



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

IVANA CRISTINA NUNES GADELHA LELIS

**DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO GOSSIPOL SOBRE O CICLO ESTRAL,
A FOLICULOGÊNESE E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
PRECOCE DE ROEDORES E GALINHAS**

MOSSORÓ- RN
2015

IVANA CRISTINA NUNES GADELHA LELIS

**DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO GOSSIPOL SOBRE O CICLO ESTRAL,
A FOLICULOGÊNESE E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
PRECOCE DE ROEDORES E GALINHAS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-Árido (UFERSA), Campus de Mossoró,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto Blanco-UFMG
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira
Cordeiro - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2015

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

Lelis, Ivana Cristina Nunes Gadelha.

Determinação dos efeitos do gossipol sobre o ciclo estral, a foliculogênese e o desenvolvimento embrionário precoce de roedores e galinhas / Ivana Cristina Nunes Gadelha Lelis. - Mossoró, 2015. 132f: il.

1. algodão. 2. Gossypium spp. 3. Fator anti-nutritinal. I. Título

RN/UFERSA/BCOT/411
L541d

CDD 633.51

IVANA CRISTINA NUNES GADELHA LELIS

**DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO GOSSIPOL SOBRE O CICLO ESTRAL,
A FOLICULOGÊNESE E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
PRECOCE**

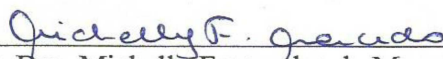
Tese apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-Arido –UFERSA, Campus de Mossoró,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor (a) em Ciência Animal.

APROVADA EM: 16 / 04 / 2015

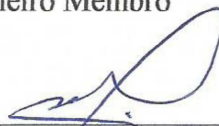
BANCA EXAMINADORA



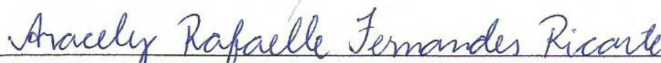
Prof. Dr. Benito Soto Blanco (UFMG)
Orientador



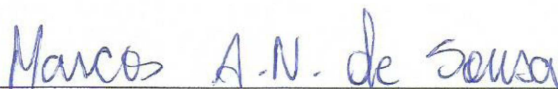
Profa. Dra. Michelly Fernandes de Macedo (UFERSA)
Primeiro Membro



Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas (UFCG)
Segundo Membro



Profa. Dra. Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte (UFERSA)
Terceiro Membro



Prof. Dr. Marcos Antônio Nóbrega de Souza (UFERSA)
Quarto Membro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

IVANA CRISTINA NUNES GADELHA LELIS – Nascida em Fortaleza-CE no dia 24 de Outubro de 1982, filha de Raimundo Ailton Gadelha e Jacinta Lúcia Nunes Gadelha, concluiu o ensino médio e fundamental no Colégio Christus de Fortaleza. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) EM 2007.2, onde realizou trabalhos de iniciação científica e estágios. Em Dezembro de 2010 foi selecionada em 1º lugar pelo Programa em Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA, onde desenvolveu pesquisas em Toxicologia Animal sob a orientação do Professor Doutor Benito Soto Blanco. No decorrer da pós-graduação atuou como colaboradora nas disciplinas de Farmacologia Geral e Animais Silvestres, disciplinas do curso de Medicina Veterinária da UFERSA. Foi bolsista CAPES por dois anos. Foi professora substituta de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, Ornitopatologia, Histologia e Embriologia Animal e Clínica Médica de Pequenos Animais. Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. Em março de 2013 defendeu a dissertação para a obtenção do título de mestre.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Leonardo Lelis de Macedo Costa, meu esposo, pelo companheirismo, pois está comigo em todos os momentos, tanto de alegria como de tristeza e também pela força e paciência que tem me dado.

Aos meus Pais, Jacinta Lúcia Nunes Gadelha e Raimundo Ailton Gadelha, Médicos Veterinários, por terem me educado, por acreditar em mim, por me dar força e oportunidades para trilhar o meu caminho.

Ao meu orientador, Benito Soto Blanco, por ter me aceitado como orientada, pelo aprendizado e pelas oportunidades de crescer profissionalmente. A sua esposa, professora Silvia Catarina Oloris, pela ajuda, agradeço por tudo que me ensinou.

Ao meu coorientador Luiz Augusto Vieira Cordeiro, pela confiança e por ter me acolhido em seu laboratório.

