



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANTÔNIO CARLOS LOPES CÂMARA

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO GOSSIPOL EM FOLÍCULOS
OVARIANOS DE OVELHAS**

MOSSORÓ – RN
2015

ANTÔNIO CARLOS LOPES CÂMARA

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO GOSSIPOL EM FOLÍCULOS
OVARIANOS DE OVELHAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final
para obtenção do título de Doutor no Curso de
Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto Blanco-UFMG

MOSSORÓ – RN
2015

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Camara, Antonio Carlos Lopes.

Determinação da toxicidade do gossipol em folículos ovarianos de ovelhas / Antonio Carlos Lopes Camara. - Mossoró, 2015.

82f: il.

1. Ovelhas. 2. Gossypium spp. 3. Fator antinutricional. 4. Folículos atresicos. 5. Torta de algodão. I. Título

RN/UFRSA/BCOT/409
C172d

CDD 636.31

ANTÔNIO CARLOS LOPES CÂMARA

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO GOSSIPOL EM FOLÍCULOS
OVARIANOS DE OVELHAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final
para obtenção do título de Doutor no Curso de
Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aprovação em: 16 / 4 / 2015

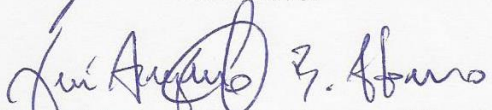
BANCA EXAMINADORA



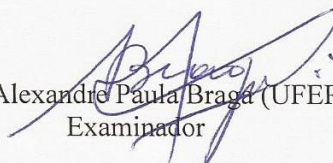
Prof. Dr. Benito Soto Blanco (UFMG)
Orientador



Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges (UNB)
Examinador



M.V. Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva (UFRPE)
Examinador



Prof. Dr. Alexandre Paula Braga (UFERSA)
Examinador



Prof. Dr. Marcos Antônio Nóbrega de Sousa (UFERSA)
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANTÔNIO CARLOS LOPES CÂMARA – Nascido em Fortaleza, Ceará, no dia 15 de outubro de 1982, filho de Antônio Gomes da Silva Câmara e Anete Lopes, concluiu o ensino fundamental e o ensino médio nos colégios 7 de Setembro e Christus, respectivamente; ambos localizados na capital cearense. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará no ano de 2006; onde realizou trabalhos de iniciação científica e estágios nas áreas de produção de suínos e reprodução de pequenos ruminantes. Possui residência veterinária em clínica, cirurgia e laboratório clínico de ruminantes e equídeos pela Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. É mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Universidade de Brasília, e, desde junho de 2009, é médico veterinário responsável pelo atendimento clínico-cirúrgico do Setor de Grandes Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Tem experiência na área de clínica e cirurgia de grandes animais, com ênfase em enfermidades dos sistemas digestivo, locomotor, nervoso e toxicologia. Possui 35 artigos completos publicados em periódicos nacionais e internacionais; além de quatro capítulos de livros. Atualmente, é revisor de duas revistas nacionais (*Ciência Rural* e *Acta Veterinaria Brasilica*) e três internacionais (*The Scientific World Journal*, *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* e *British Journal of Applied Science and Technology*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me guiado e ter me ajudado a superar todos os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Antônio Gomes da Silva Câmara e Anete Lopes, os meus maiores professores, que me ensinaram o significado das palavras: determinação, perseverança e caráter. Agradeço ainda pelo amor e apoio incondicional durante toda minha vida.

À Luciana Dalcin, minha esposa, pela paciência, companheirismo, compreensão e confidências, que nem mesmo a distância conseguiu abalar.

Ao meu orientador, Benito Soto-Blanco, pelos ensinamentos, conselhos e companheirismo, que tanto contribuiu para a minha formação, mostrando ser, além de tudo, um grande amigo.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho tenha conseguido atingir aos objetivos propostos.

"Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam."

Henry Ford

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO GOSSIPOL EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE OVELHAS

CÂMARA, Antônio Carlos Lopes. Determinação da toxicidade do gossipol em folículos ovarianos de ovelhas. 2015. 82f. Tese (Doutorado em Produção e Sanidade Animal). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró - RN, Brasil, 2015.

RESUMO: O gossipol é um composto polifenólico produzido pelas glândulas de pigmento do algodoeiro (*Gossypium* spp.); apresentando ação deletéria comprovada sobre a espermatogênese, ciclo estral de roedores, esteroidogênese nas células da granulosa em suínos, interrupção precoce da gestação e desenvolvimento embrionário inicial. No entanto, os efeitos sobre os ovários de ovelhas ainda não havia sido estudado. O presente estudo foi dividido em duas etapas: determinar o efeito *in vitro* e *in vivo* do gossipol sobre folículos ovarianos de ovelhas. Na primeira etapa, oito fragmentos ovarianos de cada animal foram cultivados em Meio α -MEM suplementado e submetidas a cultivo em três concentrações de gossipol-ácido acético (5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) por períodos de 24h e sete dias. A ação do gossipol *in vitro* proporcionou redução significativa no número de folículos viáveis em todos os estágios de desenvolvimento folicular; e aumento significativo no número de folículos atrécicos após 24h e sete dias de cultivo ($p < 0,01$). Neste último também foi notório a ausência de folículos antrais viáveis, e, os folículos primordiais apresentaram viabilidade inferior a 50%. Na segunda etapa, foram utilizadas doze ovelhas mestiças, que foram aleatoriamente separadas em dois grupos e alimentadas com rações contendo torta de algodão ou não (grupo controle). A ração foi oferecida na proporção de 1,5% do peso vivo do animal por 63 dias. As concentrações de gossipol total e livre na torta de algodão foram 3,28 mg/g e 0,11 mg/g, respectivamente. Durante todo o período experimental, nenhum animal apresentou qualquer sinal clínico de intoxicação. Não houve interferência sobre as concentrações de progesterona, peso, ganho em peso e medidas ovarianas. Apenas alterações ocasionais sobre a citologia vaginal, parâmetros hematológicos e bioquímicos foram evidenciadas. Entretanto, o tratamento com gossipol foi responsável por redução significativa no número de folículos ovarianos viáveis (20,6% nas ovelhas tratadas e 65,1% no grupo controle) e aumento significativo no número de folículos atrécicos (79,4% nas ovelhas tratadas e 34,9% no grupo controle), com interferência em todas as fases de desenvolvimento folicular ($p < 0,01$). Em conclusão, o gossipol promove danos diretos aos folículos ovarianos de ovelhas, resultando em aumento na proporção de folículos atrécicos e redução dos folículos viáveis tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palavras chave: *Gossypium* spp., fator antinutricional, folículos atrécicos, torta de algodão.

DETERMINATION OF GOSSYPOL TOXICITY ON SHEEP OVARIAN FOLLICLES

ABSTRACT: Gossypol is a polyphenol compound produced by the pigment glands of cotton plants (*Gossypium* spp.) and presents proven deleterious action on spermatogenesis, rodent's estrous cycle, granulosa cells steroidogenesis in pigs, early termination of pregnancy and embryonic development. However, the effects on sheep ovaries were not yet studied. This study was divided into two stages and aimed to determine *in vitro* and *in vivo* effect of gossypol on sheep ovarian follicles. In the first stage, eight ovarian fragments from each ewe were cultured in α -MEM supplemented culture and subjected to three concentrations of gossypol-acetic acid (5, 10 and 20 μ g/mL) for periods of 24 hours and seven days. *In vitro* action of gossypol resulted in a significant reduction in the number of viable ovarian follicles of all development stages, and a significant increase in the number of atretic follicles after 24 hours and seven days of cultivation ($p < 0,01$). In the latter it was remarkable the absence of viable antral follicles and the primordial follicles presented less than 50% of viability. In the second stage, we used twelve crossbred ewes, which were randomly divided into two groups and fed diets containing cottonseed cake or not (control group). Concentrate feed was offered at a rate of 1.5% of body weight of the animal for 63 days. Concentrations of total and free gossypol in cottonseed cake was 3.28 mg/g and 0.11 mg/g, respectively. Throughout the trial period no animal showed clinical signs of toxicosis. There was no interference on progesterone concentrations, weight, weight gain and ovaries measurements. Only occasional changes on vaginal cytology, hematological and biochemical parameters were noted. However, treatment with gossypol was responsible for significant reduction in the number of viable ovarian follicles (20.6% in treated sheep and 65.1% the control group) and significant increase in the number of atretic follicles (79.4% in treated sheep and 34.9% in control group), interfering at all stages of follicular development ($p < 0,01$). In conclusion, the gossypol promotes direct damage to the ovarian follicles of sheep, resulting in an increase on the proportion of atretic follicles and reduction of viable follicles both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Antinutritional factor, atretic follicles, cottonseed cake, *Gossypium* spp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1 - Estrutura química, fórmula e peso molecular (MW) do gossipol e seus enântiômeros: (+) e (-)-gossipol. Adaptado de KENAR (2006)..... 17

CAPÍTULO 2:

Figura 2 - Folículos ovarianos de ovelhas submetidos ao cultivo *in vitro*. (A) Folículos primordiais e (B) de transição normais cultivados na ausência de gossipol (0 µg/mL); Folículos primordiais atresícos com oócitos retraídos, núcleo picnótico e células da granulosa desorganizadas cultivados em (C) 5 e (D) 10 µg/mL de gossipol. Coloração Hematoxilina e Eosina..... 49

CAPÍTULO 3:

Figura 3 - Folículos ovarianos de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. (A) Folículos primordiais e (B) antral normais (grupo controle); (C) e (D) Folículos primordiais atresícos com retração oocitária picnose nuclear e desorganização de células da granulosa (grupo tratamento). Coloração Hematoxilina e Eosina.. 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1 - Alterações séricas de enzimas e proteínas sintetizadas pelo fígado em animais suplementados com gossipol 26

Tabela 2 - Estudos experimentais selecionados com evidências de alterações reprodutivas em machos causadas pelo gossipol 28

Tabela 3 - Estudos experimentais selecionados com evidências de alterações reprodutivas em fêmeas causadas pelo gossipol 30

CAPÍTULO 2:

Tabela 4 - Estimativa das populações de folículos ovarianos de ovelhas (%) cultivados na ausência (0 µg/mL) e em concentrações crescentes de gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) após 24 horas..... 48

Tabela 5 - Estimativa das populações de folículos ovarianos de ovelhas (%) cultivados na ausência (0 µg/mL) e em concentrações crescentes de gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) após sete dias..... 50

CAPÍTULO 3:

Tabela 6 - Ingredientes (em % de matéria seca) das dietas oferecidas aos ovinos.. 58

Tabela 7 - Pesos e ganho em peso de ovelhas alimentadas com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão 61

Tabela 8 - Dosagens de progesterona (ng/mL) em ovelhas alimentadas com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.. 62

Tabela 9 - Eritrograma de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão	65
Tabela 10 - Leucograma de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão	66
Tabela 11 - Bioquímica sérica de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão	67
Tabela 12 - Tipos celulares (em %) encontrados no exame de citologia vaginal de ovelhas alimentadas com ração contendo 0 (controle) e 40% de torta de algodão. Os resultados estão expressos em médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão	69
Tabela 13 - Medidas (cm) e peso (g) dos ovários de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.	72
Tabela 14 - Número de folículos ovarianos de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.	74
Tabela 15 - Estimativa das populações de folículos ovarianos (%) de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão	75

LISTA DE SIGLAS

α -MEM - Meio essencial mínimo α
ALB - Albumina
AGP - Ácidos graxos poliinsaturados
AMP - Monofosfato de adenosina
AST - Aspartato aminotransferase
ALT - Alanina aminotransferase
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético dissódico
EE - Extrato etéreo
FA - Fosfatase alcalina
FDA - Fibra em detergente ácida
FDN - Fibra em detergente neutra
FOE - Fragilidade osmótica eritrocitária
GGT - Gama glutamiltransferase
GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina
GSH - Glutathione reduzida
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HPLC - High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta performance)
HE - Hematoxilina e eosina
JAK3 - Janus quinase 3
LH - Hormônio luteinizante
NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NDT - Nutrientes digestíveis totais
NRC - National Research Council (Conselho Nacional de Pesquisa)
PB - Proteína bruta
PPT - Proteínas plasmáticas totais
SDH - Sorbitol desidrogenase
TE - Transferência de embriões
TSH - Hormônio estimulante da tireoide
T3 - Triiodotironina
T4 - Tiroxina
UNB - Universidade de Brasília
UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-Árida
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco
VCM - Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO	15
----------------------	----

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral.....	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	16

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Estrutura química	17
1.3.2 Farmacocinética	18
1.3.3 Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes	19
1.3.4 Intoxicação aguda por gossipol: sinais clínicos e achados patológicos	22
1.3.5 Efeito antihematopoiético e imunotóxico.....	21
1.3.6 Efeito antitireoideano	24
1.3.7 Hepatotoxicidade.....	25
1.3.8 Efeitos reprodutivos	27
1.3.9 Considerações finais.....	31
1.3.10 Referências.....	31

2 CAPÍTULO 2 - EFEITO *in vitro* DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GOSSIPOL EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE OVELHAS

2.1 RESUMO.....	44
2.2 INTRODUÇÃO.....	45
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
2.5 REFERÊNCIAS	52

3 CAPÍTULO 3 - EFEITO *in vivo* DO GOSSIPOL NA FOLÍCULOGÊNESE DE OVELHAS ALIMENTADAS COM TORTA DE ALGODÃO

3.1 RESUMO.....	56
3.2 INTRODUÇÃO.....	57
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.5 REFERÊNCIAS	76

1. CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma planta arbórea da família Malvaceae, amplamente cultivada para a produção da fibra e do óleo (SOTO-BLANCO, 2008). O gênero *Gossypium* spp. inclui muitas espécies distribuídas por todo o mundo, mas apenas quatro espécies são cultivadas para produção de fibra de algodão: *Gossypium hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboreum* e *G. herbaceum*. A espécie economicamente mais importante de algodão é *G. hirsutum*, que é responsável por aproximadamente 90% da produção mundial da fibra (LIMA, 2013; GADELHA et al., 2014a). O aumento da produção de algodão no Brasil fez com que o país conquistasse importante participação no cenário mundial, gerando grande disponibilidade dos subprodutos usados para a alimentação animal (PAIM et al., 2010). No entanto, em todas as partes do algodoeiro está presente um composto químico fenólico denominado gossipol (SOTO-BLANCO, 2008).

Na década de 1950, foi descoberta a ocorrência de infertilidade masculina associada ao uso do óleo de algodão bruto, rico em gossipol, para o preparo de alimentos (LIU, 1957). Desde então, já foram realizados inúmeros experimentos em humanos, colocando o gossipol como o segundo contraceptivo não hormonal em volume de literatura publicada (KOGAN; WALD, 2014). Apesar da alta eficácia em inibir a capacidade reprodutiva dos voluntários testados (até 98,5%) (YANG et al., 2011), a ocorrência de efeitos colaterais, como esterilidade irreversível e hipocalemia, promoveram a redução do uso do gossipol como contraceptivo humano (WAITES; WANG; GRIFFIN, 1998; YANG et al., 2011). Em adição aos seus efeitos nocivos, o gossipol e seus derivados mostraram potencial ação *in vitro* contra alguns vírus, tais como vírus da imunodeficiência humana e vírus da gripe H5N1 (YANG et al., 2012); e várias bactérias e leveduras (GADELHA et al., 2014a). Apresenta-se ainda como tratamento promissor para a leucemia, linfoma, carcinoma do cólon, mioma, câncer de próstata e outros tumores malignos (HAN et al., 1987; YANG et al., 2011; YANG et al., 2012; GADELHA et al., 2014a; KOGAN; WALD, 2014). Além disso, foi utilizado na China, em 1970, para tratar endometriose e hemorragia uterina em mulheres (HAN et al., 1987).

Além dos usos terapêuticos supracitados, os subprodutos originados do processamento do algodão, como o caroço, farelo e torta de algodão, são utilizados, principalmente, para a alimentação animal (SOTO-BLANCO, 2008; PAIM et al., 2010). Diante do exposto, pesquisas investigando os efeitos deletérios do gossipol na reprodução animal são de extrema importância para a maior utilização destes subprodutos, e, conseqüentemente, diminuição do custo produtivo de espécies monogástricas e de ruminantes (KANDYLIS et al., 1999; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2011). Estudos comprovando a ação negativa do gossipol sobre parâmetros reprodutivos de ruminantes (desenvolvimento folicular, taxa de gestação, qualidade e desenvolvimento embrionário) já foram descritos (RANDEL et al., 1996; SANTOS et al., 2003; GALVÃO et al., 2006; VILLASEÑOR et al., 2008). Entretanto, apenas em novilhas foi realizado estudo avaliando ovários e folículos ovarianos por meio da morfologia macroscópica e análise histológica, respectivamente; que apresentaram resultados similares entre os grupos controle e tratamento (GAMBILL; HUMPHREY, 1993).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

- Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do gossipol em folículos ovarianos de ovelhas.

1.2.2 Específicos

- Avaliar se há toxicidade *in vitro* do gossipol em folículos ovarianos ovinos;
- Estudar o perfil hormonal, hematológico e bioquímico sérico em ovelhas alimentadas com torta de algodão, e o reflexo do gossipol sobre estes indicadores;
- Avaliar se há interferência do gossipol sobre o ciclo estral e foliculogênese em ovelhas alimentadas com torta de algodão por meio da citologia vaginal e histologia ovariana, respectivamente.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Estrutura química

Gossipol ($C_{30}H_{30}O_8$; peso molecular de 518,55 Dalton) é um composto cristalino, amarelo intenso, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos e gorduras. Possui capacidade máxima de absorção ultravioleta em 385nm e funde a temperaturas ao redor de 200°C, dependendo da sua forma polimórfica (ALEXANDER et al., 2008). Como representado na Figura 1, a estrutura do gossipol consiste de dois anéis de naftaleno unidos por uma ligação simples, seis grupos hidroxila e dois grupos aldeído. Os aldeídos desempenham importante papel nas formas tautomêricas do gossipol e são sugeridos por serem o principal contribuinte para a toxicidade do gossipol (KENAR, 2006). Os enantiômeros são abundantes e disponíveis principalmente nas sementes de algodão, embora as proporções relativas variam com as espécies e variedades da planta. Por exemplo, em variedades Pima (*G. barbadense*), (-)-gossipol geralmente predomina, enquanto que no algodão Upland (*G. hirsutum*), o enantiômero (+)-gossipol prevalece (CASS et al., 1991).

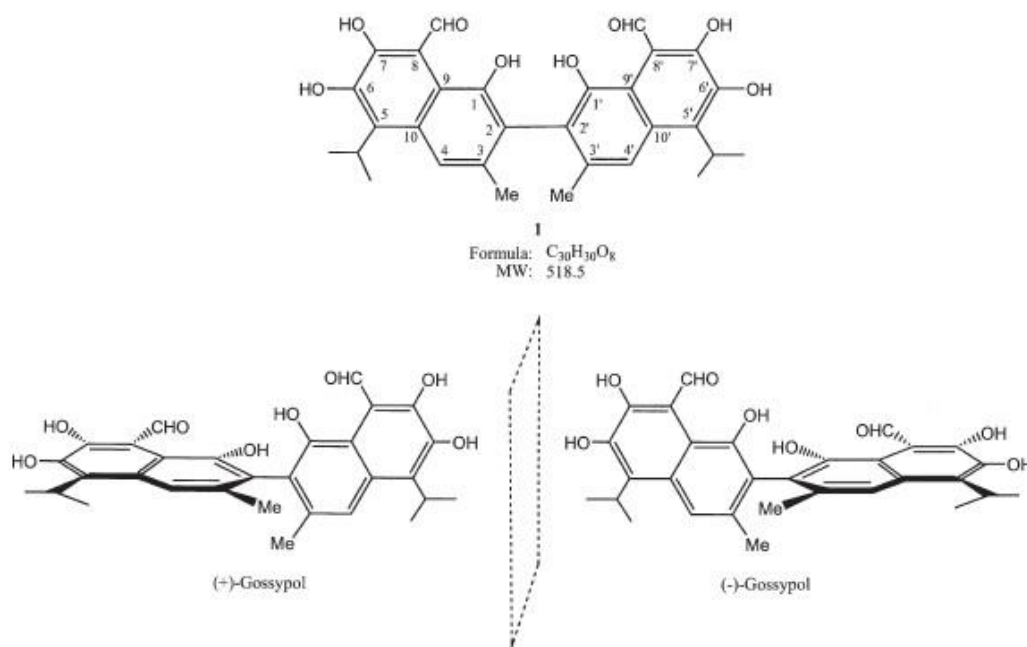


Figura 1 - Estrutura química, fórmula e peso molecular (MW) do gossipol e seus enantiômeros: (+) e (-)-gossipol. Adaptado de KENAR (2006).

