

SCHOEVERS, E. J.; SANTOS, R. R.; COLENBRANDER, B.; FINK-GREMMELS, J.; ROELEN B. A. J. Transgenerational toxicity of zearalenone in pigs. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 110-119, 2012.

STOJANAC, N.; STEVANCEVIC, O.; SAVIC, B.; DAVIDOV, I.; CINCOVIC, M. R.; POTKONJAK, A.; SPASOJEVIC, J. Forensic Findings on Acute Mortality of Piglets after Ingestion of Aflatoxin. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal**, v. 21, n. 3, p. 437-440, 2015.

SPERANDA, M.; LIKER, B.; SPERANDA, T.; SERIC, V.; ANTUNOVIC, Z.; GRABAREVIC, Z.; SENSIC, D.; GRGURIC, D.; STEINER, Z. Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. **Acta Veterinaria - Belgrade**, v. 56, n. 2, p. 121-136, 2006.

STOPA, E.; GAJECKA, M.; BABINSKA, I.; ZIELONKA, L.; GAJECKI, M. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches. **Theriogenology**, v. 82, p. 537-545, 2014.

SUTKEVIČIENĖ, N.; BAKUTIS, B.; BANYS, A.; KARVELIENĖ, B.; RUTKAUSKAS, A.; SABECKIENĖ, J.; ŽILINSKAS, H. The effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on boar reproductive potential and the dynamic of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels in the boar blood serum. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 46, n. 68, 2009.

TEIXEIRA, L. C.; FERREIRA-MONTIANI, F.; DITTRICH-LOCATELLI, R.; SANTIN, E.; ALBERTON, G. C. Effects of zearalenone in prepubertal gilts. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 656-662, 2011.

TIEMANN, U.; BRUSSOW, K. P.; KUCHENMEISTER, U.; JONAS, L.; POHLAND, R.; REISCHAUER, A.; JAGER, K.; DANICKE, S. Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 188-196, 2008.

WANG, J. P.; CHI, F.; KIM, I. H. Effects of montmorillonite clay growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal microflora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, p. 158-166, 2012.

WIŚNIEWSKA-DMYTROW, H.; Jan ŻMUDZKI, J.; Olga BUREK, O.; PIETRUSZKA, K. Official control of ochratoxin A in food of animal origin in Poland between 2003 and 2012. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 57, n. 4, p. 12-31, 2013.

YANG, Z.; XUE, K. S.; SUN, X.; TANG, L.; WANG, J. S. Multi-toxic endpoints of the foodborne mycotoxins in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5224-5235, 2015.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C. G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J. P. Alkali Extraction of β -D-Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall and Study of Their Adsorptive Properties toward Zearalenone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3666–3673, 2004.

ZATECKA, E.; DED, L.; ELZEINOVA, F.; KUBATOVA, A.; DOROSH, A.; MARGARYAN, H.; DOSTALOVA, P.; KORENKOVA, V.; HOSKOVA, K.; PEKNICOVA, J. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 45, p. 20-30, 2014.

ZAVIEZO, D. Consideraciones técnicas sobre la problemática de las micotoxinas y las micotoxicosis aviares. **Ciencia & Trabajo**, v. 8, n. 22, p. 154-158, 2006.

ZHANG, H.; DONG, M.; YANG, Q.; TIBURI, A. M.; LI, J.; ZHANG, X. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. **Journal of Proteomics**, v. 30, n. 143, p. 416-423, 2016.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.