Ao professor Marcelo Barbosa, que além de ter me dado muitas dicas, me abriu as portas de seu laboratório. A professora Michelly Fernandes que fez parte deste projeto e, assim como ajudou bastante!

Ao professor Moacir Franco, por abrir as portas do seu laboratório para a confecção das lâminas histológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro proporcionado.

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

DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO GOSSIPOL SOBRE O CICLO ESTRAL, A FOLICULOGÊNESE E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE ROEDORES E GALINHAS

GADELHA, I.C.N. **Determinação dos efeitos do gossipol sobre o ciclo estral, a foliculogênese e o desenvolvimento embrionário precoce de roedores e galinhas.** 2015. 134f. Tese (Doutorado em Produção e Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2015.

RESUMO: Gossipol é um composto fenólico produzido pelas glândulas de pigmento presente nas raízes, caules, folhas, sementes e botões de flores do algodão (*Gossypium* spp). O farelo e a torta de algodão são subprodutos do algodão utilizados para a alimentação animal, pois são ricos em óleo e proteínas. No entanto, o gossipol limita a utilização do algodão na alimentação animal, pois altas concentrações desta substância podem ser responsáveis por sinais clínicos agudos de intoxicação, sendo o efeito tóxico mais comum é a redução na reprodução de machos e fêmeas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do gossipol no ciclo estral, na foliculogênese *in vivo* e *in vitro* e no desenvolvimento de embriões *in vitro* de roedores e galinhas. Para o primeiro experimento, foram utilizadas 24 ratas Wistar, distribuídas em dois grupos iguais: um grupo controle (injeção de solução salina, por via subcutânea) e o outro tratado com gossipol (25 mg/kg/dia, por via subcutânea) durante 15 dias. As ratas sofreram eutanásia após o último dia do tratamento para coleta de sangue e de fragmentos de ovários, útero e tireoide. Foi coletado sangue para análise hormonal por ELISA e os ovários foram coletados para estudo histológico para avaliação qualitativa e quantitativa dos folículos ovarianos. Para o segundo experimento, foram necessários 32 ovários de ratas e camundongas e quatro de galinhas. Os ovários das ratas e de camundongas, e fragmentos dos ovários de galinhas foram cultivadas em placas de 24 poços de cultura de células contendo 1 ml de meio de cultura específico. Foram testadas quatro concentrações de gossipol: 0 (controle), 5, 10 e 20 ug/mL. Todas as placas foram incubadas a 39 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas e sete dias. Após a incubação, os ovários foram fixados e processados para análise histológica. Para o terceiro experimento, fêmeas nulíparas de camundongos Balb-C foram superovuladas e em seguida, alocadas com machos. No dia seguinte, foi realizada a colheita de embriões na fase de 2-8 células. Foram realizadas lavagens sequenciais das tubas para remoção dos embriões com meio HTF modificado. Lotes de 5 – 8 embriões coletados e selecionados foram transferidos para novo meio de cultivo HTF sem HEPES suplementado com 10% de SFB. Posteriormente foram recolhidos e depositados em microgotas (30 µl) de meio suplementado em placas de 35x10 mm. Os embriões foram cultivados em meio sem a adição de gossipol (grupo controle) ou com concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml de gossipol, adicionadas em cada gota. Estas gotas foram imersas em óleo mineral e cultivadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, por 24 horas. Após o cultivo, os embriões foram corados para a detecção de membranas rompidas e de células em processo de morte celular. Pode-se observar que o gossipol promove degeneração de folículos ovarianos e embrioletalidade, e esta toxicidade ocorre por meio de ação direta do gossipol e não por algum produto de sua biotransformação.

Palavras-chave: algodão, *Gossypium*, fator Anti-nutricional

DETERMINATION OF GOSSYPOL EFFECTS ON THE ESTROUS CYCLE, FOLLICULOGENESIS AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT OF RODENT AND CHICKENS

GADELHA, I.C.N. **Determination of gossypol effects on the estrous cycle, folliculogenesis and early embryonic development of rodent and chickens. 134p.** Thesis (Master's degree In Animal Production and Health) - Federal Rural University of Semiarid, Mossoró – RN, Brazil, 2015.