Existem duas formas de gossipol nas plantas, a forma livre e a conjugada. Os grupos aldeídos presentes no gossipol reagem facilmente com as aminas presentes nas cadeias laterais de aminoácidos, levando à formação do chamado gossipol conjugado (STROM-HANSEN; CORNETT; JAROSZEWSKI, 1989). A forma conjugada é produzida através de ligações covalentes do gossipol livre com grupos épsilon-amino de lisina e arginina (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014a). A forma de gossipol conjugado não é extraível com solventes orgânicos, mas pode ser liberado como gossipol livre por tratamento com ácidos. O gossipol conjugado é formado durante o armazenamento de produtos de algodão e sua formação é acelerada pelo calor e umidade, condições encontradas durante o processamento de sementes de algodão. Embora o gossipol conjugado seja considerado menos absorvível pelo epitélio intestinal, ocorre a redução da disponibilidade de aminoácidos para a absorção pelo animal, principalmente a lisina (GADELHA et al., 2014a). Ainda, as formas conjugadas se ligam com alguns íons metálicos formando complexos metálicos insolúveis, particularmente com o ferro (SOTO-BLANCO, 2008; ALEXANDER et al., 2008).

1.3.2 Farmacocinética

A taxa de absorção de gossipol é inversamente proporcional à quantidade de ferro na dieta e a suplementação dietética com sulfato ferroso inativa o gossipol livre (BARRAZA et al., 1991). Nos ruminantes, a microbiota do rúmen pode promover a ligação do gossipol livre com proteínas, mas não se sabe ao certo se a forma ligada pode ser absorvida pelos intestinos ou se os microrganismos ruminais podem liberar gossipol livre a partir da forma ligada (SCHNEIDER et al., 2002). Após absorção, este composto fenólico é acumulado no fígado e rins (LINDSEY et al., 1980; SOTO-BLANCO, 2008). A principal via de biotransformação é a conjugação com glicuronídeos e sulfatos, com excreção por meio da bile e eliminação pelas fezes (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014a). Ainda não há relatos do gossipol ser excretado pelo leite (LINDSEY et al., 1980), mesmo quando vacas foram alimentadas com até 611,13 mg de gossipol/kg de matéria seca (WANG et al., 2012). Os tempos de meia vida total ($t_{1/2}$) de (+) e (-)-gossipol em ratos, após dose única intravenosa, foi estimada como 25,26 horas e 10,53 horas, respectivamente (QIAO-QIN et al., 1987; GADELHA et al., 2014a).

1.3.3 Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes

O uso de subprodutos do algodão possui como principais objetivos: a implantação da prática de destinação dos resíduos gerados e a redução de custos com a nutrição animal (GRASSER et al., 1995). A indústria têxtil é responsável por gerar subprodutos de grande destaque na nutrição de ruminantes, sendo tais subprodutos oriundos da espécie de algodoeiro *G. hirsutum*, predominante no Brasil e no mundo; e incluem o caroço, a torta e o farelo de algodão (PAIM et al., 2010).

O caroço de algodão é o subproduto resultante do beneficiamento denominado descaroçamento, cujo objetivo é a retirada da pluma, principal produto de interesse do cultivo de algodão e da indústria têxtil. Segundo o National Research Council (NRC, 2007), o caroço de algodão é composto por 23% de proteína bruta (PB), 19% de extrato etéreo (EE), 46% de fibra em detergente neutro (FDN), 39% de fibra em detergente ácido (FDA) e 82% de nutrientes digestíveis totais (NDT). Devido a essas características, o caroço de algodão é uma boa fonte de proteína e energia para a suplementação alimentar dos ruminantes, principalmente em regiões nas quais há grande disponibilidade deste produto. Na literatura, existem trabalhos demonstrando desempenho produtivo satisfatório de ruminantes alimentados com caroço de algodão, podendo este, devido ao seu alto teor de fibras, até mesmo substituir parte do alimento volumoso da dieta (PAULINO et al., 2002; BERNARDES et al., 2007).

A torta de algodão é o subproduto resultante da prensagem mecânica do caroço de algodão, processo este que permite a obtenção do óleo de algodão, que é utilizado na alimentação humana (PAIM et al., 2010). De acordo com o NRC (2007), a torta de algodão apresenta a seguinte composição bromatológica: 46% de PB, 5% de EE, 31% de FDN, 18% de FDA e 80% de NDT. O farelo de algodão também se origina da extração de óleo do caroço de algodão, porém, nesse caso, a extração é realizada com a utilização de solventes. Portanto, sendo a utilização de solventes um método mais eficiente de extração de óleo do que somente a simples prensagem mecânica, o teor de EE do farelo de algodão é menor que o da torta de algodão (PAIM et al., 2010). As características nutricionais do farelo de algodão podem variar de acordo com o teor de cascas incluído na sua composição, sendo que quanto maior for este, maior será a fibra bruta e menor o teor de PB do farelo (LIMA, 2013). O custo relativamente baixo do farelo de algodão, aliado ao seu alto teor protéico, fazem deste uma opção interessante para formulação de dietas de ruminantes, tendo sido demonstrado que a utilização de farelo de algodão na dieta destes animais pode

acarretar em desempenho produtivo interessante (HUNT et al., 1989; WILLARD et al., 1995; KANDYLIS et al., 1999).

Dentro deste cenário, no qual o Brasil se situa entre os maiores produtores de algodão do mundo, a disponibilidade de subprodutos gerados durante as etapas de processamento industrial do algodão é alta, e o custo de aquisição deste material é baixo. Sendo assim, o único fator limitante existente para a consagração dos subprodutos do algodão como excelentes fontes de nutrientes para a alimentação de ruminantes é a presença do gossipol (McCAUGHEY et al., 2005; LIMA, 2013).

1.3.4 Intoxicação aguda por gossipol: sinais clínicos e achados patológicos

O gossipol promove sinais clínicos de intoxicação nas espécies monogástricas e ruminantes, quando alimentados em concentrações elevadas (MORGAN et al., 1988; RISCO et al., 1992). A intoxicação natural por este pigmento tipicamente ocorre por meio da ingestão prolongada, uma vez que os níveis desta substância no algodão não são suficientemente altos para poder promover intoxicação aguda. De fato, os efeitos do gossipol são cumulativos, e podem surgir abruptamente após um período variável de ingestão (CHEEKE, 1998; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2011). Animais monogástricos (suínos, aves, peixes e roedores) são mais susceptíveis à toxicidade do gossipol do que os ruminantes (RANDEL et al., 1992; KENAR, 2006; GADELHA et al., 2014a,b). Além disso, os ruminantes jovens são mais sensíveis ao gossipol em comparação com os ruminantes adultos (SOTO-BLANCO, 2008); isto ocorre porque pode haver ligação deste fenol a proteínas do fluido ruminal, tornando-o inativo. No entanto, se a ingestão de gossipol superar a capacidade de detoxificação ruminal, o gossipol livre pode ser absorvido em concentrações perigosas, mesmo em ruminantes adultos (WILLARD et al., 1995; RISCO et al., 2002).

Os sinais da intoxicação aguda são correlacionados à redução da capacidade carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares (HOLMBERG et al., 1988; RISCO et al., 1992; BOVINO et al., 2008). Consequentemente, os sinais clínicos incluem respiração laboriosa, hiporexia, fraqueza, apatia, mucosas pálidas, arritmias, diminuição do ganho de peso e morte, que pode ser súbita ou após evolução de vários dias (HOLMBERG et al., 1988; MORGAN et al., 1988; RISCO et al., 1992; BOVINO et al., 2008).

No que diz respeito aos achados patológicos, as alterações macroscópicas são menos frequentes do que as microscópicas. Bezerros oriundos de surtos de mortalidade e alimentados com dieta com nível elevado de gossipol apresentaram como principal achado a hepatomegalia com acentuado padrão lobular e congestão grave; e em menor frequência icterícia, urina avermelhada, hemorragias petequiais, ascite, hidrotórax, hidropericárdio, dilatação cardíaca e congestão renal. A dosagem de gossipol nos fígados dos bezerros do grupo tratamento e controle apresentaram $41,7 \pm 12,3$ e $10,4 \pm 4,3$ μg de gossipol total/g, respectivamente (HOLMBERG et al., 1988; MORGAN et al., 1988). Em ratos que receberam 30 mg/kg em dose única por via intraperitoneal; os achados macroscópicos consistiram de ascite, deposição de fibrina na cavidade abdominal, com presença de aderências entre o fígado e diafragma (FONSECA et al., 2013).

Os achados microscópicos são, na maioria das vezes, restritos ao fígado e caracterizam-se por necrose centrolobular aguda discreta a acentuada. Outros achados incluem degeneração gordurosa, diferentes graus de degeneração dos hepatócitos, presença ocasional de hepatócitos com forte eosinofilia citoplasmática e picnose nuclear (HOLMBERG et al., 1988; EL-SHARAKY et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; FONSECA et al., 2013). A separação das fibras miocárdicas são achados sugestivos de edema, sendo a alteração mais comumente observada no sistema cardiovascular. Poucos animais apresentam também degeneração de fibras miocárdicas ou a presença de células necróticas ocasionais (MORGAN et al., 1988; HOLMBERG et al., 1988). As alterações renais mais frequentes incluem células necróticas ao longo dos túbulos contorcidos proximais, dilatação cortical e nefrite intersticial moderada (HOLMBERG et al., 1988). Estudos ultraestruturais do fígado de ratos tratados com 30 mg/kg durante 14 dias evidenciaram vacuolização mitocondrial, dilatação do retículo endoplasmático, ampliação do espaço perinuclear e proliferação de fibras de colágeno no espaço perissinusoidal (WANG; LEI, 1987).

A avaliação histopatológica das glândulas tireoideanas de ratas que receberam doses de gossipol revelou degeneração folicular e atrofia (RIKIHISA; LIN, 1989). As células tireotróficas da glândula pituitária, que são especializadas para a síntese e secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH), apresentaram hipertrofia, hiperplasia e degranulação após a administração do composto em ratos (UDOH; PATIL; DESHPANDE, 1992).

1.3.5 Efeito antihematopoiético e imunotóxico

O gossipol promove alterações hematológicas por meio de diversos mecanismos, incluindo a inibição da enzima 11 β -hidroxi-esteróide desidrogenase e a promoção da anemia hemolítica com hiperbilirrubinemia (ANEJA; DASS; CHANDRA, 2003). Recentemente, foi comprovado, em humanos, que o gossipol estimula a entrada intracelular de Ca²⁺ seguido de encolhimento e desorganização eritrocitária, culminando com a eriptose (ZBIDAH et al., 2012). Outros mecanismos de estímulo da eriptose incluem depleção energética, ativação das enzimas caspases, quinases ativadas por monofosfato de adenosina (AMP), proteínas quinases dependente de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e enzimas ativadas por Janus quinase 3 (JAK3) (KOVACIC, 2003; ZBIDAH et al., 2012).

Em animais, diversos estudos comprovam a ocorrência de anemia associada à administração de gossipol (SKUTCHES et al., 1973; COLIN-NEGRETE et al., 1996; RANDEL et al., 1996; ANEJA; DASS; CHANDRA, 2003; EL-MOKADEM et al., 2013). Primariamente, a alta afinidade de ligação do gossipol com o ferro propicia a formação do quelato ferro-gossipol e a depleção do ferro hepático; tornando o mineral inacessível para a hematopoiese (HERMAN; SMITH, 1973; SKUTCHES et al., 1973; LINDSEY et al., 1980). Concomitante, há aumento da concentração de ferro na bile e fezes, provavelmente como resultado da maior excreção do complexo ferro-gossipol (SKUTCHES et al., 1973). O gossipol também pode reduzir a absorção e retenção de ferro no organismo, causando a deficiência deste mineral (LINDSEY et al., 1980). Outro mecanismo inclui a inibição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, causando depleção da produção de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH), que é necessário para a ação da glutatona peroxidase; importante componente do sistema antioxidante celular (RISCO et al., 2002; EL-MOKADEM et al., 2013). A inibição enzimática deste mecanismo ou o excesso de oxidantes pode ainda causar redução dos valores de hemoglobina e hematócrito (DUNCAN et al., 1994).

A redução do hematócrito pode ser decorrente do efeito direto do gossipol na diminuição da integridade celular, responsável por aumento da hemólise e fragilidade eritrocitária em bovinos (GAMBILL; HUMPHREY, 1993; COLIN-NEGRETE et al., 1996; VELASQUEZ-PERREIRA et al., 1999; RISCO et al., 2002), ovinos (SAMAK et al., 1986; EL-MOKADEM et al., 2013) e caprinos (SOLAIMAN et al., 2009). A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) é uma medida da habilidade da membrana do

eritrócito resistir ao estresse osmótico, quando os eritrócitos são incubados em diferentes soluções salinas com concentrações decrescentes (RISCO et al., 2002). O aumento da FOE é achado consistente em diversos estudos com gossipol (LINDSEY et al., 1980; RANDEL et al., 1996; VELASQUEZ-PERREIRA et al., 1999; RISCO et al., 2002; MENA et al., 2004; SOLAIMAN et al., 2009), e decorre do gossipol ligar-se a bicamada lipídica e alterar a permeabilidade celular, sendo esta ação deletéria considerada dose-dependente (VELASQUEZ-PERREIRA et al., 1999).

O gossipol pode causar redução do número de leucócitos circulantes, principalmente linfócitos, e, conseqüentemente, afetar a imunocompetência do organismo (BRAGA et al., 2012). Isto decorre do efeito citotóxico do composto, promovendo inibição da proliferação e indução de apoptose linfocitária (QUINTANA et al., 2000; YURTCU; ERGUN; MENEVSEK, 2003; XU et al., 2009). Este mecanismo de apoptose decorre da indução de mudança alostérica na molécula anti-apoptótica Bcl-2, convertendo esta molécula no composto pró-apoptótico, que pode mediar a liberação de citocromo C (LEI et al., 2006). Em linfócitos na leucemia linfocítica crônica, o gossipol induz a permeabilização da membrana externa mitocondrial, acarretando a liberação de proteínas pró-apoptóticas, como os fatores indutores de apoptose (BALAKRISHNAN et al., 2008). Em ratos tratados com gossipol ocorreram reduções significativas das populações de células totais do baço; e dos linfócitos no timo e nódulos linfáticos mesentéricos (SEIN; PHIL, 1986; SIJUN et al., 2012). Em adição, experimentos determinando a resposta humoral medida por meio de titulação de anticorpos após a inoculação da cepa *Brucella abortus* S99, demonstraram atraso e depressão da produção de anticorpos anti-*Brucella* em cordeiros alimentados com caroço de algodão por 135 dias (NAGALAKSHMI et al., 2001) e em bezerros alimentados por 180 dias (PATTANAIK et al., 2003). Ainda, o aumento da susceptibilidade à broncopneumonia (HOLMBERG et al., 1988; RISCO et al., 1992) e mastite por *Staphylococcus* coagulase-negativo (FTHENAKIS et al., 2002) foi associado à ingestão por longos períodos de dietas contendo elevada quantidade de farelo de algodão.

Pesquisadores observaram, em ovinos, que a suplementação com selênio em dietas com altas concentrações de gossipol resultou em aumento significativo da concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e leucócitos, em comparação com animais alimentados com a mesma dieta sem suplementação de

selênio. Isto indica claramente o efeito benéfico do selênio em atenuar a toxicidade hematológica do gossipol, independentemente da concentração de gossipol na dieta (SAMAK et al., 1986; EL-MOKADEM et al., 2013). O selênio é incorporado principalmente na hemoglobina. As membranas dos eritrócitos contém elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), tornando-as vulneráveis aos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, que são capazes de desencadear uma sequência de reações espalhadas pela membrana celular. O principal sistema antioxidante protegendo os AGPI é o mecanismo enzimático dependente da glutathione peroxidase. O teor de substâncias oxidáveis, como AGPI, e a atividade do sistema captador de radicais livres, geralmente regulam a homeostase celular (GANTHER, 1986). Portanto, a adição de selênio aumenta a capacidade antioxidante como consequência do aumento da atividade de glutathione peroxidase (IRVINE, 1996). Na presença desta enzima, a glutathione, um doador de elétrons, elimina vários radicais de peróxido intracelulares (CALVIN et al., 1981). No que diz respeito à série branca, a suplementação de selênio promove aumento das imunoglobulinas G e M em vacas e bezerros, e, conseqüentemente, da contagem de leucócitos sanguíneos (AWADEH; KINCAID; JOHNSON, 1998; EL-MOKADEM et al., 2013).

1.3.6 Efeito antitireoideano

Em experimento com ratos observou-se diminuição das concentrações sanguíneas de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) decorrentes da administração de gossipol (RIKIHISA; LIN, 1989). A redução nos níveis séricos de T3 e progesterona foi também relatado em ratas que receberam 25 mg de gossipol/kg/dia (GADELHA et al., 2014b). A glândula tireoide apresenta elevada concentração de selênio, sendo responsável pelo controle da produção de T3 via deiodinase, uma seleno-enzima encarregada da deiodinação da T4 (AASETH et al., 1990). Além disso, o selênio desempenha outro papel vital na tireoide como parte do sistema da enzima glutathione peroxidase; e, sem selênio, ocorre comprometimento funcional deste glândula. Durante a produção de T3, ocorre também a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que em quantidades excessivas promove aumento da produção de T4 e danos nas células tireoideanas. A glutathione peroxidase desempenha importante função na degradação de H_2O_2 (BEHNE et al., 1992). Assim, observou-se que a suplementação de selênio promove aumentos na concentração sérica de testosterona e T3 (EL-MOKADEM et al., 2012).

1.3.7 Hepatotxicidade

O fígado desempenha função central no metabolismo de nutrientes e xenobióticos por meio da absorção, transformação, armazenamento e liberação destes compostos (CARVALHO et al., 2013). Os sistemas enzimáticos de detoxificação hepática, como a citocromo P-450, atuam de forma rápida e têm ampla especificidade, propiciando a capacidade de suportar uma grande variedade de desafios causados por toxinas naturais e sintéticas (KERR, 2003).

Nos hepatócitos, as reações que causam depleção de glutathiona reduzida (GSH) resultam em estresse oxidativo devido ao favorecimento do estado pró-oxidativo. O estresse oxidativo pode decorrer do acúmulo de produtos oxidantes normais do metabolismo celular ou da ação de substâncias químicas tóxicas. O ciclo redox da GSH é um sistema protetor que minimiza a lesão celular do estresse oxidativo. As espécies químicas oxidantes convertem a GSH em dissulfeto de glutathiona oxidada por meio da ação da enzima glutathiona peroxidase, sendo a GSH regenerada pela glutathiona redutase. Quando os níveis celulares de GSH diminuem, a defesa celular contra compostos tóxicos é prejudicada, podendo resultar em morte celular (ROBBINS et al., 2005). Recentemente, resultados mostraram que o gossipol alterou o ciclo redox e o metabolismo celular dos hepatócitos em ratos (CARVALHO et al., 2013). Tais achados associados a estudos anteriores (HOLMBERG et al., 1988; MANABE; NUBER; LIN, 1991; RISCO et al., 1992; DEORAS et al., 1997; FONSECA et al., 2013) comprovam o fato do gossipol ser uma substância hepatotóxica.

Diante do exposto, diversos experimentos objetivaram elucidar o efeito hepatotóxico do gossipol por meio de provas bioquímicas (Tabela 1) e análise histopatológica do fígado. Tais análises bioquímicas representam valioso apoio ao diagnóstico clínico das enfermidades do fígado e consistem de baterias de exames referidas como testes de função hepática (SANTOS et al., 2008). Em ruminantes, gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), sorbitol desidrogenase (SDH) e aspartato aminotransferase (AST) são as mais úteis na identificação de doença hepática crônica. A enzima alanina aminotransferase (ALT), apresenta pouco valor diagnóstico em suínos, equinos e ruminantes, uma vez que é encontrada em concentrações baixas no fígado dessas espécies. Além destes, o proteinograma é um exame importante, já que o comprometimento hepático resulta na falha da síntese de

aminoácidos e proteínas, principalmente a albumina (ALB); acarretando queda dos níveis das proteínas plasmáticas totais (PPT) (KERR, 2003; SANTOS et al., 2008).

A AST, conhecida também como transaminase glutâmico-oxalacética, é encontrada principalmente no fígado, nos eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco. Em ruminantes e equinos, devido às suas altas concentrações no fígado, é usada também para investigar doenças hepáticas (KERR, 2003). A avaliação da GGT é indicada para o diagnóstico de colestase em ruminantes, por ser originária das membranas dos canalículos e ductos biliares; o aumento da atividade dessa enzima está relacionado exclusivamente a colestase intra e extra hepática e com proliferação de ductos biliares (SEAWRIGHT et al., 1991). Sua atividade é alta nos rins e no fígado, mas somente a GGT de origem hepática é encontrada no plasma, uma vez que a de origem renal é excretada na urina (SANTOS et al., 2008). A FA, apesar de não ser específica para lesão hepática, aumenta nos casos de danos hepáticos em decorrência de sua liberação na superfície sinusoidal dos hepatócitos e na regurgitação das isoenzimas biliares nos casos de colestase (KERR, 2003).

Tabela 1 - Alterações séricas de enzimas e proteínas sintetizadas pelo fígado em animais suplementados com gossipol.