ABSTRACT- Gossypol is a phenolic compound produced by pigment glands in cotton stems, leaves, seeds and flower buds (*Gossypium* spp). Cottonseed meal is a by-product of cotton that is used for animal feeding because it is rich in oil and proteins. However, gossypol toxicity limits cottonseed use in animal feed. High concentrations of free gossypol may be responsible for acute clinical signs of gossypol poisoning, the most common toxic effect is a reduction in reproduction of males and females. The objective of this study was to evaluate the effects of gossypol in the estrous cycle, folliculogenesis *in vivo* and *in vitro* and in developing embryos *in vitro* rodent and chickens. For the first experiment were used 24 Wistar rats divided into two groups: a control group (saline injection, subcutaneously) and the other treated with gossypol (25 mg/kg/day subcutaneously) for 15 days. The rats were euthanized after the last day of treatment for blood and fragments of ovaries, uterus and thyroid. Blood was collected for hormone analysis by ELISA and the ovaries were collected for histological study for qualitative and quantitative evaluation of ovarian follicles. For the second experiment, it took 32 ovaries of female rats and mice and four chickens. The ovaries of rats and mice, chickens and fragments ovary cells were grown in 24-well culture plates containing 1 ml of culture medium specific. We tested four concentrations of gossypol: 0 (control), 5, 10 and 20 µg / ml. All plates were incubated at 39 ° C and 5% CO₂ for 24 hours and seven days. After incubation, the ovaries were fixed and processed for histological analysis. For the third experiment, nulliparous female Balb-C mice were superovulated and then allocated to males. Next day, harvest embryos was performed in 2-8 cell stage. Sequential washes the tubes were performed to remove the embryos on modified HTF. Lots 5 - 8 are selected embryos collected and transferred to new culture HTF medium without HEPES supplemented with 10% FBS. Subsequently they were collected and deposited into microdroplets (30 µL) medium supplemented in 35x10 mm plates. The embryos were cultured in medium without addition of gossypol (control group) or with concentrations of 5, 10 and 20 µg / ml of gossypol added to each drop. These droplets were immersed in mineral oil and grown in a glasshouse with 5% CO₂ at 37 ° C for 24 hours. After the cultivation, the embryos were stained for the detection of ruptured membranes and cells in cell death. It can be seen that gossypol promotes degeneration of ovarian follicles and embryoletality and this toxicity occurs by direct action of gossypol and not a product of its biotransformation.

Keywords: cotton, *Gossypium*, anti-nutritional factor

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1- Estrutura química e fórmula estrutural do gossipol	16
--	----

CAPÍTULO 2:

Figura 1- Realização do lavado vaginal de rata.....	53
---	----

Figura 2 - Citologia de lavado vaginal de ratas em diferentes fases do ciclo estral. (A) Proestro, grande quantidade de célula basais e parabasais. (B) Estro, presença de células queratinizadas. (C) Metaestro, redução significativa na quantidade de células queratinizadas e início de infiltração leucocitária. (D) Diestro, grande quantidade de células leucocitárias.....	53
--	----

Figura 3- Coleta de sangue através da veia cava caudal para análise hormonal	54
--	----

Figura 4 - Ovários normais de ratas do grupo controle, mostrando folículos nas fases (A) primordial, (B) primário, (C) secundário (H&E, Barra = 25 µm), e (D) antral (H&E, Barra = 100 µm)	55
--	----

Figura 5 - (A) Ovários de ratas tratadas com gossipol apresentando atresia nos folículos primordial, primário e secundário (H&E, Barra = 100 µm). (B) Folículos primordiais e primários atrésicos de uma rata tratada com gossipol (H&E, Barra = 25 µm)	59
---	----

CAPÍTULO 4:

Figura 1- Lavagens sequenciais das tubas uterinas para arraste dos embriões com auxílio de um microscópio estereoscópico. Fonte: arquivo pessoal.....	87
---	----

Figura 2 - Placa 35x10 mm, contendo 4 microgotas de 30 µl, sendo uma controle (C - acima), outra contendo 5 µg/mL de gossipol (5 - lado direito), outra 10 µg/mL (10 - abaixo) e 20 µg/mL (20 - lado esquerdo). Fonte: arquivo pessoal	88
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1 - Estudos experimentais relatam lesão hepática induzida por gossipol.	21
Tabela 2 - Alguns estudos experimentais descrevendo os efeitos do gossipol na reprodução masculina.	23
Tabela 3 - Estudos experimentais que descrevem os efeitos do gossipol na reprodução feminina	24
Tabela 4 - Medidas preventivas para reduzir a toxicidade do gossipol.....	29

CAPÍTULO 2:

Tabela 1- Peso corporal, ganho de peso corporal (em gramas) e duração (em horas) das fases do ciclo estral de ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia) ou 0,9% de solução salina (grupo controle) por via subcutânea durante 15 dias consecutivos.....	56
Tabela 2- Concentrações de estradiol, progesterona, hormônio luteinizante (LH), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), e hormona estimulante da tireoide (TSH) em soro de ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia) ou solução salina a 0,9% (grupo controle) por via subcutânea durante 15 dias consecutivos	57
Tabela 3- Populações de folículos ovarianos de ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia) ou solução salina a 0,9 % (grupo controle) por via subcutânea durante 15 dias consecutivos.	58

CAPÍTULO 3:

Tabela 1- Frequências (em %) de folículos ovarianos em ovários de ratas cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por 24 horas.....	73
Tabela 2 - Frequências (em %) de folículos ovarianos em ovários de ratas cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por sete dias.....	73
Tabela 3 - Populações (em %) de folículos ovarianos em fragmentos de ovários murinos cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por 24 horas	74
Tabela 4 - Populações (em %) de folículos ovarianos em fragmentos de ovários murinos cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por 7 dias.....	75

Tabela 5 - População de folículos ovarianos (em %) em galinhas de ovários cultivados por 0, 24 e 168 horas.....	76
---	----

Tabela 6 - População de folículos ovarianos (em %) em galinhas de ovários cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10, and 20 µg/ml) por 24 horas.....	77
--	----

Tabela 7 - População de folículos ovarianos (em %) em galinhas de ovários cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10, and 20 µg/ml) por sete dias.....	77
---	----

CAPÍTULO 4:

Tabela 01 - Embriões coletados e analisados após 24 horas de cultivo em meio contendo gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) e sem gossipol (grupo controle).....	90
--	----

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1.1 Introdução	15
1.1.2 Gossipol	15
1.1.3 Gossipol em produtos de algodão	17
1.1.4 Toxicocinética.....	18
1.1.5 Intoxicação por gossipol	19
1.1.6 Hepatotoxicidade	21
1.1.7 Efeitos reprodutivos.....	22
1.1.8 Imunotoxicidade	25
1.1.9 Medidas preventivas	26
1.1.10 Considerações finais	29
1.1.11 Objetivos.....	30
1.1.11.1 Objetivo geral	30
1.1.11.2 Objetivos específicos	30
1.1.12 Referências	30

2 CAPÍTULO 2 - GOSSIPOL PROMOVE DEGENERAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE RATAS

50

2.1 RESUMO	50
2.2 INTRODUÇÃO.....	51
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
2.3.1 Animais	52
2.3.2 Delineamento experimental	52
2.3.3 Análise hormonal	54
2.3.4 Análise morfológica de folículos ovarianos	54
2.3.5 Análise estatística.....	56
2.4 RESULTADOS	56
2.5 DISCUSSÃO	59

2.6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

3 CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO *IN VITRO* DA AÇÃO DO GOSSIPOL SOBRE FOLÍCULOS OVARIANOS DE ROEDORES E GALINHAS

3.1 RESUMO	68
3.2 INTRODUÇÃO	69
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
3.3.1 Animais	70
3.3.2 Cultivo dos ovários	71
3.3.2 Análise estatística	71
3.4 RESULTADOS	72
3.4.1 Ratas	72
3.4.2 Camundongas	74
3.4.3 Galinhas	75
3.5 DISCUSSÃO	78
3.6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	80

4 CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO GOSSIPOL SOBRE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE MURINOS

4.1 RESUMO	84
4.2 INTRODUÇÃO	85
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
4.3.1 Obtenção de embriões de camundongas	86
4.3.2 Cultivo de embriões de camundongas	87
4.3.3 Delineamento experimental	88
4.3.4 Análise estatística	89
4.4 RESULTADOS	89
4.5 DISCUSSÃO	90
4.6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	91

ANEXOS	96
ANEXO I – “GOSSYPOL TOXICITY FROM COTTONSEED PRODUCTS”	97
ANEXO II – “GOSSYPOL PROMOTES DEGENERATION OF OVARIAN FOLLICLES IN RATS”	110
ANEXO III – “GOSSYPOL PROMOTES THE DEGENERATION OF CHICKEN OVARIAN FOLLICLES IN VITRO”	119

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Introdução

O algodão (*Gossypium* spp.), planta arbórea da família Malvaceae, foi uma das primeiras plantas cultivadas pelo homem, que ocorreu há mais de 4.000 anos. É produzido principalmente para extração da fibra, utilizada na indústria têxtil, e do óleo da semente (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). O gênero *Gossypium* spp. inclui muitas espécies distribuídas por todo o mundo, mas apenas quatro espécies são cultivadas para obtenção da fibra de algodão: *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium herbaceum* L. A espécie de algodão economicamente mais importante é *G. hirsutum*, responsável por 90% do algodão cultivado do mundo (BORÉM et al., 2003). A fibra de algodão e a produção de óleo geram subprodutos ricos em energia e proteína utilizados na alimentação. No entanto, esta planta contém um composto tóxico, o gossipol (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014).