Espécie	Dose de gossipol	Duração da administração	Alteração sérica	Referência
Murino	20 mg/kg	24 dias	↑ ALT e FA	AKINGBEMI; AIRE, 1994
	25 mg/kg	Dose única	↑ GGT	DEORAS et al., 1997
	5-20 mg/kg	10 dias	↑ AST, ALT e FA ↓ PPT	EL-SHARAKY et al., 2010
	30 mg/kg	Dose única	↑ AST e ALT	FONSECA et al., 2013
	40 mg/kg	15 dias	↑ AST e ALT	CARVALHO et al., 2013
Ovino	45-409 mg/kg	30 dias	↑ SDH	MORGAN et al., 1988
	222-302 mg/dia	180 dias	↑ FA	NAGALAKSHMI et al., 2001
Caprino	21,2-47,7 mg/kg	140 dias	↑ FA e PPT	SOLAIMAN et al., 2009
Bovino	250-380 mg/kg	50 dias	↑ GGT, SDH e AST	HOLMBERG et al., 1988
	100-800 ppm	120 dias	↓ ALB e PPT	RISCO et al., 1992
	9,95 mg/kg	210 dias	↑ ALT	PATTANAIK et al., 2003
	960 mg/kg	84 dias	↑ AST	MENA et al., 2004

1.3.8 Efeitos reprodutivos

Machos

O uso do gossipol como um fármaco para supressão da espermatogênese em humanos advém da década de 80 (QIAN et al., 1980). No entanto, sua segurança tem sido questionada devido à ocorrência de esterilidade irreversível e hipocalcemia severa, com consequente fadiga e apatia (KOGAN; WALD, 2014). Em animais, existem inúmeros estudos sobre os efeitos deletérios do gossipol na reprodução de machos de diferentes espécies (Tabela 2), como hamsters (HAHN; RUSTICUS; PROBST, 1981; YUAN; SHI, 2000), ratos (HAHN; RUSTICUS; PROBST, 1981; GAFVELS et al., 1984; HEYWOOD et al., 1986; EL-SHARAKY et al., 2010), carneiros (EL-MOKADEM et al., 2012) e touros (CHENOWETH et al., 1994; 2000; HASSAN et al., 2004; SANTOS et al., 2008; 2013).

O mecanismo dos danos causados aos espermatozoides pelo gossipol ocorre devido ao bloqueio da produção e liberação de ATP utilizado por estas células (UENO et al., 1988); inibição do influxo de cálcio (BREITBART et al., 1984; 1989) e da atividade das enzimas Mg-ATPase e Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas dos espermatozoides (BREITBART et al., 1984). Espermatozoides anormais ocorrem porque o gossipol produz alterações ultraestruturais na membrana nuclear, nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (CHENOWETH et al., 2000; GADELHA et al., 2011; 2014a). Em ratos, também foram observados reduzidos níveis séricos de testosterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (EL-SHARAKY et al., 2010). Ainda existem estudos comprovando danos estruturais aos túbulos seminíferos, células de Sertoli, epidídimo e espermátides (HAHN; RUSTICUS; PROBST, 1981; SANTOS et al., 2008; 2013). Contudo, tais efeitos são dependentes da dose e do tempo de exposição, sendo revertidos quando a ingestão do gossipol é interrompida (HASSAN et al., 2004).

No entanto, outros estudos não observaram efeitos deletérios sobre a reprodução masculina em ruminantes. Em caprinos (NUNES et al., 2010) e ovinos machos adultos (GUEDES; SOTO-BLANCO, 2010) alimentados com dieta contendo 0,5 kg/animal/dia de farelo de algodão por 120 dias consecutivos, não houve efeitos negativos sobre a qualidade do sêmen, que foi avaliada pelo volume seminal, concentração, motilidade e presença de anormalidades nos espermatozoides. O mesmo foi observado em touros alimentados com 3,03 g de gossipol total/kg de matéria seca (JIMENEZ et al., 1989).

Tabela 2 - Estudos experimentais selecionados com evidências de alterações reprodutivas em machos causadas pelo gossipol.

Animal	Dose de gossipol	Duração da administração	Efeitos reprodutivos	Referência
Hamsters	10-20 mg/kg	28-42 dias	Degeneração espermática	HAHN; RUSTICUS; PROBST, 1981
	12,5 mg/kg	42 dias	Degeneração espermática e diminuição da motilidade	YUAN; SHI, 2000
Ratos	20-40 mg/kg	56 dias	Degeneração espermática, epididimária e testicular	HAHN; RUSTICUS; PROBST, 1981
	10 mg/kg	40 dias	Degeneração tubular, diminuição da concentração de testosterona e involução prostática	GAFVELS et al., 1984
	5-25 mg/kg	182 dias	Degeneração espermática e atrofia dos túbulos seminíferos	HEYWOOD et al., 1986
	12,5 mg/kg	42 dias	Degeneração espermática e diminuição da motilidade	YUAN; SHI, 2000
	5-20 mg/kg	10 dias	Degeneração tubular e das células de Sertoli; diminuição da concentração de testosterona e espermatogênese	EL-SHARAKY et al., 2010
Carneiros	9-14 mg/kg	49 dias	Anormalidades espermáticas, redução da motilidade e concentração de testosterona	EL-MOKADEM et al., 2012
Touros	8,2 g/kg	84 dias	Redução da motilidade e volume do ejaculado; anormalidades espermáticas	CHENOWETH et al., 1994
	8,2 g/kg	77 dias	Anormalidades espermáticas e redução da motilidade	CHENOWETH et al., 2000
	8 mg/kg	28-56 dias	Anormalidade espermáticas e degeneração testicular	HASSAN et al., 2004
	20% de caroço de algodão na dieta	73 dias	Degeneração dos túbulos seminíferos e células de Sertoli; apoptose de espermátides; anormalidades espermáticas; redução de motilidade	SANTOS et al., 2008
	3,3g gossipol livre	73 dias	Degeneração dos túbulos seminíferos, células de Sertoli e espermátides; anormalidades espermáticas; redução de motilidade	SANTOS et al., 2013

Fêmeas

O gossipol também afeta a reprodução feminina (Tabela 3), sendo a exposição das fêmeas a esta substância associada à interferência no ciclo estral, gestação e no desenvolvimento embrionário inicial (RANDEL et al., 1992; 1996; GADELHA et al., 2011). Em roedores, o gossipol promoveu aumento no número de ciclos estrais irregulares (LIN et al., 1985), diminuição da taxa de prenhez (YANG; WU, 1987) e prolongamento do diestro (GADELHA et al., 2014b). Porcas alimentadas com dietas contendo 0,02-0,14% de gossipol livre durante 30 dias apresentaram menores taxas de implantação, maior quantidade de abortamentos e natimortos, além de redução do tamanho da leitegada (EISELE, 1986). Em vacas, existem trabalhos que comprovam o aumento da concentração de LH (GRAY et al., 1990), redução da quantidade de folículos grandes (> 5 mm), aumento do número de embriões degenerados (RANDEL et al., 1996), diminuição das taxas de concepção e prenhez (SANTOS et al., 2003; GALVÃO et al., 2006); aumento do número de abortos (SANTOS et al., 2003) e diminuição da qualidade embrionária (VILLASEÑOR et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram que o gossipol interfere no desenvolvimento embrionário *in vitro* (BROCAS et al., 1997; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2005) e *in vivo* (LIN et al., 1985; RANDEL et al., 1996; GALVÃO et al., 2006; VILLASEÑOR et al., 2008). Provavelmente, o mecanismo da embriotoxicidade do gossipol ocorre por meio da ação citotóxica direta sobre o embrião (LIN et al., 1985; RANDEL et al., 1992). Este efeito citotóxico pode ser promovido por: geração de espécies reativas do oxigênio, induzindo o estresse oxidativo (FORNÉS et al., 1993); interrupção da comunicação intercelular (HERVÉ et al., 1996); indução de apoptose (MOON et al., 2008); ou interferência no transporte iônico nas membranas, aumentando os níveis de cálcio intracelular (CHENG et al., 2003). Em adição ao efeito citotóxico, o gossipol promove a diminuição da esteroidogênese, e, consequentemente, queda dos níveis séricos de progesterona e estradiol (BASINI et al., 2009; GADELHA et al., 2014b). Ainda, verificou-se que, em vacas, o gossipol pode chegar ao fluido uterino por meio da circulação sanguínea materna e diminuir a capacidade de implantação embrionária (LIN; RAJAMAHENDRAN; RIKIHISA, 1991; VILLASEÑOR et al., 2008; GADELHA et al., 2011).

Tabela 3 - Estudos experimentais selecionados com evidências de alterações reprodutivas em fêmeas causadas pelo gossipol.

Animal	Dose de gossipol	Duração da administração	Efeitos reprodutivos	Referência
Ratas	40-80 mg/kg	14 dias	Até 90% de redução da taxa de prenhez	HAHN; RUSTICUS; PROBST, 1981
	25 mg/kg	3-5 dias	Aumento de 75% em ciclos estrais irregulares; ↓ 17β-estradiol	LIN et al., 1985
	30-120mg/kg	5-60 dias	Diminuição da taxa de prenhez e concentração de progesterona	YANG; WU, 1987
	25 mg/kg	15 dias	Diminuição da duração do estro e prolongamento do diestro; ↓ concentração de progesterona; ↓ folículos ovarianos normais e ↑ dos atresícos	GADELHA et al., 2014b
Porcas	0,02-0,14% gossipol livre	30 dias	Aumento da falha de concepção, abortos e natimortos; redução do tamanho da leitegada	EISELE, 1986
Novilhas/Vacas	0,4-16,3g gossipol livre	62 dias	Aumento da concentração de LH	GRAY et al., 1990
	5-15g gossipol livre	70 dias	Redução de folículos (≥ 5 mm) e ↑ embriões degenerados	RANDEL et al., 1996
	717-951 mg gossipol livre	170 dias	Diminuição da taxa de concepção e gestação; aumento de abortos	SANTOS et al., 2003
	12g gossipol livre	76 dias	Menores taxas de prenhez aos 28 e 42 dias após transferência de embriões	GALVÃO et al., 2006
	17,8-36,8 mg/kg	70 dias	Diminuição da qualidade embrionária	VILLASENÖR et al., 2008

1.3.9 Considerações finais

A ingestão do gossipol presente nos subprodutos da extração do óleo de algodão, principalmente o caroço, farelo e torta de algodão, pode promover intoxicação clínica aguda, hepatotoxicidade, efeitos deletérios reprodutivos, imunotoxicidade; efeitos antihematopoiéticos e antitireoideanos. A intoxicação aguda não é atualmente um problema significativo, mas os danos reprodutivos causam perdas econômicas importantes para a indústria pecuária. Embora a toxicidade reprodutiva masculina seja bastante conhecida, existe a necessidade de estudos mais aprofundados para compreender os efeitos deletérios promovidos pelo gossipol sobre a reprodução de fêmeas, principalmente em ruminantes, pois estes são os mais expostos a este composto.

1.3.10 Referências

AASETH, J.; FREY, H.; GLATTRE, E.; NORTHEIM, G.; RINGSTAD, J.; THOMASSEN, Y. Selenium concentrations in the human thyroid gland. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.24, n.2, p.147-152, 1990.

AKINGBEMI, B.T.; AIRE, T.A. Haematological and serum biochemical changes in the rat due to protein malnutrition and gossypol-ethanol interactions. **J. Comp. Pathol.**, v.111, n.4, p.413-426, 1994.

ALEXANDER, J.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J.; DOGLIOTTI, E.; DI DOMENICO, A.; FÉRNANDEZ-CRUZ, M.L.; FÜRST, P.; FINK-GREMMELS, J.; GALLI, C.L.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.; HEINEMEYER, G.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; VAN LEEUWEN, R.; VAN PETEGHEM, C.; VERGER, P. Gossypol as undesirable substance in animal feed. **EFSA J.**, v.908, p.2-55, 2008.

ANEJA, R.; DASS, S.K.; CHANDRA, R. Modulatory influence of tin-protoporphyrin on gossypol-induced alterations of heme oxygenase activity in male Wistar rats. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.**, v.28, n.3, p.237-243, 2003.

AWADEH, F.T.; KINCAID, R.L.; JOHNSON, K.A. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobins in beef cows and calves. **J. Anim. Sci.**, v.76, n.4, p.1204-1215, 1998.

BALAKRISHNAN, K.; WIERDA, W.G.; KEATING, M.J.; GANDHI, V. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v.112, n.5, p.1971-1980, 2008.

BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; BAIONI, L.; GRASSELLI, F. Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.37, n.1, p.30-36, 2009.

BARRAZA, M.L.; COPPOCK, C.E.; BROOKS, K.N.; WILKS, D.L.; SAUNDERS, R.G.; LATIMER Jr., G.W. Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.74, n.10, p.3457-3467, 1991.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A.; GESSNER, H.; WALZOG, B.; MEINHOLD, H. Type I iodothyronine deiodinase activity after high selenium intake and relations between selenium and iodine metabolism in rats. **J. Nutr.**, v.122, n.7, p.1542-1546, 1992.

BERNARDES, E.B.; COELHO, S.G.; CARVALHO, A.U.; OLIVEIRA, H.N.; REIS, R.B.; SATURNINO, H.M.; SILVA, C.A.; COSTA, T.C. Efeito da substituição do feno de *Tifton 85* pelo caroço de algodão como fonte de fibra na dieta de bezerros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.4, p.955-964, 2007.

BOVINO, F.; CADIOLI, F.A.; ROZZA, D.B.; MENDES, L.C.N.; FEITOSA, F.L.F.; ARAÚJO, M.A.; TEODORO, P.H.M.; PEIRÓ, J.R. Intoxicação por gossipol em ovinos - relato de casos. **Vet. Zootec.**, v.15, n.2, Supl.1, p.24, 2008.

BRAGA, A.P.; MACIEL, M.V.; GUERRA, D.G.F.; MAIA, I.S.A.S.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Extruded-expelled cottonseed meal decreases lymphocyte counts in male sheep. **Rev. Med. Vet.**, v.163, n.3, p.147-152, 2012.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; NASS-ARDEN, L. Effect of gossypol-acetic acid on calcium transport and ATPase activity in plasma membranes from ram and bull spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v.7, n.5, p.439-447, 1984.

BREITBART, H.; MAYEVSKY, A.; NASS-ARDEN, L. Molecular mechanisms of gossypol action on sperm motility. **Int. J. Biochem.**, v.21, n.10, p. 1097-1102, 1989.

BROCAS, C.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; MCDOWELL, L.R.; CALHOUN, M.C.; STAPLES, C.R.; WILKINSON, N.S.; BONING, A.J.; CHENOWETH, P.J.; HANSEN, P.J. Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes and embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, n.4, p.901-907, 1997.

CALVIN, H.; COOPER, G.; WALLACE, E. Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine rich structural protein of the mitochondrial capsule. **Gamete Res.**, v.4, n.2, p.139-145, 1981.

CARVALHO, W.L.; MAIOLI, M.A.; MENDES, L.C.N.; ROZZA, D.B.; MINGATTO, F.E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.3, p.339-344, 2013.

CASS, G.B.; TIRITAN, E.; MATLIN, S.A.; FREIRE, E.E. Gossypol enantiomer ratios in cotton seeds. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2655-2657, 1991.

CHEEKE, P.R. 1998. **Natural Toxicans in Feeds, Forages, and Poisonous Plants**. 2nd ed. Interstate Publishers, Danville. 479p.

CHENG, J.S.; LO, Y.K.; YEH, J.H.; CHENG, H.H.; LIU, C.P.; CHEN, W.C.; JAN, C.R. Effect of gossypol on intracellular Ca^{2+} regulation in human hepatoma cells. **Chin. J. Physiol.**, v.46, n.3, p. 117-122, 2003.

CHENOWETH, P.J.; RISCO, C.A.; LARSEN, R.E.; VELEZ, J.; TRAN, T.; CHASE Jr., C.C. Effects of dietary gossypol on aspects of semen quality, sperm morphology and sperm production in young Brahman bulls. **Theriogenology**, v.42, n.1, p.1-13, 1994.

CHENOWETH, P.J.; CHASE Jr., C.C.; RISCO, C.A.; LARSEN, R.E. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1193-1203, 1994.

COLIN-NEGRETE, J.; KIESLING, H.E.; ROSS, T.T.; SMITH, J.F. Effect of whole cottonseed on serum constituents, fragility of erythrocyte cells, and reproduction of growing Holstein heifers. **J. Dairy Sci.**, v.79, n.11, p.2016-2023, 1996.

DEORAS, D.P.; YOUNG-CURTIS, P.; DALVI, R.R.; TIPPETT, F.E. Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats. **Vet. Res. Commun.**, v.21, n.5, p.317-323, 1997.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. **Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**. Iowa State Univ. Press, Ames. 1994.

EISELE, G.R. A perspective on gossypol ingestion in swine. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.28, n.2, p.118-122, 1988.

EL-MOKADEM, M.Y.; TAHA, T.A.; SAMAK, M.A.; YASSEN, A.M. Alleviation of reproductive toxicity of gossypol using selenium supplementation in rams. **J. Anim. Sci.**, v.90, n.9, p.3274-3285, 2012.

EL-MOKADEM, M.Y.; TAHA, T.A.; SAMAK, M.A.; YASSEN, A.M. Counteracting the hematological toxicity of gossypol by using selenium supplementation in rams. **Small Rum. Res.**, v.114, n.1, p.86-89, 2013.

EL-SHARAKY, A.S.; NEWAIRY, A.A.; ELGUINDY, N.M.; ELWAFI, A.A. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.48, n.12, p.3354-3361, 2010.

FONSECA, N.B.S.; GADELHA, I.C.N.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.56, p.149-153, 2013.

FORNÉS, M.W.; BARBIERI, A.M.; BURGOS, M.H. Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.195, n.3, p.1289-1293, 1993.

FTHENAKIS, G.C.; LEONTIDES, L.; SKOUFOS, J.; TAITZOGLU, I.A.; TZORA, A. Case report: high prevalence rate of ovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption. **Small Rum. Res.**, v.52, n.1-2, p.185-189, 2004.

GADELHA, I.C.N.; FONSECA, N.B.S.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Gossypol toxicity from cottonseed products. **Scient. World J.**, v.2014, Article ID 231635, 11p., 2014a.

GADELHA, I.C.N.; MACEDO, M.F.; OLORIS, S.C.S.; MELO, M.M.; SOTO-BLANCO, B. Gossypol promotes degeneration of ovarian follicles in rats. **Scient. World J.**, v.2014, Article ID 986184, 7p., 2014b.

GAFVELS, M.; WANG, J.; BERGH, A.; DAMBER, J.E.; SELSTAM, G. Toxic effects of the antifertility agent gossypol in male rats. **Toxicology**, v.32, n.4, p.325–333, 1984.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, J.E.P.; COSCIONI, A.C.; JUCHEM, S.O.; CHEBEL, R.C.; SISCHO, W.M.; VILLASENÖR, M. Embryo survival from gossypol-fed heifers after transfer to lactating cows treated with human chorionic gonadotropin. **J. Dairy Sci.**, v.89, n.6, p.2056–2064, 2006.

GAMBILL, M.D.; HUMPHREY, W.D. Effects of diets containing gossypol on ovarian histology, function and fertility in prepubertal beef heifers. **Theriogenology**, v.40, n.3, p.585-593, 1993.

GANTHER, H.E. Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. **J. Am. Coll. Toxicol.**, v.5, n.1, p.1-5. 1986.

GRASSER, L.A.; FADEL, J.G.; GARNETT, I.; DEPETERS, E.J. Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. **J. Dairy Sci.**, v.78, n.4, p.962-971, 1995.

GRAY, M.L.; RANDEL, R.D.; GREENE, L.W.; WILLIAMS, G.L. Metabolic homeostasis and reproductive endocrine function in post pubertal beef heifers fed varying levels of dietary free gossypol. **J. Anim. Sci.**, v.68, Suppl. 1, p.465, 1990.

GUEDES, F.C.B.; SOTO-BLANCO, B. Sperm quality of sheep fed cottonseed cake. **Acta Sci. Vet.**, v.38, n.4, p.415-418, 2010.

HAHN, D.W.; RUSTICUS, C.; PROBST, A. Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents. **Contraception**, v.24, n.1, p 97-105, 1981.

HAN, M.L.; WANG, Y.F.; TANG, M.Y.; GE, Q.S.; ZHOU, L.F.; ZHU, P.D.; SUN, Y.T. Gossypol in the treatment of endometriosis and uterine myoma. **Contrib. Gynec. Obst.**, v.16, p.268-270, 1987.

HASSAN, M.E.; SMITH, G.W.; OTT, R.S.; FAULKNER, D.B.; FIRKINS, L.D.; EHRHART, E.J.; SHAEFFER, D.J. Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. **Theriogenology**, v.61, n.6, p.1171-1179, 2004.

HEYWOOD, R.; LLOYD, G.K.; MAJEED, S.K.; GOPINATH, C. The toxicity of gossypol to the male rat. **Toxicology**, v.40, n.3, p.279-284, 1986.