1.1.2 Gossipol

O gossipol é um composto fenólico que foi isolado pela primeira vez em 1899. O nome é oriundo do nome científico do gênero da planta (*Gossypium*), associado com a terminação "ol" de fenol (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). Possui peso de molecular 518,55 Dalton, é um pigmento amarelo, cristalino, insolúvel em água e hexano e solúvel em acetona, clorofórmio, éter, e metil etil cetona (butanona) e parcialmente solúvel em óleos vegetais. A fórmula química é $C_{30}H_{30}O_8$, e a fórmula estrutural química é de 2,2'-bis(8-formil-1,6,7-trihidroxi-5-isopropil-3-metil-naftaleno) (Figura 01) (ABOU-EDINBURGH, 1976; ROGERS et al., 2002; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014).

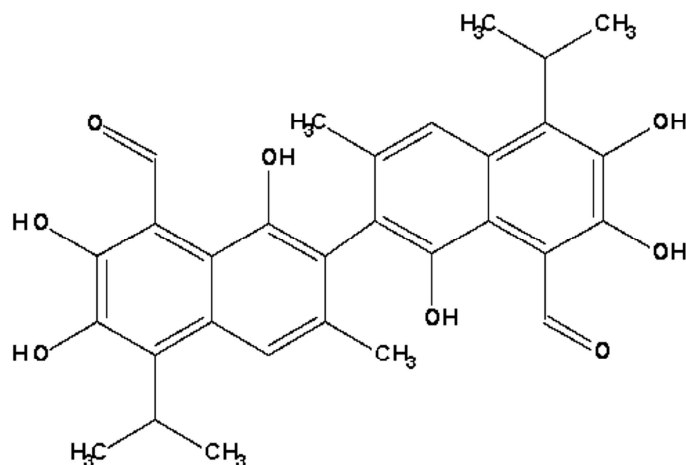


Figura 1 - Estrutura química, fórmula e fórmula estrutural do gossipol.
Fonte: GADELHA et al., 2014

Esta substância é produzida pelas glândulas de pigmento do algodão presentes nas raízes, caules, folhas, sementes e botões de flores. As glândulas de pigmento são pequenas manchas negras distribuídas por toda a planta do algodão, sendo as concentrações mais elevadas encontradas nas sementes (ROGERS et al., 2002; SOTO-BLANCO, 2008; ALEXANDER et al., 2008; GADELHA et al., 2014). A semente do *G. barbadense* pode conter até 34 g de gossipol/kg (PERCY et al., 1996). Esta toxina promove efeitos tóxicos aos vertebrados, porém confere a planta resistência às pragas (ROGERS et al., 2002; SOTO-BLANCO, 2008; ALEXANDER et al., 2008; GADELHA et al., 2014). As glândulas produzem pigmentos fenólicos adicionais (pelo menos 14), mas eles estão em concentrações mais baixas que o gossipol e possuem pouca importância toxicológica (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014).

O gossipol é uma mistura de dois enantiômeros, (+) e (-) gossipol (HRON et al., 1999; LORDELO et al., 2005; SOTO-BLANCO, 2008; KAKANI et al., 2010; GADELHA et al., 2014). O enantiômero (-) de gossipol é eliminado mais lentamente (WU et al., 1986), apesar de ser a forma mais biologicamente ativa. Por conseguinte, é mais tóxico do que o (+) gossipol (BAILEY et al., 2000; KAKANI et al., 2010). A espécie *Gossypium* produz ambos os enantiômeros em diferentes proporções, o que é geneticamente determinado (LORDELO et al., 2005; LORDELO et al., 2007; SCHEFFLER; ROMANO, 2008; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). Por exemplo, a proporção de (-) gossipol varia de 33,8 a 47,0% nas sementes da variedade *Upland* (*G. hirsutum*) (CALHOUN et al., 1995; STIPANOVIC et al., 2009) e 24,9 a 68,9% nas sementes de *G. barbadense* (PERCY et al., 1996).

Foram observadas duas formas de gossipol nas plantas, a forma livre e a conjugada (ALEXANDER et al., 2008). A forma conjugada é produzida através de ligações covalentes do gossipol livre com grupos epsilon-amino de lisina e arginina (BREISSANI et al., 1964; FERNANDEZ et al., 1995; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014), por meio da reação de Maillard (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). No entanto, esta reação reduz a disponibilidade de aminoácidos para a absorção pelo animal e a lisina parece ser a mais afetada (FERNANDEZ et al., 1995).

A produção de gossipol é influenciada por diversos fatores, incluindo as condições meteorológicas e as diferentes espécies de algodão. Considerando as condições climáticas, a produção de gossipol é positivamente correlacionada com a taxa de precipitação e negativamente correlacionada com a temperatura (PONS et al., 1953). Em relação a variação entre as espécies de algodão, a *G. barbadense* tem concentrações de gossipol mais elevadas que a *G. hirsutum*. Por outro lado, o armazenamento de algodão diminui levemente o teor de gossipol (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014).

1.1.3 Ações do gossipol

O teor de gossipol livre nas sementes de algodão varia entre muitas variedades de algodão (RANDEL et al., 1992; ALEXANDER et al., 2008), entre 0,02 e 6,64% (PRICE et al., 1993). O algodão pode conter níveis superiores a 14.000 mg/kg de gossipol total e 7.000 mg/kg de gossipol livre (ALEXANDER et al., 2008). No entanto, após a extração do óleo das sementes, até 0,6% está disponível para a extração de solvente, mas cerca de 0,06% está disponível, se o processo de extração envolver pressão mecânica e tratamento térmico (NICHOLSON, 2012).

Em adição aos seus efeitos nocivos, o gossipol e seus derivados têm um potencial de utilização terapêutica. Esses compostos apresentaram ação *in vitro* contra alguns vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (POLSKY et al., 1989; YANG et al., 2012) e o vírus da gripe H5N1 (YANG et al., 2012; 2013), várias bactérias e leveduras (MARGALITH, 1967; YILDIRIM-AKSOY et al., 2004; TURCO et al., 2007; ARINBASAROVA et al., 2012).

O gossipol é um composto promissor para o tratamento da leucemia (BALAKRISHNAN et al., 2008), do linfoma (JOHNSON, 2008), do câncer de mama

(WANG et al., 2000; VAN-POZNAK et al., 2001), do mioma (HAN et al., 1987), do câncer da próstata (JIANG et al., 2012), e de outras doenças malignas (TUSZYNSKI; COSSU, 1984; WU et al., 1989; BADAWEY et al., 2007; KO et al., 2007; YE et al., 2007; CHIEN et al., 2012; HSIAO et al., 2012; WONG et al., 2012). Além disso, foi utilizado na China em 1970 para o tratamento de miomas uterinos, endometriose e hemorragia uterina em mulheres (HAN et al., 1987).

1.1.4 Toxicocinética

A taxa de absorção de gossipol é inversamente proporcional à quantidade de ferro na dieta (HASCHEK et al., 1989), 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 ingerido com proteínas (SCHNEIER et al., 2002), mas não se sabe, no momento, se a forma ligada pode ser absorvida pelos intestinos ou se os microrganismos podem liberar gossipol livre a partir da forma ligada. O gossipol absorvido acumula-se no fígado (LINDSEY et al., 1980) e nos rins (KIM et al., 1996). A principal via de excreção desta substância é por meio da bile, que é então eliminada através das fezes após conjugação com glucoronídeos e sulfatos (ABOUDONIA et al., 1989; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). Em ratos, tratados por via oral, com 5 mg de ambas as formas racêmicas de gossipol, 70,4 % de (+) e 80,2 % de (-) gossipol foram excretadas nas fezes no prazo de cinco dias, enquanto que 2,30 % de (+) e 2,79 % de (-) gossipol foram excretadas na urina (QIAO-QIN et al., 1987). Pequenas quantidades também são excretadas pelo ar expirado (SOTO-BLANCO, 2008). Pouca ou nenhuma quantidade de gossipol é excretado pelo leite (LINDSEY et al., 1980). Os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) do total de (+) e (-) gossipol em ratos, após uma dose única intravenosa, foi estimada como 25,26 horas e 10,53 horas, respectivamente (QIAO-QIN et al., 1987).