HERMAN, D.L.; SMITH, F.H. Effect of bound gossypol on the absorption of iron by rats. **J. Nutr.**, v.103, p.882-889, 1973.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; JOUSAN, F.D.; SOTO, P.; HANSEN, P.J. Timing of inhibitory actions of gossypol on cultured bovine embryos. **J. Dairy Sci.**, v.88, n.3, p.922-928, 2005.

HERVÉ, J.C.; PLUCIENNIK, F.; BASTIDE, B.; CRONIER, L.; VERRECCHIA, F.; MALASSINÉ, A.; JOFFRE, M.; DÉLEZE, J. Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. **Eur. J. Pharmacol**, v.313, n.3, p.243-255, 1996.

HOLMBERG, C.A.; WEAVER, L.D.; GUTERBOCK, W.M.; GENES, J.; MONTGOMERY, P. Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cotton seed meal diet. **Vet. Pathol.**, v.25, n.2, p.147-153, 1988.

HUNT, C.W.; PARKINSON, J.F.; ROEDER, R.A.; FALK, D.G. The delivery of cottonseed meal at three different time intervals to steers fed low-quality grass hay: effects on digestion and performance. **J. Anim. Sci.**, v.67, n.5, p.1360-1366, 1989.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Rev. Reprod.**, v.1, n.1, p.6-12, 1996.

JIMENEZ, D.A.; CHANDLER, J.E.; ADKINSON, R.W.; NIPPER, W.A.; BAHAM, A.; SAXTON, A.M. Effect of feeding gossypol in cottonseed meal on growth, semen quality, and spermatogenesis of yearling Holstein bulls. **J. Dairy Sci.**, v.72, n.7, p.1866-1875, 1989.

KANDYLIS, K.; NIKOKYRIS, P.N.; DELIGIANNIS, K. Performance of growing-fattening lambs fed diets containing different proportions of cottonseed meal. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, n.12, p.1613-1619, 1999.

KENAR, J.A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.83, n.4, p.269-302, 2006.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária, Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2ª ed. Roca, São Paulo, p.154-155. 2003.

KOGAN, P.; WALD, M. Male contraception: history and development. **Urol. Clin. N. Am.**, v.41, n.1, p.145-161, 2014.

KOVACIC, P. Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. **Curr. Med. Chem.**, v.10, n.24, p.2711-2718, 2003.

LEI, X.; CHEN, Y.; DU, G.; YU, W.; WANG, X.; QU, H.; XIA, B.; HE, H.; MAO, J.; ZONG, W.; LIAO, X.; MEHRPOUS, M.; HAO, X.; CHEN, Q. Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome C release via a conformational change in Bcl-2. **FASEB J.**, v.20, E1510-E1519, 2006.

LIN, Y.C.; FUKAYA, T.; RIKIHISA, Y.; WALTON, A. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life Sci.**, v.37, n.1, p.39-47, 1985.

LIN, Y.C.; RAJAMAHENDRAN, P.; RIKIHISA, Y. Inhibition of rat embryo implantation in the gossypol-treated uterine horn. **Theriogenology**, v.35, n.4, p.769-777, 1991.

LINDSEY, T.O.; HAWKINS, G.E.; GUTHRIE, L.D. Physiological responses of lactating cows to gossypol from cottonseed meal rations. **J. Dairy Sci.**, v.63, n.4, p.562-573, 1980.

LIMA, P.M.T. **Parâmetros hematológicos, bioquímicos, ganho em peso e emissão de metano de ovinos Santa Inês alimentados com coprodutos do algodão**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 63p. Dissertação de Mestrado.

LIU, B.S. A tentative idea of the use of cooking cottonseed oil for fertility control. **Shangai J. Chin. Med.**, v.6, p.43-47, 1957.

MANABE, S.; NUBER, D.C.; LIN, Y.C. Zone-specific hepatotoxicity of gossypol in perfused rat liver. **Toxicon**, v.29, n.6, p.787-790, 1991.

McCAUGHEY, K.M.; DEPETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; SANTOS, J.E.P.; PAREAS, J.W.; TAYLOR, S.J. Impact of feeding whole Upland cottonseed, with or without cracked pima cottonseed with increasing addition of iron sulfate, on productivity and plasma gossypol of lactating dairy cattle. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v.122, n.3-4, p.214-256, 2005.

MENA, H.; SANTOS, J.E.P.; HUBER, J.T.; TARAZON, M.; CALHOUN, M.C. The effects of varying gossypol intake from whole cottonseed and cottonseed meal on lactation and blood parameters in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.87, n.8, p.2506-2518, 2004.

MOON, D.O.; KIM, M.O.; LEE, J.D; KIM, G.Y. Gossypol suppresses NF-kB activity and NF-kB-related gene expression in human leukemia U937 cells. **Cancer Lett.**, v.264, n.2, p.192-200, 2008.

MORGAN, S.; STAIR, E.L.; MARTIN, T.; EDWARDS, W.C.; MORGAN, G.L. Clinical, clinicopathologic, pathologic, and toxicologic alterations associated with gossypol toxicosis in feeder lambs. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, n.4, p.493-499, 1988.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V.R.B.; AGRAWAL, D.K.; KATIYAR, R.C. Haematological and immunological response in lambs fed on raw and variously processed cottonseed meal. **Asian-Australian J. Anim. Sci.**, v.14, n.1, p.21-29, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids**. National Academic Press: Washington, D.C., 2007. 362 p.

NUNES, F.C.R.; ARAÚJO, D.A.F.V.; BEZERRA, M.B.; SOTO-BLANCO, B. Effects of gossypol present in cottonseed cake on the spermatogenesis of goats. **J. Anim. Vet. Adv.**, v.9, n.1, p.75-78, 2010.

PAIM, T.P.; LOUVANDINI, H.; McMANUS, C.M.; ABDALLA, A.L. Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v.13, n.1-3, p.24-37, 2010.

PATTANAIK, A.K.; SASTRY, V.R.B.; SINGH, D.K.; GOSWAMI, T.K.; MOHANTY, D.N. Effect of gossypol from cottonseed meal diets on some clinico-biochemical parameters and humoral immune response of crossbred calves fed barley or sorghum. **Asian-Australian J. Anim. Sci.**, v.16, n.9, p.1291-1296, 2003.

PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; LANA, R.P. Soja grão e caroço de algodão em suplementos múltiplos para terminação de bovinos mestiços em pastejo. **Rev. Bras. Zootec.**, v.31, n.1, p.484-491, 2002.

QIAN, S.Z.; JING, G.W.; WU, X.Y.; XU, Y.; LI, Y.Q.; ZHOU, Z.H. Gossypol related to hypokalemia: clinico-pharmacological studies. **Chin. Med. J.**, v.93, p.477-482, 1980.

QIAO-QIN, C.; HUI, C.; HAI-PENG, L. Comparative study on the metabolism of optical gossypol in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.20, n.1, p.31-37, 1987.

QUINTANA, P.J.E.; PEYSTER, A.; KLATZKE, S.; PARK, H.J. Gossypol-induced DNA breaks in rat lymphocytes are secondary to cytotoxicity. **Toxicology Lett.**, v.117, n.1-2, p.85-94, 2000.

RANDEL, R.D.; CHASE, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **J. Anim. Sci.**, v.70, n.5, p.1628-1638, 1992.

RANDEL, R.D.; WILLARD, S.T.; WYSE, S.J.; FRENCH, L.N. Effects of diets containing free gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function in Brangus heifers treated with bFSH. **Theriogenology**, v.45, n.5, p.911-922, 1996.

RIKIHISA, Y.; LIN, Y.C. Effect of gossypol on the thyroid in young rats. **J. Comp. Pathol.**, v.100, n.4, p.411-417, 1989.

RISCO, C.A.; HOLMBERG, C.A.; KUTCHES, A. Effect of graded concentrations of gossypol on calf performance: toxicological and pathological considerations. **J. Dairy Sci.**, v.75, n.10, p.2787-2798, 1992.

RISCO, C.A.; ADAMS, A.L.; SEEBOHM, S.; THATCHER, M.J.; STAPLES, C.R.; VAN HORN, H.H.; McDOWELL, L.R.; CALHOUN, M.C.; THATCHER, W.W. Effects of gossypol from cottonseed on hematological responses and plasma alpha-tocopherol concentration of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.12, p.3395-3402, 2002.

ROBBINS, S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K. **Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 7ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 1592p. 2005.

SAMAK, M.A.; ELSAYED, I.A.; HASSAN, A.; EL-MGDOUB, A.A. Effect of zinc and selenium fortification of diet on hematological and biochemical parameters of *Fasciola* infected ewes. **Egypt. J. Anim. Prod.**, v.26, v.1, p.79-90, 1986.

SANTOS, J.E.; VILLASEÑOR, M.; ROBINSON, P.H.; DE PETERS, E.J.; HOLMBERG, C.A. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: plasma gossypol, health, and reproductive performance. **J. Dairy Sci.**, v.86, n.3, p.892-905, 2003.

SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D.; BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.1, p.1-14, 2008.

SANTOS, M.D.; PORTILHO, F.K.B.C.; RUAS, J.R.M.; FREITAS, S.H.; COSTA, D.S.; SIMÕES, M.J. Morfologia testicular e qualidade espermática de touros da raça Nelore, submetidos à dieta contendo gossipol. **R. Bras. Ci. Vet.**, v.15, n.3, p.134-139, 2008.

SANTOS, M.D.; RODRIGUES, R.S.; FREITAS, S.H.; COSTA, D.S.; RUAS, J.R.M.; MIRANDA, E.J.; SIMÕES, M.J. Qualidade seminal, morfologia dos testículos e epidídimos de touros submetidos à dieta contendo gossipol. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.4, p.975-980, 2013.

SCHNEIDER, I.C.; AMES, M.L.; RASMUSSEN, M.A.; REILLY, P.J. Fermentation of cottonseed and other feedstuffs in cattle rumen fluid. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n.8, p.2267-2273, 2002.

SEAWRIGHT, A.A.; KELLY, W.R.; HRDLICKA, J.; McMAHON, P.; MATTOCKS, A.R.; JUKES, R. Pyrrolizidine alkaloids in cattle due to *Senecio* species in Australia. **Vet. Rec.**, v.129, n.9, p.198-199, 1991.

SEIN, G.M.; PHIL, M. The embryotoxic and immunodepressive effects of gossypol. **Am. J. Chin. Med.**, v.14, n.3-4, p.110-115, 1986.

SIJUN, D.; PAWLAK, A.; SUSZKO, A.; SZCZYPKA, M.; HUI, Y. Effects of gossypol acetic acid on cellular and humoral immune response in non-immunized and SRBC-immunized mice. **Cent. Eur. J. Immunol.**, v.37, n.1, p.11-19, 2012.

SKUTCHES, C.L.; HERMAN, D.L.; SMITH, F.H. The effect of intra-venous gossypol injection on iron utilization in swine. **J. Nutr.**, v.103, p.851-855, 1973.

SOLAIMAN, S.G.; GURUNG, N.K.; McCRARY, Q.; GOYAL, H.; McELHENNEY, W.H. Feeding performance and blood parameters of male goat kids fed EasiFlo cottonseed. **Small Rum. Res.**, v.81, n.2-3, p.137-145, 2009.

SOTO-BLANCO, B. 2008. Gossipol e fatores anti-nutricionais da soja, p.531-545. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO NETO, J. (eds.) **Toxicologia Aplicada à Veterinária**. Manole, São Paulo.

STROM-HANSEN, T.; CORNETT, C.; JAROSZEWSKI, J.W. Interaction of gossypol with amino acids and peptides as a model of enzyme inhibition. **Int. J. Pep. Prot. Res.**, v.34, n.4, p.306-310, 1989.

UDOH, P.; PATIL, D.R.; DESHPANDE, M.K. Histopathological and biochemical effects of gossypol acetate on pituitary-gonadal axis of male albino rats. **Contraception**, v.45, n.5, p.493-509, 1992.

UENO, H.; SAHNI, M.K.; SEGAL, S.J.; KOIDE, S.S. Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. **Contraception**, v.37, n.3, p.333-341, 1988.

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; ARÉCHIGA, C.F.; McDOWELL, L.R.; HANSEN, P.J.; CHENOWETH, P.J.; CALHOUN, M.C.; RISCO, C.A.; BATRA, T.R.; WILLIAMS, S.N.; WILKINSON, N.S. Effects of gossypol from cottonseed meal and dietary vitamin E on the reproductive characteristics of superovulated beef heifers. **J. Anim. Sci.**, v.80, n.9, p.2485-2492, 2002.

VILLASEÑOR, M.; COSCIONI, A.C.; GALVÃO, K.N.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P. Gossypol disrupts embryo development in heifers. **J. Dairy Sci.**, v.91, n.8, p.3015-3024, 2008.

WAITES, G.M.; WANG, C.; GRIFFIN, P.D. Gossypol: reasons for its failure to be accepted as a safe, reversible male antifertility drug. **Int. J. Andr.**, v.21, n.1, p.8-12, 1998.

WANG, Y.; LEI, H.-P. Hepatotoxicity of gossypol in rats. **J. Ethnopharm.**, v.20, n.1, p.53-64, 1987.

WANG, A.P.; ZHANG, J.M.; MENG, Y.L.; DENG, L.Q.; LV, Y.F.; LI, C.; WANG, J.Q. Effects of different sources and levels of dietary gossypol on gossypol residues in plasma and milk of lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.95, n.9, p.5127-5132, 2012.

WANG, X.; HOWELL, C.P.; CHEN, F.; YIN, J.; JIANG, Y. Gossypol - a polyphenolic compound from cotton plant. **Adv. Food Nutr. Res.**, v.58, p.215-263, 2009.

WILLARD, S.T.; NEUENDORFF, D.A.; LEWIS, A.W.; RANDEL, R.D. Effects of free gossypol in the diet of pregnant and postpartum Brahman cows on calf development and performance. **J. Anim. Sci.**, v.73, n.2, p.496-507, 1995.

YANG, Y.Q.; WU, X.Y. Antifertility mechanisms of gossypol acetic acid in female rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.80, n.2, p.425-429, 1987.

YANG, Z.J.; SONG, F.; WANG, Z.J.; SHI, Y.; FANG, G.; WANG, H. Co-administration of mixed steroid hormones can enhance the recovery of spermatogenesis damaged by gossypol acetic acid in adult rats. **J. Reprod. Contraception**, v.22, n.4, p.233-245, 2011.

YANG, J.; ZHANG, F.; LI, J.; CHEN, G.; WU, S.; OUYANG, W.; PAN, W.; YU, R.; YANG, J.; TIEN, P. Synthesis and antiviral activities of novel gossypol derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.22, n.3, p.1415-1420, 2012.

YUAN, Y.Y.; SHI, Q.X. Inhibition of hamster sperm acrosomal enzyme by gossypol is closely associated with the decrease in fertilization capacity. **Contraception**, v.62, n.4, p.203-209, 2000.

YURTCU, E.; ERGUN, M.A.; MENEVSE, A. Apoptotic effect of gossypol on human lymphocytes. **Cell Biol. Intern.**, v.27, n.9, p.791-794, 2003.

XU, W.; XU, L.; LU, H.; OU-YANG, D.; SHI, H.; DI, J.; HE, X. The immunosuppressive effect of gossypol in mice is mediated by inhibition of lymphocyte proliferation and by induction of cell apoptosis. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.30, n.5, p. 597-604, 2009.

ZBIDAH, M.; LUPESCU, A.; SHAIK, N.; LANG, F. Gossypol induced suicidal erythrocyte death. **Toxicology**, v.302, n.2-3, p.101-105, 2012.

2. CAPÍTULO 2 – EFEITO *in vitro* DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GOSSIPOL EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE OVELHAS

2.1 RESUMO

O gossipol é um composto polifenólico produzido pelas glândulas de pigmento do algodoeiro (*Gossypium* spp.). Diversos estudos demonstraram ação deletéria do gossipol comprovada sobre a espermatogênese, ciclo estral de roedores, esteroidogênese nas células da granulosa em suínos, interrupção precoce da gestação e desenvolvimento embrionário inicial. No entanto, os efeitos sobre os folículos ovarianos de ovelhas ainda não foram determinados até o momento. O presente estudo objetivou determinar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de gossipol sobre folículos ovarianos de ovelhas. Foram utilizadas quatro ovelhas mestiças, com idade entre três e cinco anos, clinicamente sadias. Oito fragmentos ovarianos de cada animal foram cultivados em Meio α -MEM suplementado com glutamina 2 mM, 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina de soro bovino-BSA e 50 μ g/mL de ascórbico ácido. Aos meios de cultivo dos fragmentos ovarianos foi acrescentado o gossipol-ácido acético nas concentrações de 5, 10 e 20 μ g/mL, e um quarto grupo foi formado sem a adição do gossipol (grupo controle). Após 24h de cultivo, todas as concentrações de gossipol proporcionaram redução significativa na proporção de folículos ovarianos normais em todos os estágios de desenvolvimento folicular, e consequente aumento na proporção de folículos atrésicos ($p < 0,01$). Em média, os fragmentos ovarianos do grupo controle apresentaram 72% de folículos viáveis e 28% de folículos atrésicos, enquanto que os fragmentos ovarianos submetidos ao gossipol nas concentrações de 5, 10 e 20 μ g/mL por 24h obtiveram 75,6%; 76,9% e 81,6% de folículos atrésicos, respectivamente. Esta quantidade foi de 88,3%; 86,5% e 89% de folículos atrésicos quando cultivados com gossipol nas mesmas concentrações por sete dias, enquanto no tratamento controle foi de 38%. Em adição, o mesmo efeito deletério foi comprovado nos folículos ovarianos submetidos ao cultivo com gossipol por sete dias. Foi notório a ausência de folículos antrais viáveis, e, a viabilidade dos folículos primordiais apresentar-se inferior a 50%. Conclui-se que o gossipol promove danos diretos aos folículos ovarianos, resultando em aumento na proporção de folículos atrésicos e redução dos folículos viáveis. O presente estudo pode servir como modelo experimental para o estudo dos efeitos do gossipol, bem como de outros compostos, sobre os folículos ovarianos.

Palavras chave: citotoxicidade, folículos atrésicos, *Gossypium* spp., reprodução ovina.

2.2 INTRODUÇÃO

O gossipol é um composto polifenólico de cor amarela, tóxico, antipolimerizante e antioxidante; produzido pelas glândulas de pigmento do algodoeiro (*Gossypium* spp.), com maior concentração nas sementes. Esta planta é largamente cultivada para fornecimento de matéria prima para a indústria têxtil e de biocombustível. Após a extração da fibra e óleo, obtêm-se os subprodutos caroço, farelo e torta de algodão, amplamente utilizados na alimentação animal, principalmente devido ao seu elevado valor energético e protéico, aliado ao relativo baixo preço (SANTOS et al., 2013; GADELHA et al., 2014a).

Diversos estudos comprovaram a ação deletéria do gossipol sobre a espermatogênese por meio da inibição da motilidade, diminuição da concentração espermática, indução de lesão mitocondrial específica na cauda do espermatozoide e danos ao epitélio germinativo (RANDEL et al., 1992; FORNÉS et al., 1993; BROCAS et al., 1997; CHENOWETH et al., 2000; EL-SHARAKY et al., 2010; SANTOS et al., 2013; GADELHA et al., 2014a). Contudo, tais efeitos são dependentes da dose e do tempo de exposição, sendo revertidos quando a ingestão do gossipol é interrompida (HASSAN et al., 2004).

Poucos estudos elucidam a ação do gossipol na gametogênese de fêmeas monogástricas e ruminantes. Neste sentido, foi verificado que a exposição a este composto promove interferência no ciclo estral de roedores (LIN et al., 1985; LIN; RAJAMAHENDRAN; RIKIHISA, 1991; GADELHA et al., 2014b), diminuição da esteroidogênese nas células da granulosa em suínos (BASINI et al., 2009) e interrupção precoce da gestação e do desenvolvimento embrionário inicial (ZIRKLE et al., 1988; RANDEL et al., 1996; VELASQUEZ-PEREIRA et al., 2003; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2005; VILLASEÑOR et al., 2008). Recentemente, foi observado que o tratamento de ratas com gossipol (25 mg/kg/dia, via subcutânea) promoveu redução significativa da população total de folículos ovarianos com aumento da frequência de folículos atrésicos, associados a menores níveis séricos de progesterona (GADELHA et al., 2014b). No entanto, os efeitos sobre os folículos ovarianos de ovelhas ainda não foram determinados até o momento. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de gossipol sobre folículos ovarianos de ovelhas.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oito ovários de quatro ovelhas oriundas de abatedouro localizado no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. As ovelhas eram mestiças, clinicamente sadias e com idade entre três e cinco anos. Os ovários foram coletados e transportados para o laboratório sob refrigeração. Em seguida, os ovários foram lavados com álcool 70% e, em seguida, duas vezes com Meio Essencial Mínimo alfa (α -MEM - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), acrescido de 100 μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA).