1.1.5 Intoxicação por gossipol

A semente de algodão possui níveis suficientemente elevados de gossipol para produzir intoxicação aguda. No entanto, o gossipol produz efeitos cumulativos que podem surgir repentinamente após um período de ingestão variável, geralmente de um a três meses (EAGLE, 1950; PATTON et al., 1985; KERR, 1989; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2011, 2014). A intoxicação por gossipol tem sido relatada em várias espécies, incluindo frangos de corte (HENRY et al., 2001), suínos (HASCHEK et al., 1989), cães (WEST, 1940; UZAL et al., 2005), ovinos (MORGAN et al., 1988) e caprinos (LESTE et al., 1994). Os animais monogástricos, como suínos, aves, peixes e roedores, são mais suscetíveis à toxicidade do gossipol do que os ruminantes (RANDEL et al., 1992; KENAR, 2006; ZHANG et al., 2007a; ALEXANDER et al., 2009). Além disso, os ruminantes jovens são mais sensíveis ao gossipol em comparação com os ruminantes adultos (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014); isso ocorre porque pode haver ligação desse fenol a proteínas do fluido ruminal, tornando-o inativo. Se a ingestão de gossipol supera a capacidade de desintoxicação do rúmen, o gossipol livre pode ser absorvido em concentrações perigosas, mesmo em animais ruminantes adultos (WILLARD et al., 1995).

Os sinais gerais da intoxicação aguda são semelhantes entre espécies de animais, e incluem dificuldade respiratória, diminuição do ganho de peso corporal, anorexia, fraqueza, apatia e morte depois de vários dias (ROGERS et al., 1975; HOLMBERG et al., 1988; MORGAN et al., 1988; KERR, 1989; RISCO et al., 1992; ZELSKI et al., 1995; FOMBAND; BRYANT, 2004; Alexander et al., 2009). A morte súbita é devido à insuficiência cardíaca e foi relatada em bezerros (HOLMBERG et al., 1988; HUDSON et al., 1988), cordeiros (MORGAN et al., 1988) e cães (PATTON et al., 1985).

Os achados de necropsia em ruminantes incluem edema pulmonar, líquido amarelado no tórax e cavidade peritoneal, gastroenterite, necrose hepática centrolobular e degeneração hipertrófica das fibras cardíacas. Em bezerros, os principais achados patológicos são ascite, edema visceral, necrose centrolobular aguda dos hepatócitos, danos aos rins e lesões cardiovasculares. A ocorrência de pneumonia é, provavelmente, devido a uma sensibilidade maior à infecções secundárias (HOLMBERG et al., 1988; MORGAN et al., 1988; RISCO et al., 1992; ZELSKI et al., 1995).

Os suínos podem apresentar taxa de ganho de peso reduzida, anorexia, dificuldade respiratória, insuficiência cardíaca, tosse e intolerância a exercícios. Os

achados de necropsia incluem acúmulo de líquido nas cavidades corporais, edema e congestão no fígado, pulmão e baço, e hipertrofia cardíaca com degeneração de fibras musculares (HASCHEK et al., 1989).

A anemia é frequentemente observada em animais alimentados com caroço de algodão. Isso ocorre porque o gossipol é um composto altamente reativo que se liga aos minerais e aminoácidos. A ligação com o ferro forma um complexo de ferro-gossipol, que inibe a absorção desse metal. A deficiência de ferro afeta a eritropoiese (HERMAN; SMITH, 1973; SKUTCHES et al., 1973; ABOU-EDINBURGH, 1976; LINDSEY et al., 1980; PATTON et al., 1985; KERR, 1989; AKINGBEMI; AIRE, 1994; ANEJA et al., 2003; SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). Além disso, o gossipol promove o aumento da fragilidade dos eritrócitos (LINDSEY et al., 1980; MENA et al., 2004; ZHANG et al., 2007a). O gossipol estimula a eriptose (morte de eritrócitos semelhante à apoptose), por meio do aumento da atividade citosólica do Ca^{2+} e contração da membrana das células, o que contribui para a anemia (ZBIDAH et al., 2012).

O gossipol também afeta o metabolismo da tireoide (TANG; WONG, 1984; RIKIHISA; LIN, 1989; LIN;RIKIHISA, 1990; UDOH et al., 1992; EL-MOKADEM et al., 2012). Alguns estudos com ratos machos (RIKIHISA; LIN, 1989) e fêmeas (LIN; RIKIHISA, 1990) mostraram diminuição das concentrações sanguíneas de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) em decorrência da administração do gossipol. Por outro lado, a administração do gossipol resultou em um aumento das concentrações séricas de T3, mas sem afetar as de T4, em ratos (TANG; WONG, 1984) e ovelhas (EL-MOKADEM et al., 2012). A avaliação histopatológica das glândulas tireoideanas de ratos machos 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 TSH, apresentaram hipertrofia, hiperplasia e degranulação após a administração de gossipol em ratos (UDOH et al., 1992).