Os ovários das ovelhas foram fragmentados com auxílio de instrumentos cirúrgicos e lâminas de bisturi estéreis. Oito fragmentos ovarianos de cada animal foram cultivados em placas de 24 poços de cultivo de células contendo 1 mL de meio de cultivo Meio α -MEM suplementado com glutamina 2 mM, 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina de soro bovino-BSA e 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Atribuiu-se como grupo controle os fragmentos ovarianos cultivados na ausência de gossipol (0 μ g/mL), além de serem testadas três concentrações de gossipol-ácido acético (G4382, Fluka, Buchs, Suíça): 5, 10 e 20 μ g/mL. As placas foram incubadas a 39°C e 5% de CO₂ (Panasonic CO₂ Incubator MCO-18AC, Leicestershire, Reino Unido) por períodos de 24h e sete dias. O meio de cultivo foi renovado a cada dois dias.

Após a incubação, os fragmentos ovários foram fixados em Carnoy por 12h, e, posteriormente, processados rotineiramente para histologia e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Os fragmentos foram analisados em microscópio óptico para a contagem e classificação dos folículos ovarianos. Em cada grupo, foram avaliados cerca de 300 folículos ovarianos. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento, como: primordial (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosa), transição (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosa e cúbicas), primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas), secundário (oócito circundado por duas camadas de células da granulosa cúbicas) ou antral (formação de cavidade preenchida por fluido folicular). Os folículos também foram classificados como viáveis ou atresícos, sendo considerados viáveis quando apresentavam formato regular e células da granulosa organizadas (sem sinais de

atresia). Enquanto os atresícos foram caracterizados por oócitos retraídos, núcleo picnótico, membrana basal interrompida e células da granulosa desorganizadas.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o *software* R (versão 3.0.3) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). As frequências de folículos atresícos totais e de cada tipo de folículo foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proporções das diferentes classes de folículos ovarianos de ovelhas cultivados na ausência (0 µg/mL) e em concentrações crescentes de gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) por períodos de 24h e sete dias estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. É notório o efeito deletério *in vitro* do gossipol proporcionando redução significativa no número de folículos ovarianos viáveis em todos os estágios de desenvolvimento; e aumento significativo no número de folículos atresícos (Figura 2) após 24h de cultivo ($p < 0,01$). A mesma redução ocorreu nos folículos ovarianos submetidos ao cultivo com gossipol por sete dias ($p < 0,01$), com exceção dos folículos antrais que não apresentou quantidade suficiente para a análise estatística. As frequências nos tratamentos com gossipol apresentaram diferenças significantes com o controle, mas não entre as diferentes concentrações de gossipol. Em média, os fragmentos ovarianos do grupo controle apresentaram 72,2% de folículos viáveis e 27,8% de folículos atresícos, enquanto que os fragmentos ovarianos submetidos ao gossipol nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL por 24h obtiveram 75,6%; 76,9% e 81,6% de folículos atresícos, respectivamente. Esta quantidade aumentou para 88,3%; 86,5% e 89% de folículos atresícos quando cultivados com gossipol nas mesmas concentrações por sete dias, sendo apenas 38% no grupo controle.

Tabela 4 - Estimativa das populações de folículos ovarianos de ovelhas (%) cultivados na ausência (0 µg/mL) e em concentrações crescentes de gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) após 24 horas.

Folículos	Gossipol (µg/mL)				<i>p</i> ^a
	0	5	10	20	
Primordial					
normal	67,5 (54/80)	23,2 (22/95)	19,3 (22/114)	17,4 (12/69)	<0,0001
atrésico	32,5 (26/80)	76,8 (73/95)*	80,7 (92/114)*	82,6 (57/69)*	
Transição					
normal	71,7 (134/187)	27,2 (46/169)	27,2 (41/151)	23,2 (41/177)	<0,0001
atrésico	28,3 (53/187)	72,8 (123/169)*	72,8 (110/151)*	76,8 (136/177)	
Primário					
normal	83,8 (31/37)	13,6 (3/22)	22,6 (7/31)	11,8 (4/34)	<0,0001
atrésico	16,2 (6/37)	86,4 (19/22)*	77,4 (24/31)*	88,2 (30/34)*	
Secundário					
normal	75 (3/4)	0	0	0	<0,0001
atrésico	25 (1/4)	100 (3/3)	100 (5/5)*	100 (21/21)*	
Antral					
normal	80 (4/5)	16,7 (1/6)	14,3 (1/7)	0	0,005
atrésico	20 (1/5)	83,3 (5/6)	85,7 (6/7)	100 (9/9)*	
Total					
normal	72,2 (226/313)	24,4 (72/295)	23,1 (71/308)	18,4 (57/310)	<0,0001
atrésico	27,8 (87/313)	75,6 (223/295)*	76,9 (237/308)*	81,6 (253/310)*	

^a Teste exato de Fisher; * diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

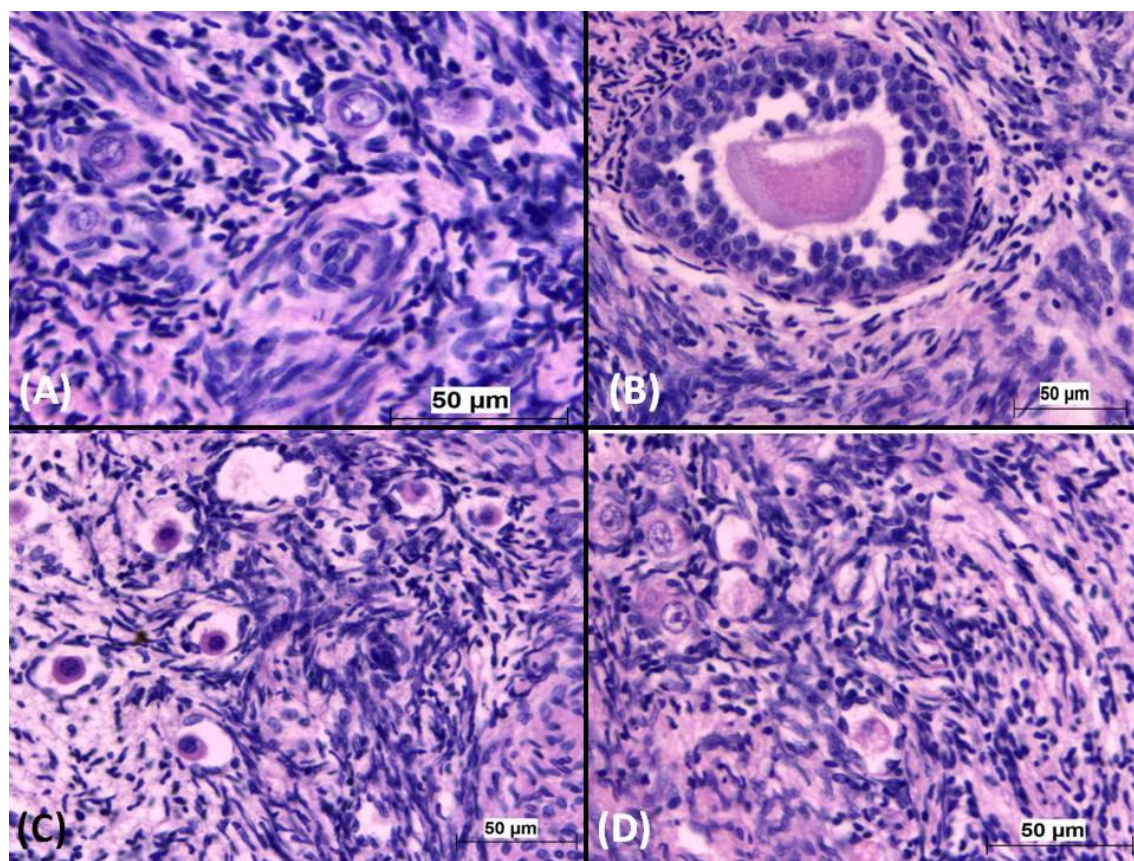


Figura 2: Folículos ovarianos de ovelhas submetidos ao cultivo *in vitro*. (A): Folículos primordiais e (B) de transição normais cultivados na ausência de gossipol (0 µg/mL); Folículos primordiais atrésicos com oócitos retraídos, núcleo picnótico e células da granulosa desorganizadas cultivados em (C) 5 e (D) 10 µg/mL de gossipol. Coloração Hematoxilina e Eosina.

Tabela 5 - Estimativa das populações de folículos ovarianos de ovelhas (%) cultivados na ausência (0 µg/mL) e em concentrações crescentes de gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) após sete dias.

Folículos	Gossipol (µg/mL)				<i>p</i> ^a
	0	5	10	20	
Primordial					
normal	58,1 (18/31)	17,9 (12/67)	24 (18/75)	13 (6/46)	<0,0001
atrésico	41,9 (13/31)	82,1 (55/67)*	76 (57/75)*	87 (40/46)*	
Transição					
normal	60,6 (129/213)	10,6 (19/180)	9,9 (19/192)	11,4 (17/149)	<0,0001
atrésico	39,4 (84/213)	89,4 (161/180)*	90,9 (173/192)*	88,6 (132/149)*	
Primário					
normal	66,7 (32/48)	10,8 (4/37)	11,5 (3/26)	10,5 (10/95)	<0,0001
atrésico	33,3 (16/48)	89,2 (33/37)*	88,5 (23/26)*	89,5 (85/95)*	
Secundário					
normal	87,5 (7/8)	0	0	0	<0,0001
atrésico	12,5 (1/8)	100 (11/11)*	100 (4/4)*	100 (10/10)*	
Antral					
normal	66,7 (2/3)	0	0	0	n.d.
atrésico	33,3 (1/3)	100 (5/5)	0	100 (1/1)	
Total					
normal	62 (188/303)	11,7 (35/300)	13,5 (40/297)	11 (33/301)	<0,0001
atrésico	38 (115/303)	88,3 (265/300)*	86,5 (257/297)*	89 (268/301)*	

^a Teste exato de Fisher; * diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; n.d.: não determinado.

Os resultados aqui descritos estão de acordo com os obtidos em ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia, via subcutânea) por 15 dias. Estas ratas apresentaram redução significativa no número de folículos ovarianos viáveis e aumento significativo no número de folículos atrésicos. Ainda no mesmo trabalho, todos os tipos de folículos foram acometidos, com redução para cerca de um terço nos folículos viáveis e aumento de aproximadamente três vezes nos folículos atrésicos (GADELHA et al., 2014b). Tais resultados demonstram que os folículos ovarianos de ovelhas também são sensíveis aos efeitos tóxicos do gossipol.

No presente estudo, foi constatada a ausência de folículos antrais viáveis após o cultivo na presença de gossipol por apenas sete dias. Assim, supõe-se que a exposição ao gossipol poderia resultar em drástica redução na capacidade de ovulação das ovelhas. Em adição, a viabilidade dos folículos primordiais foi inferior à metade do observado no grupo

controle. Tais resultados são preocupantes, já que nas fêmeas dos mamíferos, o número de folículos primordiais ovarianos é fixado no momento do nascimento. Os folículos primordiais se desenvolvem em folículos primários, secundários e antrais, em um processo contínuo e irreversível. Danos aos folículos primários, secundários e antrais podem levar à infertilidade temporária quando os folículos primordiais não são afetados. Por outro lado, o dano causado aos folículos primordiais pode resultar em infertilidade permanente devido à eventual depleção do *pool* destes folículos (HIRSHFIELD, 1997). Portanto, é possível propor que a exposição ao gossipol possa reduzir a reserva de folículos do ovário, prejudicando a fertilidade feminina (GADELHA et al., 2014b). Além disto, os resultados obtidos comprovam que a ação deletéria sobre os folículos ovarianos ocorre por meio da ação direta do gossipol, e não por meio de algum produto de biotransformação.

O mecanismo pelo qual o gossipol promove os danos aos folículos ovarianos ainda não é conhecido. Diversos estudos demonstraram que o gossipol possui atividade citotóxica (LIN et al., 1985; RANDEL et al., 1992). Este efeito citotóxico pode ser promovido por geração de espécies reativas do oxigênio, induzindo o estresse oxidativo (FORNÉS et al., 1993; KOVACIC, 2003); interrupção da comunicação intercelular (HERVÉ et al., 1996); indução de apoptose (MOON et al., 2008; CENGIZ et al., 2010); e interferência no transporte iônico nas membranas (BREITBART et al., 1984; 1989; CHENG et al., 2003; EL-SHARAKY et al., 2010). Diversos autores verificaram inibição do influxo de cálcio e da atividade de Mg-ATPase e Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas de espermatozoides (BREITBART et al., 1984; 1989; EL-SHARAKY et al., 2010), mas o aumento na concentração de cálcio intracelular também já foi relatado (CHENG et al., 2003). Em adição ao efeito citotóxico, o gossipol promove a diminuição da esteroidogênese, e, conseqüentemente, queda dos níveis séricos de progesterona e estradiol (BASINI et al., 2009; GADELHA et al., 2014b). Tais fatos permitem a hipótese de que o efeito deletério do gossipol sobre folículos ovarianos possa ser decorrente da interação de fatores citotóxicos e hormonais.

Outro mecanismo de ação tóxica do gossipol é a interferência no metabolismo energético celular. De fato, foi observado que este composto promove bloqueio da produção e liberação de ATP utilizado por espermatozoides (UENO et al., 1988). Além disto, acarreta alterações ultraestruturais mitocondriais em células espermáticas (CHENOWETH et al., 2000; ROMUALDO; KLINEFELTER; KEMPINAS, 2002), renais, cardíacas e da adrenal

(CUÉLLAR; RAMÍREZ, 1993). Deste modo, este estudo apresenta-se como o ponto de partida para a determinação da concentração de gossipol necessária para causar efeitos deletérios em folículos ovarianos ovinos, sendo necessários pesquisas mais aprofundadas *in vivo* para comprovar os dados *in vitro*. Além disso, estudos ultraestruturais para determinar se o gossipol produz alterações celulares importantes nos folículos ovarianos também são necessários.

Assim, o gossipol promove danos diretos aos folículos ovarianos, resultando em aumento na proporção de folículos atrésicos e redução dos folículos viáveis. O presente trabalho pode servir como modelo experimental para o estudo dos efeitos do gossipol, bem como de outros compostos, sobre os folículos ovarianos.

2.5 REFERÊNCIAS

BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; BAIONI, L.; GRASSELLI, F. Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.37, n.1, p.30-36, 2009.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; NASS-ARDEN, L. Effect of gossypol-acetic acid on calcium transport and ATPase activity in plasma membranes from ram and bull spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v.7, n.5, p.439-447, 1984.

BREITBART, H.; MAYEVSKY, A.; NASS-ARDEN, L. Molecular mechanisms of gossypol action on sperm motility. **Int. J. Biochem.**, v.21, n.10, p. 1097-1102, 1989.

BROCAS, C.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; McDOWELL, L.R.; CALHOUN, M.C.; STAPLES, C.R.; WILKINSON, N.S.; BONING, A.J.; CHENOWETH, P.J.; HANSEN, P.J. Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes and embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, n.4, p.901-907, 1997.

CENGIZ, E.; KARACA, B.; KUCUKZEYBEK, Y.; GORUMLU, G.; GUL, M.; ERTEN, C.; ATMACA, H.; UZUNOGLU, S.; KARABULUT, B.; SANLI, U.; USLU, R. Overcoming drug resistance in hormone- and drug-refractory prostate cancer cell line, PC-3 by docetaxel and gossypol combination. **Mol. Biol. Reprod.**, v.37, n.3, p.1269-1277, 2010.

CHENG, J.S.; LO, Y.K.; YEH, J.H.; CHENG, H.H.; LIU, C.P.; CHEN, W.C.; JAN, C.R. Effect of gossypol on intracellular Ca^{2+} regulation in human hepatoma cells. **Chin. J. Physiol.**, v.46, n.3, p. 117-122, 2003.

CHENOWETH, P.J.; CHASE, C.C.; RISCO, C.A.; LARSEN, R.E. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1193-1203, 2000.

CÚELLAR, A.; RAMÍREZ, J. Further studies on the mechanism of action of gossypol on mitochondrial membrane. **Int. J. Biochem.**, v.25, n.8, p.1149-1155, 1993.

EL-SHARAKY, A.S.; NEWAIRY, A.A.; ELGUINDY, N.M.; ELWAFI, A.A. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.48, n.12, p.3354-3361, 2010.

FORNÉS, M.W.; BARBIERI, A.M.; BURGOS, M.H. Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.195, n.3, p.1289-1293, 1993.

GADELHA, I.C.N.; FONSECA, N.B.S.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Gossypol toxicity from cottonseed products. **Scient. World J.**, v.2014, Article ID 231635, 11p., 2014a.

GADELHA, I.C.N.; MACEDO, M.F.; OLORIS, S.C.S.; MELO, M.M.; SOTO-BLANCO, B. Gossypol promotes degeneration of ovarian follicles in rats. **Scient. World J.**, v.2014, Article ID 986184, 7p., 2014b.

HASSAN, M.E.; SMITH, G.W.; OTT, R.S.; FAULKNER, D.B.; FIRKINS, L.D.; EHRHART, E.J.; SCHAEFFER, D.J. Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. **Theriogenology**, v.61, n.6, p.1171-1179, 2004.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; JOUSAN, F.D.; SOTO, P.; HANSEN, P.J. Timing of inhibitory actions of gossypol on cultured bovine embryos. **J. Dairy Sci.**, v.88, n.3, p.922-928, 2005.

HERVÉ, J. C.; PLUCIENNIK, F.; BASTIDE, B.; CRONIER, L.; VERRECCHIA, F.; MALASSINÉ, A.; JOFFRE, M.; DÉLEZE, J. Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v.313, n.3, p.243–255, 1996.

HIRSHFIELD, A.N. Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.29, n.1, p.10-15, 1997.

KOVACIC, P. Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. **Curr. Med. Chem.**, v.10, n.24, p.2711-2718, 2003.

LIN, Y.C.; FUKAYA, T.; RIKIHISA, Y.; WALTON, A. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life Sci.**, v.37, n.1, p.39-47, 1985.

LIN, Y.C.; RAJAMAHENDRAN, P.; RIKIHISA, Y. Inhibition of rat embryo implantation in the gossypol-treated uterine horn. **Theriogenology**, v.35, n.4, p.769-777, 1991.

MOON, D.O.; KIM, M.O.; LEE, J.D; KIM, G.Y. Gossypol suppresses NF-kB activity and NF-kB-related gene expression in human leukemia U937 cells. **Cancer Lett.**, v.264, n.2, p.192-200, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em <http://www.R-project.org>.

RANDEL, R.D.; CHASE, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **J. Anim. Sci.**, v.70, n.5, p.1628-1638, 1992.

RANDEL, R.D.; WILLARD, S.T.; WYSE, S.J.; FRENCH, L.N. Effects of diets containing free gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function in Brangus heifers treated with bFSH. **Theriogenology**, v.45, n.5, p.911-922, 1996.

ROMUALDO, G.S.; KLINEFELTER, G.R.; KEMPINAS, W.G. Postweaning exposure to gossypol results in epididymis-specific effects throughout puberty and adulthood in rats. **J. Androl.**, v.23, n.2, p.220-228, 2002.

SANTOS, M.D.; RODRIGUES, R.S.; FREITAS, S.H.; COSTA, D.S.; RUAS, J.R.M.; MIRANDA, E.J.; SIMÕES, M.J. Qualidade seminal, morfologia dos testículos e epidídimos de touros submetidos à dieta contendo gossipol. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.4, p.975-980, 2013.

UENO, H.; SAHNI, M.K.; SEGAL, S.J.; KOIDE, S.S. Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. **Contraception**, v.37, n.3, p.333-341, 1988.

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; RISCO, C.A.; McDOWELL, L.R.; STAPLES, C.R.; PRICHARD, D.; CHENOWETH, P.J.; MARTIN, F.G.; WILLIAMS, S.N.; ROJAS, L.X.; VILLASEÑOR, M.; COSCIONI, A.C.; GALVÃO, K.N.; JUCHEM, S.O.; SANTOS, J.E.P.; PUSCHNER, B. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo development and viability *in vivo* and *in vitro*. **J. Dairy Sci.**, v.86, Suppl., p.240, 2003.

VILLASEÑOR, M.; COSCIONI, A.C.; GALVÃO, K.N.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P. Gossypol disrupts embryo development in heifers. **J. Dairy Sci.**, v.91, n.8, p.3015-3024, 2008.

ZIRKLE, S.M.; LIN, C.; GWAZDAUSKAS, F.C.; CANSECO, R.S. Effect of gossypol on bovine embryo development during the preimplantation period. **Theriogenology**, v.30, n.3, p.575-582, 1988.

3. CAPÍTULO 3 – EFEITO *in vivo* DO GOSSIPOL NA FOLÍCULOGÊNESE DE OVELHAS ALIMENTADAS COM TORTA DE ALGODÃO

3.1 RESUMO

O gossipol é um composto polifenólico presente nas sementes do algodão e conhecido por apresentar ação deletéria sobre a espermatogênese. Em ratas foi verificado que o gossipol promove degeneração dos folículos ovarianos, entretanto tal efeito ainda não foi estudado em ovelhas. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar o efeito do gossipol na foliculogênese de ovelhas alimentadas com torta de algodão. Foram utilizadas doze ovelhas mestiças, aleatoriamente distribuídas em dois grupos e alimentadas com rações contendo torta de algodão ou não (controle). A ração foi oferecida na proporção de 1,5% do peso vivo do animal durante 63 dias consecutivos. As concentrações de gossipol total e livre na torta foram 3,28 mg/g e 0,11 mg/g, respectivamente. Diariamente realizou-se citologia vaginal. Semanalmente foi feita a pesagem dos animais e coleta do sangue para análises hematológicas e bioquímicas. Após os 63 dias de tratamento, as ovelhas foram submetidas à ovariectomia bilateral para contagem e classificação dos folículos ovarianos. Durante todo o período experimental, nenhum animal apresentou qualquer sinal clínico de intoxicação. Não houve interferência sobre as concentrações de progesterona, peso, ganho em peso e medidas dos ovários. Apenas alterações ocasionais sobre a citologia vaginal, parâmetros hematológicos e bioquímicos foram evidenciados. Entretanto, o tratamento com gossipol foi responsável por redução significativa no número de folículos ovarianos viáveis (20,6% nas ovelhas tratadas e 65,1% no grupo controle) e aumento significativo no número de folículos atresícos (79,4% nas ovelhas tratadas e 34,9% no grupo controle), com interferência em todas as fases do desenvolvimento folicular ($p < 0,001$). Concluindo, o gossipol presente na torta de algodão foi responsável por redução na viabilidade e consequente aumento na atresia dos folículos ovarianos das ovelhas. Este efeito foi observado em animais sem qualquer manifestação clínica, interferência no ganho de peso, alteração hematológica ou bioquímica, o que reforça a hipótese de ação direta do gossipol sobre os folículos ovarianos.

Palavras chave: fator antinutricional, folículos atresícos, reprodução, ovinos.

3.2 INTRODUÇÃO

O gossipol é um composto polifenólico de coloração amarela, tóxico, produzido pelas glândulas de pigmento e com maior concentração nas sementes do algodoeiro (*Gossypium* spp.) (SOTO-BLANCO, 2008). Até recentemente, considerava-se que os ruminantes eram capazes de inativar todo o gossipol ingerido devido à detoxificação ruminal (CHEEKE, 1998). No entanto, esta hipótese tem sido contestada a partir da observação de níveis séricos de gossipol livre em ruminantes alimentados com subprodutos de algodão e de seus consequentes efeitos tóxicos (ZHANG et al., 2007; GADELHA et al., 2011; 2014a).

Em bezerros, as principais lesões caracterizam-se por ascite, necrose aguda de hepatócitos centrolobulares, alterações cardiovasculares e renais (HOLMBERG et al., 1988; RISCO et al., 1992). No entanto, os ruminantes adultos intoxicados apresentam taquipneia e anemia caracterizada por redução na concentração de hemoglobina; aumento na concentração de proteínas plasmáticas totais e na fragilidade eritrocitária (EL-MOKADEM et al., 2013), e, ocasionalmente, ocorrem mortes. Além disto, a exposição prolongada ao gossipol foi associada com imunossupressão, aumentando o risco para a ocorrência de outras enfermidades, como a mastite (FTHENAKIS et al., 2004) e broncopneumonia (RISCO et al., 1992).

O efeito mais estudado do gossipol é a toxicidade reprodutiva. Em machos, apresenta ação deletéria sobre os espermatozoides por meio do bloqueio na produção, liberação e utilização do ATP (UENO et al., 1988). Além disto, também inibe o influxo de cálcio e as atividades das enzimas Mg-ATPase e Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas dos espermatozoides (BREITBART et al., 1984).

Em fêmeas, a exposição ao gossipol tem sido associada à interrupção do ciclo estral e prenhez (RANDEL et al., 1992; SOTO-BLANCO, 2008). A capacidade do gossipol de afetar a qualidade e o desenvolvimento embrionário foi demonstrada em estudos *in vitro* (LIN et al., 1994; BROCAS et al., 1997; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2005) e *in vivo* (SANTOS et al., 2003; VILLASEÑOR et al., 2008). Em ratas, foi verificado que o gossipol promove degeneração de folículos ovarianos, reduzindo a proporção de folículos normais e aumentando a de atresicos em todas as fases do desenvolvimento (GADELHA et al., 2014b). No entanto, este efeito ainda não foi comprovado em ovelhas. Assim, o presente estudo

objetivou determinar o efeito *in vivo* deste composto na foliculogênese de ovelhas alimentadas com torta de algodão.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as técnicas e os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) por meio do parecer nº 24/2014 (processo 23091.003174/2014-61).

Foram utilizadas doze ovelhas mestiças, adultas, saudáveis e não gestantes, com idade variando de um a três anos e peso médio de 28,3±4,90 kg. Os animais foram mantidos em baias, recebendo água, sal mineral, feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) triturado *ad libitum* e concentrado comercial (iniciando com 0,5% até alcançar 1,5% do peso vivo). Antes do início do experimento, as ovelhas foram submetidas à duas vermifugações com intervalo de 21 dias (Biozen®, Biofarm, Jaboticabal, São Paulo; Albendazole: 5 mg/kg) e mantidas em duplas nas baias por 30 dias, com o objetivo de proporcionar condições de adaptabilidade ambiental e o mesmo nível nutricional.

Os animais foram aleatoriamente separados em dois grupos, sendo ofertadas rações com (grupo tratamento) e sem torta de algodão (grupo controle). Foram utilizadas rações concentradas isoprotéicas (18% de proteína bruta) (Tabela 6), sendo a mesma oferecida na proporção de 1,5% do peso vivo do animal (divididos em dois períodos de arraçãoamento). Este manejo alimentar foi mantido por 63 dias. O consumo do concentrado foi mensurado diariamente pela diferença de peso entre o administrado e a sobra, quando existiu. Determinaram-se as concentrações de gossipol livre e total na torta de algodão por meio de HPLC seguindo a metodologia de HRON et al. (1990; 1999).

Tabela 6. Ingredientes (em % de matéria seca) das dietas oferecidas aos ovinos.

Ingredientes	Controle	Tratado
Milho	75	51
Farelo de soja	25	9
Torta de algodão	0	40

Antes da administração das dietas (dia 0), e semanalmente, os animais foram pesados e submetidos à coleta de amostras sanguíneas por meio de venipunção jugular. Utilizou-se sistema a vácuo com frascos sem anticoagulante para as dosagens bioquímicas (proteínas totais, albumina, globulinas; atividades de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina) e hormonal (progesterona). Tubos contendo ácido etilenodiaminotetracéticodissódico (EDTA - 1 mg/mL) foram utilizados para a determinação do hemograma segundo a metodologia de JAIN (1993). As análises bioquímicas foram realizadas utilizando kits comerciais específicos (Katal, Belo Horizonte, MG) e um analisador bioquímico semi-automático (Bioplus BIO-2000, Barueri, SP). As determinações das concentrações séricas de progesterona foram realizadas utilizando kit comercial específico (InVitro, Belo Horizonte, MG) e um leitor ELISA (MR-96A Microplate Reader, Mindsay, Shenzhen, China). Esfregaços vaginais foram realizados diariamente durante todo o período experimental (colheita única/animal/dia) seguindo as recomendações de PORTO et al. (2007).

Após os 63 dias de tratamento, as ovelhas foram submetidas à ovariectomia bilateral de acordo com a metodologia proposta por RODRIGUES et al. (2012) modificada (uso de abraçadeiras de Nylon, 200 x 4,8mm, para hemostasia dos pedículos ovarianos). Os ovários foram pesados e mensurados, e, em seguida, fixados em Carnoy por 12h, para posterior processamento histológico e corados pela técnica de HE. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento, como: primordial (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas), transição (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas), primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas), secundário (oócito circundado por duas camadas de células da granulosa cúbicas) ou antral (formação de cavidade preenchida por fluido folicular). Os folículos também foram classificados como viáveis ou atresícos, sendo considerados viáveis quando apresentavam formato regular e células da granulosa organizadas (sem sinais de atresia). Enquanto os atresícos foram caracterizados por oócitos retraídos, núcleo picnótico, membrana basal interrompida e células da granulosa desorganizadas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos e seis repetições. Os dados foram avaliados estatisticamente com o auxílio do programa SAS for Windows v.8.0. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram

avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para as análises univariadas (sem mensurações repetidas) foi utilizado o teste *t* para os paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. As diferenças estatisticamente significante dos dados provenientes de mensurações repetidas foram determinadas utilizando a análise de regressão por modelo misto usando o PROC MIXED do SAS, sendo cada animal determinado como uma unidade fixa e o tempo como variável (WOLGFINGER; CHANG, 1996; LITTELL et al., 1998). As comparações das proporções entre os folículos viáveis e atresícos foi feita por meio do teste exato de Fisher. O nível de significância para todas as análises foi estabelecido como $p < 0,05$.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de gossipol total e livre na torta de algodão foram 3,28 mg/g e 0,11 mg/g, respectivamente. Durante todo o período experimental, não foram observados sinais clínicos de intoxicação por gossipol nem diferença significativa sobre parâmetros, como peso corporal e ganho em peso (Tabela 7). O peso dos animais apresentou influência significativa ($p < 0,0001$) pelo tempo experimental, mas não foi significativa ($p > 0,05$) pelo tratamento nem houve interação tempo-tratamento. Este resultado é similar ao relatado em carneiros alimentados com dietas contendo até 45% de farelo de algodão extrusado (BRAGA et al., 2012) e ovelhas alimentadas com farelo, caroço ou torta de algodão (40% da composição do concentrado) (LIMA, 2013); que não apresentaram diferença no peso corporal, ganho em peso e consumo alimentar. Ainda, observou-se que, ao aumentar a quantidade de gossipol nas dietas de bezerros, ocorria inicialmente a diminuição da ingestão de alimentos, mas com posterior recuperação do consumo (RISCO et al., 1992).

Os dados das dosagens de progesterona, eritrograma, leucograma e bioquímica sérica estão apresentados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11, respectivamente. Nos dias experimentais testados, não ocorreu diferença significativa nas concentrações de progesterona entre os grupos ($p < 0,05$), e não houve influência significativa ($p > 0,05$) pelo tempo experimental, pelo tratamento e interação tempo-tratamento. Os valores encontrados mostraram grande variação da concentração de progesterona nas ovelhas experimentais (0,11 - 6,34 ng/mL), sendo distintos dos valores utilizados como referência por KANEKO et al. (2008) (0,15 - 4,0 ng/mL), mas compatíveis com os relatados por SASA et al. (2002) (0,08 - 7,36 ng/mL). Desta

forma, o gossipol presente na torta de algodão não afetou os níveis séricos de progesterona nas ovelhas experimentais. Poucos são os trabalhos que avaliaram as alterações hormonais promovidas pelo gossipol. Em roedores, observou-se a diminuição das concentrações de 17β -estradiol e progesterona no diestro, estro e início da gestação em ratas (LIN et al., 1985; YANG; WU, 1987; GADELHA et al., 2014b). Em vacas, não foi observada diferença significativa da concentração de progesterona entre os grupos controle e alimentado com algodão (GRAY et al., 1990; GAMBILL; HUMPHREY, 1993), mas aumento significativo da concentração de LH (GRAY et al., 1990).

Tabela 7 - Pesos e ganho em peso de ovelhas alimentadas com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Dia experimental	Pesos ^a (kg)		<i>p</i>
	Controle	Tratamento	
0	27,3 ± 6,38	29,4 ± 3,04	n.s.
7	28,9 ± 5,60	31,2 ± 2,28	n.s.
14	28,8 ± 5,59	32,0 ± 3,54	n.s.
21	30,3 ± 5,49	33,2 ± 3,35	n.s.
28	30,8 ± 5,64	33,7 ± 3,57	n.s.
35	30,6 ± 6,14	34,0 ± 3,12	n.s.
42	32,2 ± 6,34	34,8 ± 3,28	n.s.
49	33,4 ± 6,23	35,3 ± 3,55	n.s.
56	32,7 ± 7,23	35,9 ± 4,01	n.s.
63	33,4 ± 6,72	36,9 ± 4,29	n.s.
Ganho em peso ^b	6,1 ± 3,56	7,52 ± 1,78	n.s..

^aAnálise de regressão por modelo misto – PROC MIXED SAS ($p < 0,05$); ^bteste *t* de Student ($p < 0,05$); n.s.: não significativa.

Tabela 8: Dosagens de progesterona (ng/mL) em ovelhas alimentadas com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Dia Experimental	Dosagem de progesterona		p^a
	Controle	Tratamento	
0	2,35 ± 1,88	2,91 ± 2,35	n.s.
28	3,21 ± 1,25	2,16 ± 1,45	n.s.
43	1,68 ± 1,66	2,07 ± 2,52	n.s.
63	2,83 ± 1,15	2,74 ± 2,78	n.s.
Valores de referência ^b Estro: 0,15 - 0,25 Fase lútea: 2 - 4			

^a Análise de regressão por modelo misto – PROC MIXED SAS ($p < 0,05$); ^b Kaneko et al. (2008). n.s.: não significativo.

Com relação ao eritrograma, observou-se no grupo tratamento, aumento significativo do hematócrito, número de hemácias e concentração de hemoglobina, simultaneamente, a partir do dia 56. Os valores de hematócrito, hemácias, hemoglobina e volume corpuscular médio (VCM) apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) pelo tempo experimental e pelo tratamento, mas a interação tempo-tratamento ocorreu apenas com os valores de VCM. Os valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram influência significativa ($p > 0,05$) pelo tempo experimental, pelo tratamento nem interação tempo-tratamento. Tais resultados são contrários aos obtidos em estudo anterior, que observaram que carneiros alimentados com 9 e 14mg de gossipol livre/kg de peso vivo apresentaram redução da concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM (EL-MOKADEM et al., 2013). Assim como aumento da fragilidade osmótica eritrocitária em caprinos (SOLAIMAN et al., 2009) e vacas alimentadas com dietas contendo gossipol durante 84 (MENA et al., 2004) e 120 dias (RISCO et al., 2002). O efeito inicial do gossipol pode ser decorrente da quelação do ferro hepático, interferindo com a utilização normal do ferro na hematopoiese (SKUTCHES et al., 1973). Por ser altamente reativo com o ferro, é possível que o gossipol reaja com o ferro no intestino formando um complexo insolúvel, que é excretado nas fezes. Além disso, o ferro ligado ao gossipol se torna indisponível para a

biossíntese de hemoglobina (BARRAZA et al., 1991). Outro aspecto importante é que o gossipol pode inibir a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, causando diminuição na produção NADPH, que é necessário para a ação da enzima glutathione peroxidase, importante componente dos sistemas antioxidantes celulares. A inibição de enzimas nesta via ou oxidantes em excesso pode causar redução dos valores de hemoglobina e do hematócrito (DUNCAN et al., 1994; EL-MOKADEM et al., 2013).

Nos valores do leucograma, foi encontrada influência significativa ($p < 0,05$) pelo tempo experimental nos valores de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos; pelo tratamento em leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos; e interação tempo-tratamento apenas nos neutrófilos. As ovelhas experimentais (grupo tratamento) apresentaram aumentos significantes no número total de leucócitos e linfócitos apenas nos dias 14 e 42, enquanto os neutrófilos apresentam diferença significativa apenas no dia 42 ($p < 0,05$). Em trabalho anterior, após nove semanas de alimentação com dietas contendo farelo de algodão extrusado (0%, 15%, 30% e 45%), foram observadas reduções significativas nos números circulantes de leucócitos totais, linfócitos e, em menor extensão, neutrófilos nos ovinos recebendo maiores concentrações de farelo de algodão (BRAGA et al., 2012). Experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando ratos verificaram atividade imunossupressora do gossipol, afetando linfócitos por meio da inibição da proliferação e da indução de apoptose (XU et al., 2009). Além disto, ratos tratados com gossipol apresentaram reduções significativas das populações de linfócitos no timo e nos nódulos linfáticos mesentéricos e das populações de células totais esplênicas (SIJUN et al., 2012). No presente estudo, a ausência de redução nos números circulantes dos diferentes leucócitos é um indicador que a concentração de gossipol ingerida apresentou-se insuficiente para comprometer a viabilidade destas células.

O gossipol é um composto capaz de promover hepatotoxicidade (HOLMBERG et al., 1988; MANABE; NUBE; LIN, 1991; RISCO et al., 1992; DEORAS et al., 1997; FONSECA et al., 2013). Neste sentido, diversos estudos relataram que a alimentação de ruminantes com subprodutos do algodão foi responsável por aumento da atividade sérica de enzimas hepáticas, como GGT (HOLMBERG et al., 1988), FA (NAGALAKSHMI et al., 2001; SOLAIMAN et al., 2009), ALT (PATTANAIK et al., 2003) e AST (HOLMBERG et al., 1988; MENA et al., 2004); além de redução das concentrações de albumina e proteínas plasmáticas totais (RISCO et al., 1992). No presente estudo, a bioquímica sérica apresentou diferença significativa entre grupo controle e tratamento nas concentrações de albumina (dias

7 e 63), globulinas (dias 0, 7 e 42), ALT (dias 42 e 63) e AST (dias 35 e 42). Foi encontrada influência significativa ($p < 0,05$) pelo tempo experimental nos valores de proteínas totais, albumina, globulinas, relação A/G, ALT e FA; pelo tratamento em albumina, relação A/G e ALT; e interação tempo-tratamento em globulinas, relação A/G e ALT. Tais alterações bioquímicas ocasionais não caracterizariam lesão hepática; sendo similar aos resultados em ovinos alimentados com farelo (BRAGA et al., 2012) e demais subprodutos do algodão (LIMA, 2013).

Tabela 9 - Eritrograma de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Dia experimental	Hematócrito (%)		Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)		Hemoglobina (g/dL)		VCM ^a (fL)		CHCM ^b (%)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
0	39,0 $\pm$ 4,86	37,7 $\pm$ 3,72	12,2 $\pm$ 1,62	11,9 $\pm$ 1,75	12,5 $\pm$ 1,73	12,0 $\pm$ 0,87	32,2 $\pm$ 3,13	32,2 $\pm$ 4,31	32,0 $\pm$ 1,10	31,8 $\pm$ 0,98
7	36,5 $\pm$ 1,64	40,0 $\pm$ 2,83*	10,3 $\pm$ 0,90	11,3 $\pm$ 1,16	11,7 $\pm$ 0,61	12,9 $\pm$ 0,92*	35,7 $\pm$ 1,63	35,3 $\pm$ 1,51	31,8 $\pm$ 0,41	32,0 $\pm$ 0,00
14	36,2 $\pm$ 0,98	38,2 $\pm$ 2,04	8,60 $\pm$ 0,63	12,0 $\pm$ 2,37*	11,7 $\pm$ 0,29	12,3 $\pm$ 0,65	42,5 $\pm$ 1,87	33,0 $\pm$ 5,40*	32,0 $\pm$ 0,00	32,0 $\pm$ 0,00
21	37,2 $\pm$ 3,31	38,8 $\pm$ 2,99	10,2 $\pm$ 0,99	10,7 $\pm$ 1,02	12,0 $\pm$ 1,08	12,5 $\pm$ 0,98	36,5 $\pm$ 3,15	36,5 $\pm$ 1,52	31,7 $\pm$ 0,52	31,8 $\pm$ 0,75
28	34,5 $\pm$ 1,64	37,7 $\pm$ 4,32*	12,8 $\pm$ 1,20	13,5 $\pm$ 1,67	11,1 $\pm$ 0,53	12,1 $\pm$ 1,41*	27,5 $\pm$ 2,26	27,7 $\pm$ 2,25	31,7 $\pm$ 0,52	32,0 $\pm$ 0,63
35	36,2 $\pm$ 1,47	37,8 $\pm$ 2,86	10,5 $\pm$ 0,60	11,4 $\pm$ 2,24	11,7 $\pm$ 0,50	12,2 $\pm$ 0,94	34,3 $\pm$ 0,82	33,8 $\pm$ 4,17	32,0 $\pm$ 0,00	32,7 $\pm$ 1,63*
42	30,8 $\pm$ 1,47	32,7 $\pm$ 1,86	9,80 $\pm$ 1,84	10,3 $\pm$ 1,90	9,90 $\pm$ 0,48	10,5 $\pm$ 0,60	32,3 $\pm$ 5,61	32,8 $\pm$ 7,36	31,8 $\pm$ 0,41	32,0 $\pm$ 0,00
49	33,5 $\pm$ 2,35	35,3 $\pm$ 1,21	11,1 $\pm$ 0,60	12,2 $\pm$ 0,78	10,8 $\pm$ 0,78	11,4 $\pm$ 0,37	30,3 $\pm$ 1,03	29,0 $\pm$ 1,26	32,0 $\pm$ 0,00	32,0 $\pm$ 0,00
56	34,7 $\pm$ 1,86	38,8 $\pm$ 3,31*	9,80 $\pm$ 1,17	12,7 $\pm$ 2,15*	11,2 $\pm$ 0,60	12,5 $\pm$ 1,07*	35,7 $\pm$ 2,50	30,8 $\pm$ 2,93*	32,0 $\pm$ 0,00	32,0 $\pm$ 0,00
63	35,2 $\pm$ 2,64	36,7 $\pm$ 5,20*	11,5 $\pm$ 0,94	13,3 $\pm$ 1,47*	11,3 $\pm$ 0,83	12,4 $\pm$ 0,73*	30,5 $\pm$ 0,55	29,0 $\pm$ 1,79	32,0 $\pm$ 0,00	32,0 $\pm$ 0,00
Valores de referência ^c	24 – 50		8 – 16		8 – 16		23 – 48		31 – 38	

^a Volume corpuscular médio; ^b Concentração de hemoglobina corpuscular média; ^c Kramer (2000); * Diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo controle (análise de regressão por modelo misto – PROC MIXED SAS).

Tabela 10 - Leucograma de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Dia experimental	Leucócitos totais (/µL)		Neutrófilos (/µL)		Linfócitos (/µL)		Monócitos (/µL)		Eosinófilos (/µL)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
0	8633,3± 1423,6	9416,7 ± 932,6	4324,5± 1216,3	4257,3 ± 583,4	3340,7± 648,5	4034,5 ± 723,6	599,3± 136,4	564,0 ± 160,9	400,8± 382,7	602,3 ± 340,2
7	7816,7 ± 3194,0	8816,7 ± 1777,0	2909,5 ± 1108,9	3196,3 ± 1372,8	3941,8 ± 1180,4	5081,0± 971,8	243,7 ± 90,3	242,8 ± 121,6	1228,3 ± 1454,6	296,5 ± 304,4*
14	6350,0± 2023,6	8850,0± 2186,1*	2208,7 ± 1086,6	3412,7 ± 1232,1	3123,3 ± 755,1	4474,5 ± 1191,9*	324,2 ± 233,8	279,5 ± 115,9	695,3 ± 406,8	683,3 ± 538,4
21	7750,0± 973,1	8333,3 ± 995,3	2294,0± 598,6	3191,3 ± 444,8	4380,3 ± 565,1	4605,3 ± 984,8	276,2 ± 178,0	342,7 ± 155,5	799,5 ± 698,8	194,0± 146,9*
28	6800,0± 2759,7	8566,7 ± 2457,4	2237,7 ± 1031,2	3072,3 ± 732,6	3854,0± 1346,4	4703,7 ± 1936,8	215,7 ± 129,6	227,0± 53,4	492,7 ± 406,2	563,7 ± 521,9
35	10366,7 ± 1943,9	10150,0± 2962,3	5342,3 ± 1208,9	4580,5 ± 1799,6	3698,2 ± 914,6	4628,3 ± 2044,9	595,2 ± 296,1	429,2 ± 243,1	731,0± 466,0	434,0± 270,8
42	7033,3 ± 814,0	11200± 1257,0*	2756,0± 231,7	4970,2 ± 1213*	3311,0± 961,7	5183,2 ± 1251,0*	483,8 ± 337,4	412,0± 148,4	482,5 ± 186,1	634,7 ± 563,4
49	7583,3 ± 2396,2	7116,7 ± 2089,4	3638,3 ± 1443,9	3505,8 ± 1203,8	3013,2 ± 1430,8	3031,0± 838,5	249,7 ± 99,7	162,5 ± 111,7	598,8 ± 210,7	418,2 ± 321,4
56	7750,0± 2086,9	8400,0± 1100,9	3171,3 ± 1105,1	3132,0± 819,3	3626,2 ± 1169,0	4436,7± 698,6	209,2 ± 99,6	311,2 ± 294,2	726,2 ± 501,4	520,2 ± 188,9
63	7750,0± 1585,9	9183,3 ± 556,5	3831,2 ± 1774,6	4406,8 ± 868,5	3179,5 ± 809,5	3991,3± 1041,6	281,7 ± 115,3	448,3 ± 183,2	457,7 ± 53,8	336,8 ± 184,1
Valores de referência ^a	4000 – 12000		400 – 6000		1600 – 9000		0 – 750		50 – 650	

^aKramer (2000); * Diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo controle (análise de regressão por modelo misto – PROC MIXED SAS).

Tabela 11 - Bioquímica sérica de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Dia experimental	Proteínas totais (g/dL)		Albumina (g/dL)		Globulinas (g/dL)		Relação A/G		ALT ^a (U/L)		AST ^b (U/L)		FA ^c (U/L)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
0	7,14±0,29	6,73±0,27	3,28±0,29	3,38±0,22	3,86±0,47	3,35±0,43*	0,86±0,15	1,03±0,19	20,8±3,76	23,3±5,32	118,8±52,3	103,2±16,3	630,5±183,2	653,7±148,1
7	6,47±0,27	6,26±0,30	3,35±0,36	3,77±0,32*	3,12±0,31	2,49±0,46*	1,09±0,20	1,59±0,41*	20,2±4,79	25,5±6,35	103,2±26,9	105,7±18,2	607,3±189,3	584,8±111,3
14	6,43±0,27	6,35±0,35	3,22±0,37	3,42±0,28	3,21±0,48	2,93±0,57	1,03±0,26	1,21±0,30	20,7±4,50	27,3±5,57	101,3±14,5	111,3±12,4	558,3±203,4	426,7±61,1
21	6,57±0,45	6,42±0,46	3,32±0,29	3,58±0,13	3,27±0,62	2,84±0,44	1,05±0,28	1,29±0,24*	20,3±6,71	23,7±8,04	118,3±36,3	114,2±12,2	561,7±194,9	437,8±101,3
28	6,66±0,23	6,42±0,19	3,55±0,19	3,70±0,22	3,11±0,28	2,72±0,32	1,15±0,17	1,38±0,24	19,8±5,88	25,8±4,49	101,0±11,3	108,5±16,0	602,7±240,6	529,0±146,8
35	6,68±0,28	6,69±0,41	2,42±0,26	2,55±0,1	4,26±0,33	4,14±0,45	0,57±0,09	0,62±0,09	27,2±14,6	23,5±7,40	168,8±134,2	102±35,4*	617,7±227,5	530,5±165,7
42	6,75±0,50	6,37±0,43	2,68±0,27	2,73±0,16	4,07±0,39	3,54±0,59*	0,66±0,09	0,79±0,17	30,7±8,71	44,3±16,3*	117,0±46,0	170,8±41,2*	530,3±206,6	489,7±140,0
49	6,72±0,34	6,77±0,32	3,25±0,37	3,55±0,14	3,45±0,28	3,22±0,29	0,95±0,16	1,11±0,11	20,2±5,34	24,5±6,12	105,3±7,10	134,3±19,0	461,0±151,8	455,3±96,1
56	6,67±0,46	6,98±0,48	3,23±0,43	3,43±0,25	3,27±0,48	3,55±0,31	1,01±0,24	0,97±0,11	20,8±2,48	23,2±7,14	110,7±12,0	128,3±16,3	471,3±211,2	467,5±105,6
63	7,00±0,45	7,12±0,22	2,77±0,40	3,13±0,18*	4,23±0,42	3,98±0,39	0,65±0,14	0,79±0,13	18,0±6,03	29,7±8,78*	106,7±9,9	143,7±40,8	440,7±192,4	435,3±66,5
Valores de referência ^d	6,0 – 7,9		2,3 – 3		3,5 – 5,7		4,2 – 7,6		26 – 34		60 – 280		68 – 387	

^aAlanina aminotransferase; ^b Aspartatoaminotransferase; ^cFosfatase alcalina; ^dKaneko et al. (2008); * Diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo controle (análise de regressão por modelo misto – PROC MIXED SAS).

Os principais tipos celulares encontrados nos exames citológicos vaginais estão apresentados na Tabela 12. Os valores dos tipos celulares apresentaram influência significantes ($p < 0,05$) do tempo experimental em todos os tipos celulares; do tratamento nas células basais, intermediárias, superficiais e neutrófilos; e interação tempo-tratamento nas células intermediárias e neutrófilos. O grupo tratamento apresentou reduções significativas ocasionais na quantidade de células basais (dias 7, 17, 22 e 51), parabasais (dias 2, 4 e 35), intermediárias (dias 2 e 6) e neutrófilos (dia 12); e aumento significativo nas células superficiais (dias 2, 6 e 59) e neutrófilos (dias 5, 7, 9, 11 e 28) ($p < 0,05$). Assim, o gossipol presente na torta de algodão não promoveu interferência direta nos diferentes tipos celulares da mucosa vaginal de ovelhas.

A citologia vaginal é considerada importante ferramenta para avaliação e determinação dos ciclos estrais, principalmente em roedores (GOLDMAN, MURR, COOPER, 2007; BYERS et al., 2012). Entretanto, em ruminantes, existem resultados divergentes propiciando interpretações equivocadas, já que nestes animais é constante a presença de células epiteliais e leucócitos durante todo o ciclo reprodutivo. Ainda, observa-se que a quantificação dos tipos celulares apresenta resultados semelhantes entre as diferentes categorias de células, dificultando ainda mais a determinação do estágio do ciclo estral (OLA; SANNI; EGBUNIKE, 2006), ocorrendo melhora da acurácia quando é associada a avaliação morfométrica (OVANDO et al., 2013). Diante dos resultados do presente estudo, a avaliação da citologia vaginal não foi eficaz para o monitoramento do ciclo estral em ovelhas.

Tabela 12 - Tipos celulares (em %) encontrados no exame de citologia vaginal de ovelhas alimentadas com ração contendo 0 (controle) ou 40% de torta de algodão. Os resultados estão expressos em médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

Dia	Basal		Parabasal		Intermediária		Superficial		Neutrófilos	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
0	0,33±0,52	0±0	18,5±18,1	8,16±9,98	56,9±15,6	56,9±21,9	24,24±9,19	34,93±25,06	10 ±8,69	14,7±15,5
1	0,17±0,41	0,66±1,02	11,3±7,55	5,64±6,99	71,8±5,19	61,8±18,9	16,67±9,22	31,95±22,59	0,33±0,82	3,17±5,04
2	0±0	0,17±0,41	17,3±11,5	1,83±1,17*	63,8±16,5	44 ±26,9*	18,83±23,47	54 ±27,44*	11,5±24,3	3,67±4,41
3	0,50±0,55	0±0	14,0±11,9	4,50±6,12	58,7±11,2	66,2±18,5	26,8±18,35	29,33±21,08	5,5±6,69	5,17±6,85
4	0,67±0,52	0,17±0,41	26,7±20,9	12,2±10,7*	62,7±20,4	62,7±19,1	10 ±6,69	25 ±19,61	44,5±100,3	78±88,9
5	0,83±1,33	0,17±0,41	10,3±13,9	6,00±5,10	78,3±13,3	60,0±18,7	10,5±11,34	33,83±23,39	8 ±13,1	68,5±118,4*
6	0,40±0,89	0,33±0,82	7,80±5,45	9,00±8,76	81,2±7,85	53,8±13,6*	10,6±5,32	36,83±18,27*	3,6±8,05	49,8±83,5
7	2,17±2,40	1,00±1,10*	9,83±11,4	13,8±14,4	64,3±14,4	62,7±10,3	23,67±15,16	22,5±10,01	22,5±15,9	88,2±74,7*
8	0,17±0,41	0±0	8,17±9,77	7,38±9,83	52,3±15,2	58,3±11,1	39,33±24,86	34,32±15,18	18,5±20,6	59,2±52
9	0±0	0,17±0,41	8,17±11,9	5,67±5,92	59,7±20,1	46,0±17,8	32,17±23,71	48,17±22,82	6,17±4,71	72±86,9*
10	0±0	0±0	7,67±8,55	5,00±7,77	49,5±15,6	34,2±12,7	42,83±19,87	60,83±17,21	42,8±49	65,7±65,4
11	0±0	0±0	6,00±7,40	3,83±9,39	56,3±23,6	43,2±14,2	37,67±26,47	53 ±22,36	13,5±13,6	197±351,7*
12	0±0	0±0	0,67±1,03	4,00±9,80	45,0±12,9	38,8±13,6	54,33±13,46	57,17±22,45	71,7±72,3	19,3±13,7*
13	0,17±0,41	0±0	2,67±5,13	8,50±20,3	41,5±24,9	29,2±14,9	55,67±28,37	62,33±32,13	39,8±42,8	14,8±11,5
14	0±0	0±0	1,83±3,54	1,33±1,75	37,5±18,9	39,5±21,0	60,67±21,46	59,17±22,61	11,7±11,7	8,83±10,6
15	0±0	0±0	1,17±1,83	1,00±2,00	53,0±22,1	40,8±18,7	45,83±23,38	58,2±19,97	15,0±18,2	16,7±10,5
16	0±0	0±0	2,83±6,94	0,83±2,04	39,8±24,6	43,7±23,0	57,33±29,68	55,5±24,58	9 ±14,8	17,3±31,3
17	2,33±5,72	0±0*	8,00±19,6	0,17±0,41	39,0±20,2	46,8±24,4	50,67±32,02	53±24,73	9 ±14	13,8±4,36
18	0±0	0±0	4,17±10,2	4,83±11,8	42,5±16,3	43,2±15,9	53,33±21,08	52±18,57	32,8±34,3	30±51,5
19	0,17±0,41	1,00±2,45	4,67±11,4	5,17±12,7	41,3±15,7	41,0±12,8	53,83±24,53	52,83±20,91	12,3±10,5	36,2±50
20	0,33±0,82	0±0	3,67±8,98	0±0	39,5±13,7	38,3±13,6	56,5±21,68	61,83±13,63	12,3±10,4	11,5±8,8
21	0,17±0,41	0±0	4,67±11,43	0±0	41,7±9,56	39,8±16,2	53,5±18,12	60,17±16,23	6,83±8,08	16,3±13

* Diferença significativa ($p < 0,05$) com grupo controle (análise de modelo misto PROC MIXED do SAS).

Tabela 12 - Continuação (Dias 22 a 44).

Dia	Basal		Parabasal		Intermediária		Superficial		Neutrófilos	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
22	1,50±3,67	0±0*	9,00±22,1	3,50±7,20	31,5±10,9	35,2±19,5	58 ±26,31	61,33±24,47	7,33±6,5	15,8±5,81
23	0±0	0±0	1,50±1,97	2,50±6,12	56,0±11,8	38,8±10,5	42,5±13,59	58,67±14,21	12 ±7,21	12,8±3,25
24	0±0	0±0	0±0	2,33±5,72	49,5±5,39	46,5±8,12	50,5±5,39	51,17±9,2	11 ±7,51	20,3±9,52
25	0±0	0±0	2,17±5,31	1,33±3,27	44,7±8,91	42,0±15,7	53,17±11,41	56,67±17,07	12,7±4,5	15,2±3,92
26	0±0	0±0	0±0	3,00±6,42	54,8±16,3	39,7±17,9	45,17±16,29	57,33±22,69	33,5±52,9	24,2±10,1
27	0±0	0±0	0±0	2,83±5,23	56,4±16,8	40,3±18,7	43,59±16,79	56,83±22,85	23,5±20,6	24 ±9,34
28	0±0	0±0	1,67±4,08	1,17±2,40	52,3±13,3	43,0±16,3	46 ±16,01	55,83±17,86	13,3±10,3	104,8±158,9*
30	0±0	0,17±0,41	7,50±12,7	10,8±18,3	59,2±12,2	47,3±8,07	33,33±18,44	41,67±20,37	23,2±56,7	29,8±73,1
31	0,17±0,41	0±0	9,17±15,6	6,43±14,43	72,0±9,30	59,1±13,4	18,67±12,8	34,45±19,82	6,5±15	5,29±14
32	0±0	0±0	11,3±16,1	4,83±7,81	54,2±12,3	56,8±22,7	34,5±24,83	38,33±26,55	0±0	11,3±16,3
33	0±0	0±0	2,67±3,78	8,00±11,0	67,1±20,7	52,7±17,0	30,21±22,87	39,33±25,63	2,50±6,12	10 ±7,75
34	0±0	0±0	0,83±2,04	0,16±0,39	52,0±21,5	53,6±16,1	47,17±22,44	46,24±16,01	3,33±8,16	17,5±15
35	0±0	0±0	16,3±19,1	0,33±0,82*	48,2±20,7	59,2±16,2	35,5±34,95	40,5±16,84	14,0±16,7	13,7±3,88
36	0±0	0±0	9,33±14,1	3,83±6,74	57,8±22,6	49,5±18,2	32,83±31,17	46,67±23,15	10,5±8,36	16,3±9,52
37	0±0	0±0	12,0±11,6	2,83±6,94	61,7±17,1	63,4±19,7	26,33±25,91	33,75±21,6	7,50±7,42	10 ±1,55
38	0,67±1,21	0±0	11,2±17,4	3,50±5,43	56,7±11,4	66,5±8,31	31,5±26,1	30 ±12,13	15,7±16,7	6,17±7,49
39	0±0	0±0	0±0	0,17±0,41	59,0±22,0	67,3±7,42	41 ±21,98	32,5±7,56	2,67±4,55	0±0
40	0±0	0±0	1,17±2,04	0±0	68,0±7,54	66,5±8,87	30,83±9,15	33,5±8,87	4,67±2,88	2,83±3,13
41	0±0	0±0	1,83±3,60	0,17±0,41	56,5±13,0	51,7±12,7	41,67±15,69	48,17±12,7	3,33±6,8	7,33±6,38
42	0±0	0±0	3,67±6,22	0±0	64,2±19,2	54,8±15,2	32,17±22,63	45,17±15,17	8,33±4,23	0±0
43	0±0	0±0	0±0	2,83±6,94	59,2±11,4	48,2±16,7	40,82±11,64	49 ±22,72	1,83±4,49	0±0
44	0±0	0±0	1,33±2,16	12,0±27,9	64,7±7,31	54,2±13,3	34 ±6,69	33,83±18,17	8,17±4,54	6,33±2,88

* Diferença significativa ($p < 0,05$) com grupo controle (análise de modelo misto PROC MIXED do SAS).

Tabela 12 - Continuação (Dias 45 a 62).

Dia	Basal		Parabasal		Intermediária		Superficial		Neutrófilos	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
45	0±0	0±0	1,83±2,79	0,16±0,39	71,7±8,21	60,6±11,1	26,5±10,15	39,25±11,28	9,83±4,83	7,17±2,99
46	0±0	0±0	5,83±11,2	6,00±14,1	70,8±5,49	62,3±6,31	23,33±11,41	31,67±14,4	5,83±6,74	16,7±25,3
47	0±0	0±0	1,33±3,27	3,83±9,39	46,0±12,5	59,0±14,9	52,67±14,79	37,17±20,96	14,7±14,7	23,2±20,7
48	0±0	0±0	3,67±4,84	4,67±7,89	59,2±15,6	55,8±13,0	37,17±17,43	39,5±18,57	11 ±9,38	0±0
49	0±0	0±0	7,67±12,9	11,6±21,4	56,2±13,4	48,9±16,3	36,17±22,14	39,52±26,75	13,7±9,71	9,67±5,24
50	0,17±0,41	0±0	6,17±9,04	2,00±3,10	53,0±9,65	55,1±18,1	40,67±14,45	42,9±18,74	8,33±3,78	7,50±2,26
51	1,17±1,83	0±0*	7,17±8,50	1,67±2,73	58,8±11,7	65,5±21,2	32,83±18,88	32,83±22,5	5,17±3,31	5,83±2,64
52	0,33±0,82	0±0	5,67±8,45	1,00±1,67	66,2±9,43	65,5±9,99	27,83±7,73	33,5±10,65	6 ±2,76	3 ±2
53	0±0	0±0	1,33±1,97	1,50±2,35	68,8±8,42	57,9±20,8	29,83±8,11	40,58±21,17	4,83±4,12	8,33±7,81
54	0±0	0±0	2,33±5,72	2,00±2,76	68,8±6,49	63,3±12,6	28,83±6,05	34,67±13,17	6,33±7,34	4,83±8,54
55	0±0	0±0	10,8±11,7	11,5±18,8	67,2±9,33	51,2±19,4	22±14,78	37,33±29,98	11,3±14,8	0±0
56	0±0	0±0	7,17±7,86	5,33±7,94	66,5±13,7	56,2±17,9	26,33±16,88	38,5±23,63	8,33±6,19	0±0
57	0±0	0±0	12,2±17,0	5,50±8,57*	54,7±17,7	52,4±21,5	33,17±25,64	42,11±26,86	6,17±7,7	0±0
58	0±0	0±0	24,3±25,3	5,67±8,87	51,5±10,6	51,0±17,6	24,17±21,8	43,33±24,82	0±0	3,17±5
59	0±0	0±0	9,83±7,00	5,17±8,01	69,2±8,91	41,7±23,2*	21 ±13,83	53,27±30,99*	2,83±6,94	1,67±4,08
60	0±0	0±0	8,00±13,6	9,19±12,6	43,3±18,9	42,9±14,0	48,71±27,69	47,92±26,1	0±0	0±0
61	0±0	0±0	2,50±3,02	8,50±8,12	41,5±15,4	47,2±24,7	56 ±17,65	44,33±32,34	0±0	12 ±14,5
62	0±0	0±0	0,83±2,04	2,17±3,06	45,3±15,4	53,3±17,0	53,83±17,3	44,51±19	0±0	1,67±4,08

* Diferença significativa ($p < 0,05$) com grupo controle (análise de modelo misto PROC MIXED do SAS).

Após a ovariectomia bilateral, não foram observadas diferenças significantes nas medidas e pesos dos ovários entre os grupos (Tabela 13). Entretanto, microscopicamente, o tratamento com gossipol foi responsável por redução significativa no número de folículos ovarianos normais e aumento significativo no número de folículos atrésicos ($p < 0,01$), em todas as fases de desenvolvimento (Tabelas 14 e 15; Figura 3). Em média, os ovários de ovelhas do grupo controle tiveram 65,1% de folículos viáveis e 34,9% de folículos atrésicos, enquanto as ovelhas tratadas com gossipol apresentaram taxas de folículos normais e atrésicos de 20,6% e 79,4%, respectivamente. Estes dados são semelhantes aos encontrados em ratas tratadas com gossipol (25mg/kg/dia, via subcutânea), que promoveu redução significativa da população total de folículos ovarianos com aumento da frequência de folículos atrésicos (GADELHA et al., 2014b).

Tabela 13 - Medidas (cm) e peso (g) dos ovários de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Parâmetro	Controle	Tratado	<i>p</i>
Peso (g)	1,02 ± 0,38	0,82 ± 0,38	n.s.
Largura (cm)	0,61 ± 0,18	0,54 ± 0,16	n.s.
Comprimento (cm)	1,00 ± 0,26	0,91 ± 0,24	n.s.

Teste *t* de Student ($p < 0,05$). n.s.: não significante.

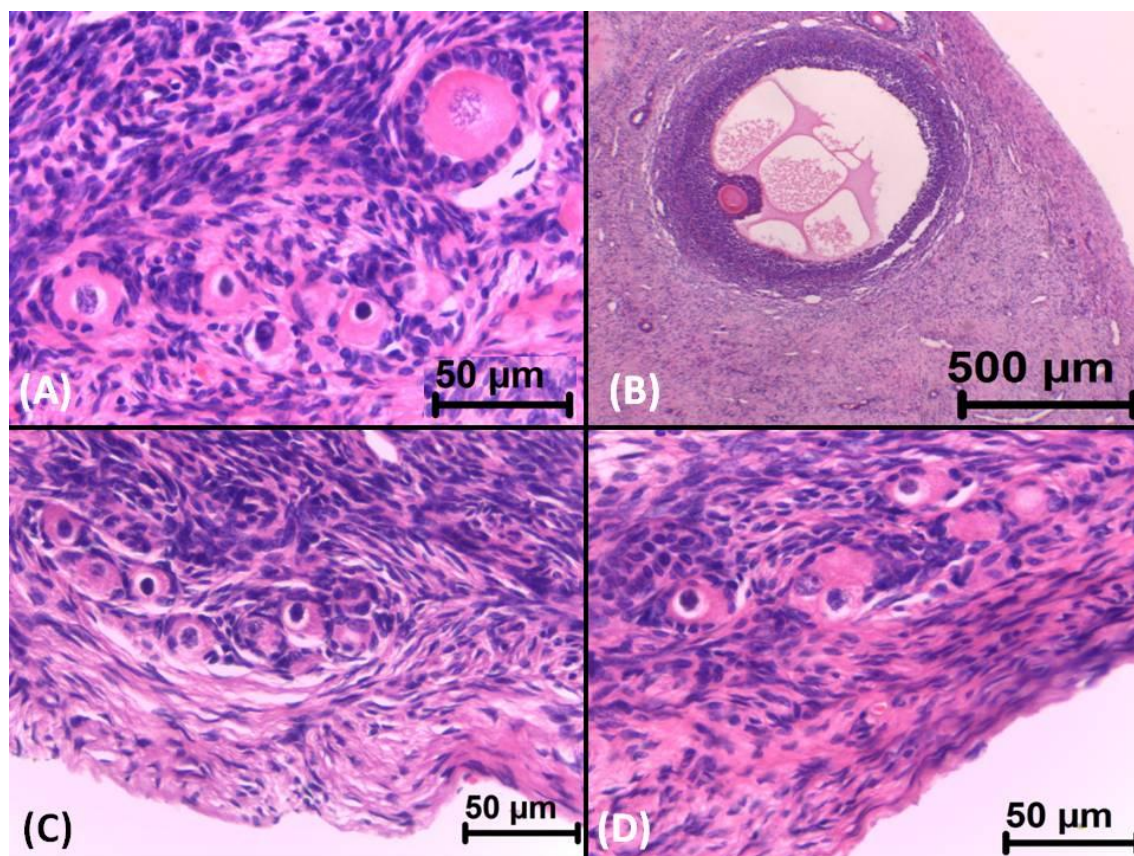


Figura 3: Folículos ovarianos de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. (A) Folículos primordiais e (B) antral normais (grupo controle); (C) e (D) Folículos primordiais atresícos com retração oocitária, picnose nuclear e desorganização de células da granulosa (grupo tratamento). Coloração Hematoxilina e Eosina.

Tabela 14 - Número de folículos ovarianos de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão. Resultados estão expressos em médias e desvio padrão.

Tipo de Folículo		Controle	Tratado
Primordial	viável	46,8±17,5	12,3±4,8*
	atrésico	23,3±16,5	46,7±16,5*
	todos	70,2±30,1	59±18,3
Transição	viável	185,2±35,3	67,5±14*
	atrésico	111,3±16,7	271,2±28,1*
	todos	296,5±35,5	338,7±25,5
Primário	viável	32,7±12,2	5,33±3,2*
	atrésico	9,83±5,60	12,2±6,4
	todos	42,5±16,1	17,5±6,92*
Secundário	viável	3,33±1,63	0,33±0,52*
	atrésico	0,83±1,6	2,17±2,23
	todos	4,17±1,94	2,50±2,43
Antral	viável	4±2,9	1±0,63*
	atrésico	0,67±0,52	1,33±1,21
	todos	4,67±2,94	2,33±1,75
Total	viável	272±32,1	86,5±19,1*
	atrésico	146±27,1	333,5±22,8*
	todos	418±6,36	420±8,32

* Diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo controle (teste de Mann-Whitney)

Tabela 15 - Estimativa das populações de folículos ovarianos (%) de ovelhas submetidas à alimentação com ração farelada com 0 (grupo controle) e 40% (grupo tratamento) de torta de algodão.

Tipo de Folículo		Controle	Tratado	p^a
Primordial				
	viável	66,7 (281/421)	20,9 (74/354)	<0,0001
	atrésico	33,3 (140/421)	79,1 (280/354)	
Transição				
	viável	62,5 (1111/1779)	19,9 (405/2032)	<0,0001
	atrésico	37,5 (668/1779)	80,1 (1627/2032)	
Primário				
	viável	76,9 (196/255)	30,5 (32/105)	<0,0001
	atrésico	23,1 (59/255)	69,5 (73/105)	
Secundário				
	viável	80 (20/25)	13,3 (2/15)	<0,0001
	atrésico	20 (2/25)	86,7 (13/15)	
Antral				
	viável	85,7 (24/28)	42,9 (6/14)	<0,001
	atrésico	14,3 (2/28)	57,1 (8/14)	
Total				
	viável	65,1 (1632/2508)	20,6 (519/2520)	<0,0001
	atrésico	34,9 (876/2508)	79,4 (2001/2520)	

^a Teste exato de Fisher

O mecanismo pelo qual o gossipol promove os danos aos folículos ovarianos ainda não está determinado. Em embriões, assim como nas espermatogônias, o provável mecanismo de embriotoxicidade do gossipol ocorre por meio da ação citotóxica direta (LIN et al., 1985; RANDEL et al., 1992). Este efeito citotóxico pode ser promovido por meio da geração de espécies reativas do oxigênio, induzindo o estresse oxidativo (FORNÉS et al., 1993); interrupção da comunicação intercelular (HERVÉ et al., 1996); indução de apoptose (MOON et al., 2008); ou interferência no transporte iônico nas membranas, aumentando os níveis de cálcio intracelular (CHENG et al., 2003). Em adição ao efeito citotóxico, o gossipol promove a diminuição da esteroidogênese (GADELHA et al., 2014a), responsável por redução dos níveis séricos de progesterona, além da tiroxina, em ratas (GADELHA et al., 2014b). Por outro lado, alterações nas concentrações de progesterona não foram observadas

nas ovelhas deste estudo. Deste modo, é possível sustentar a hipótese de que o efeito deletério do gossipol sobre folículos ovarianos ovinos *in vivo* possa ser decorrente, principalmente, dos efeitos citotóxicos.

Concluindo, o gossipol presente na torta de algodão é responsável pela redução na viabilidade e consequente aumento na atresia dos folículos ovarianos das ovelhas. Este efeito foi observado em animais sem qualquer manifestação clínica, interferência no ganho em peso, alteração hematológica, bioquímica e concentração de progesterona, o que reforça a hipótese de ação direta do gossipol sobre os folículos ovarianos.

3.5 REFERÊNCIAS

BARRAZA, M.L.; COPPOCK, C.E.; BROOKS, K.N.; WILKS, D.L.; SAUNDERS, R.G.; LATIMER Jr., G.W. Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.74, n.10, p.3457-3467, 1991.

BRAGA, A.P.; MACIEL, M.V.; GUERRA, D.G.F.; MAIA, I.S.A.S.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Extruded-expelled cottonseed meal decreases lymphocyte counts in male sheep. **Rev. Med. Vet.**, v.163, n.3, p.147-152, 2012.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; NASS-ARDEN, L. Effect of gossypol-acetic acid on calcium transport and ATPase activity in plasma membranes from ram and bull spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v.7, n.5, p.439-447, 1984.

BROCAS, C.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; McDOWELL, L.R.; CALHOUN, M.C.; STAPLES, C.R.; WILKINSON, N.S.; BONING, A.J.; CHENOWETH, P.J.; HANSEN, P.J. Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes and embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, n.4, p.901-907, 1997.

BYERS, S.L.; WILES, M.V.; DUNN, S.L.; TAFT, R.A. Mouse estrous cycle identification tool and images. **Plos One**, v.7, n.4, 5p. 2012.

CHEEKE, P.R. **Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants**. 2th ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

CHENG, J.S.; LO, Y.K.; YEH, J.H.; CHENG, H.H.; LIU, C.P.; CHEN, W.C.; JAN, C.R. Effect of gossypol on intracellular Ca^{2+} regulation in human hepatoma cells. **Chin. J. Physiol.**, v.46, n.3, p. 117-122, 2003.

DEORAS, D.P.; YOUNG-CURTIS, P.; DALVI, R.R.; TIPPETT, F.E. Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats. **Vet. Res. Commun.**, v.21, n.5, p.317-323, 1997.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. **Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology**. Iowa State Univ. Press, Ames. 1994.

EL-MOKADEM, M.Y.; TAHA, T.A.; SAMAK, M.A.; YASSEN, A.M. Counteracting the hematological toxicity of gossypol by using selenium supplementation in rams. **Small Rum. Res.**, v.114, n.1, p.86-89, 2013.

FTHENAKIS, G.C.; LEONTIDES, L.; SKOUFOS, J.; TAITZOGLU, I.A.; TZORA, A. Case report: high prevalence rate of ovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption. **Small Rum. Res.**, v.52, n.1-2, p.185-189, 2004.

FONSECA, N.B.S.; GADELHA, I. C. N.; OLORIS, S. C. S.; SOTO-BLANCO, B. Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.56, p.149-153, 2013.

FORNÉS, M.W.; BARBIERI, A.M.; BURGOS, M.H. Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.195, n.3, p.1289-1293, 1993.

GADELHA, I.C.N.; RANGEL, A.H.N.; SILVA, A.R.; SOTO-BLANCO, B. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Vet. Bras.**, v.5, n.2, p.129-135, 2011.

GADELHA, I.C.N.; FONSECA, N.B.S.; OLORIS, S.C.S.; SOTO-BLANCO, B. Gossypol toxicity from cottonseed products. **Scient. World J.**, v.2014, Article ID 231635, 11p., 2014a.

GADELHA, I.C.N.; MACEDO, M.F.; OLORIS, S.C.S.; MELO, M.M.; SOTO-BLANCO, B. Gossypol promotes degeneration of ovarian follicles in rats. **Scient. World J.**, v.2014, Article ID 986184, 7p., 2014b.

GAMBILL, M.D.; HUMPHREY, W.D. Effects of diets containing gossypol on ovarian histology, function and fertility in prepubertal beef heifers. **Theriogenology**, v.40, n.3, p.585-593, 1993.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.**, v.80, n.2, p.84-97, 2007.

GRAY, M.L.; RANDEL, R.D.; GREENE, L.W.; WILLIAMS, G.L. Metabolic homeostasis and reproductive endocrine function in post pubertal beef heifers fed varying levels of dietary free gossypol. **J. Anim. Sci.**, v.68, Suppl. 1, p.465, 1990.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; JOUSAN, F.D.; SOTO, P.; HANSEN, P.J. Timing of inhibitory actions of gossypol on cultured bovine embryos. **J. Dairy Sci.**, v.88, n.3, p.922-928, 2005.

HERVÉ, J.C.; PLUCIENNIK, F.; BASTIDE, B.; CRONIER, L.; VERRECCHIA, F.; MALASSINÉ, A.; JOFFRE, M.; DÉLÈZE, J. Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v.313, n.3, p.243-255, 1996.

HOLMBERG, C.A.; WEAVER, L.D.; GUTERBOCK, W.M.; GENES, J.; MONTGOMERY, P. Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cotton seed meal diet. **Vet. Pathol.**, v.25, n.2, p.147-153, 1988.

HRON, R.J.; KUK, M.S.; ABRAHAM, G. Determination of free and total gossypol by high performance liquid chromatography. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.67, n.3, p.182-187, 1990.

HRON, R.; KIM, H.; CALHOUN, M.; FISHER, G. Determination of (+)-, (-)- and total gossypol in cottonseed by high performance liquid chromatography. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.76, n.11, p.1351-1355, 1999.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea and Febinger, Philadelphia. 1993, 417p.

KRAMER, J.W. Normal hematology of cattle, sheep and goats. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia. p.1075-1084, 2000.

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W. BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. San Diego, Academic Press, 2008. 916p.

LIMA, P.M.T. **Parâmetros hematológicos, bioquímicos, ganho em peso e emissão de metano de ovinos Santa Inês alimentados com coprodutos do algodão**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 63p. Dissertação de Mestrado.

LIN, Y.C.; FUKAYA, T.; RIKIHISA, Y.; WALTON, A. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life Sci.**, v.37, n.1, p.39-47, 1985.

LIN, Y. C.; COSKUN, S.; SANBUISSHO, A. Effects of *in vitro* bovine oocyte maturation and steroidogenesis in bovine granulosa cells. **Theriogenology**, v.41, n.8, p.1601-1611, 1994.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **J. Ani. Sci.**, v.76, n.4, p.12-16, 1998.

MANABE, S.; NUBER, D.C.; LIN, Y.C. Zone-specific hepatotoxicity of gossypol in perfused rat liver. **Toxicon**, v.29, n.6, p.787-790, 1991.

MENA, H.; SANTOS, J.E.P.; HUBER, J.T.; TARAZON, M.; CALHOUN, M.C. The effects of varying gossypol intake from whole cottonseed and cottonseed meal on lactation and blood parameters in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.87, n.8, p.2506-2518, 2004.

MOON, D.O.; KIM, M.O.; LEE, J.D; KIM, G.Y. Gossypol suppresses NF-kB activity and NF-kB-related gene expression in human leukemia U937 cells. **Cancer Lett.**, v.264, n.2, p.192-200, 2008.

NAGALAKSHMI, D.; SASTRY, V.R.B.; AGRAWAL, D.K.; KATIYAR, R.C. Haematological and immunological response in lambs fed on raw and variously processed cottonseed meal. **Asian-Australian J. Anim. Sci.**, v.14, n.1, p.21-29, 2001.

OLA, S.I.; SANNI, W.A.; EGBUNIKE, G. Exfoliative vaginal cytology during the oestrous cycle of West African dwarf goats. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.46, n.1, p.87-95, 2006.

OVANDO, N.C.; TRUJILLO, A.O.; PÉREZ, F.I.F.; FLORES, V.A. Citología y análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas de pelo (*Ovis aries*). **Int. J. Morphol.**, v.31, n.3, p.888-893, 2013.

PATTANAIK, A.K.; SASTRY, V.R.B.; SINGH, D.K.; GOSWAMI, T.K.; MOHANTY, D.N. Effect of gossypol from cottonseed meal diets on some clinico-biochemical parameters and humoral immune response of crossbred calves fed barley or sorghum. **Asian-Australasian J. Anim. Sci.**, v.16, n.9, p.1291-1296, 2003.

PORTO, R.R.M.; CAVALCANTE, T.V.; DIAS, F.E.F.; ROCHA, J.M.N; SOUZA, J.A.T. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. **Ciênc. Ani. Bras.**, v.8, n.3, p.521-527, 2007.

RANDEL, R.D.; CHASE, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **J. Anim. Sci.**, v.70, n.5, p.1628-1638, 1992.

RISCO, C.A.; HOLMBERG, C.A.; KUTCHES. A. Effect of graded concentrations of gossypol on calf performance: toxicological and pathological considerations. **J. Dairy Sci.**, v.75, n.10, p.2787-2798, 1992.

RISCO, C.A.; ADAMS, A.L.; SEEBOHM, S.; THATCHER, M.J.; STAPLES, C.R.; VAN HORN, H.H.; McDOWELL, L.R.; CALHOUN, M.C.; THATCHER, W.W. Effects of gossypol from cottonseed on hematological responses and plasma α -tocopherol concentration of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.12, p.3395-3402, 2002.

RODRIGUES, M.C.; COELHO, M.C.O.C.; QUESSADA, A.M.; LIMA, D.A.S.D.; SOUZA, J.M.; CARVALHO, C.C.D. Ovariosalpingohisterectomia em cadelas: comparação entre a

técnica de tração uterina por via vaginal associada à celiotomia pelo flanco e a abordagem ventral mediana. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v.111, n.583-584, p.165-172, 2012.

SANTOS, J.E.; VILLASENOR, M.; ROBINSON, P.H.; DEPETERS, E.J.; HOLMBERG, C.A. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: plasma gossypol, health and reproductive performance. **J. Dairy Sci.**, v.86, n.3, p.892-905, 2003.

SASA, A.; TESTON, D.C.; RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no Estado de São Paulo. **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.3, p.1150-1156, 2002.

SKUTCHES, C.L.; HERMAN, D.L.; SMITH, F.H. The effect of intra-venous gossypol injection on iron utilization in swine. **J. Nutr.**, v.103, p.851-855, 1973.

SOLAIMAN, S.G.; GURUNG, N.K.; McCRARY, Q.; GOYAL, H.; McELHENNEY, W.H. Feeding performance and blood parameters of male goat kids fed EasiFlo cottonseed. **Small Anim. Res.**, v.81, p.137-145, 2009.

SIJUN, D.; PAWLAK, A.; SUSZKO, A.; SZCZYPKA, M.; HUI, Y. Effects of gossypol acetic acid on cellular and humoral immune response in non-immunized and SRBC-immunized mice. **Cent. Eur. J. Immunol.**, v.37, n.1, p.11-19, 2012.

SOTO-BLANCO, B. 2008. Gossipol e fatores anti-nutricionais da soja, p.531-545. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO NETO, J. (eds.) **Toxicologia Aplicada à Veterinária**. Manole, São Paulo.

UENO, H.; SAHNI, M.K.; SEGAL, S.J.; KOIDE, S.S. Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. **Contraception**, v.37, n.3, p.333-341, 1988.

VILLASEÑOR, M.; COSCIONI, A.C.; GALVÃO, K.N.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P. Gossypol disrupts embryo development in heifers. **J. Dairy Sci.**, v.91, n.8, p.3015-3024, 2008.

WOLFINGER, R.; CHANG, M. **Comparing the SAS® GLM and MIXED procedures for repeated measures**. Cary: SAS Institute Inc., 11p. 1996.

XU, W.; XU, L.; LU, H.; OU-YANG, D.; SHI, H.; DI, J.; HE, X. The immunosuppressive effect of gossypol in mice is mediated by inhibition of lymphocyte proliferation and by induction of cell apoptosis. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.30, n.5, p. 597-604, 2009.

ZHANG, W.J.; XU, Z.R.; PAN, X.L.; YAN, X.H.; ZHANG, Y.B.W.J.; XU, Z.R.; PAN, X.L.; YAN, X.H.; WANG, Y.B. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livest. Sci.**, v.111, n.1-2, p.1-9, 2007.