Alguns sinais clínicos de intoxicação pelo gossipol foram atribuídas à redução de antioxidantes nos tecidos e ao aumento da formação de espécies reativas do oxigênio, que produzem peroxidação lipídica (FORNÉS et al., 1993; JANERO; BURGHARDT, 1988; KOVACIC, 2003). Em concentrações elevadas, o gossipol também prejudica a produção de energia a partir do metabolismo oxidativo, por meio da interferência com a atividade enzimática mitocondrial na cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (MEKSONGSEE et al., 1970; ABOU- DONIA; DIECKERT EDINBURGH,

1974). Além disso, o gossipol diminui a força de contração do coração e a extensão da contração de fibras cardíacas (WEI-MIN; URTHALER, 1986).

1.1.6 Hepatotoxicidade

Além dos efeitos citados, o gossipol é um agente hepatotóxico (Tabela 1) (WANG; LEI, 1987; HASCHEK et al., 1989; MANABE et al., 1991; DEORAS et al., 1997; BLEVINS et al., 2010, KAKANI et al., 2010; FONSECA et al., 2013). Ascite e degeneração dos hepatócitos (forte eosinofilia citoplasmática e picnose nuclear) foram observadas em ratos que receberam uma dose única intraperitoneal de 25 (DEORAS et al., 1997) ou 30 mg/kg de peso corporal (FONSECA et al., 2013).

Tabela 1: Estudos experimentais que relatam lesão hepática induzida por gossipol em frangos, galinhas e ratos.

Animais	Dose do gossipol	Via de administração	Duração do tratamento	Referências
Frangos	0.4% de gossipol total na dieta	Oral	20 dias	(KAKANI et al., 2010)
Galinhas	0.1% de gossipol total na dieta	Oral	21 dias	(BLEVINS et al., 2010)
Ratos	25 mg/kg peso corporal	Intraperitoneal	Dose única	(DEORAS et al., 1997)
Ratos	30 mg/kg peso corporal	Intraperitoneal	Dose única	(FONSECA et al., 2013)
Ratos	5, 10 e 20 mg/kg peso corporal	Intraperitoneal	10 dias	(EL-SHARAKY et al., 2010)

PV: Peso vivo

Os ratos que receberam doses mais baixas de gossipol (15 mg/kg/dia, durante quatro semanas, ou 30 mg/kg/dia durante duas semanas) demonstraram alterações morfológicas no fígado, como foi observado por meio de microscopia eletrônica, as quais foram caracterizadas por vacuolização mitocondrial, retículo endoplasmático aumentado, espaço perinuclear expandido e proliferação de fibras de colágenos no espaço perissinusoidal (WANG et al., 2000; LEI, 1987). Frangos alimentados com dieta contendo 0,1% de gossipol livre por 21 dias apresentaram aumento na atividade da gama-glutamilttransferase e esteatose hepática (BLEVINS et al., 2010). Frangos que

receberam uma dieta com 0,4% de gossipol total durante 20 dias apresentaram maior peso do fígado (KAKANI et al., 2010).

1.1.7 Efeitos reprodutivos

O gossipol afeta a gametogênese masculina e feminina e promove degeneração embrionária (GADELHA et al., 2011, 2014). Na década de 1950, a China passou por uma forte redução na taxa de natalidade humana em muitas áreas rurais, onde a população se alimentava com óleo de algodão contendo gossipol. Esta observação foi associada a infertilidade masculina causada pelo gossipol presente no óleo da semente de algodão consumido (LIU, 1957). Diante disto, este fenol foi investigado para utilização como contraceptivo masculino em vários estudos experimentais (QIAN; WANG, 1984; YU; CHAN, 1998; COUTINHO, 2002; DODOU et al., 2005; CHANG et al., 2011).

A toxicidade deste composto para a reprodução dos machos (Tabela 2) foi relatada em diversos estudos que demonstraram a inibição da espermatogênese, caracterizada por diminuição na contagem, motilidade e viabilidade dos espermatozoides (HAHN et al., 1981; GÅFVELS et al., 1984; GU; ANDERSON, 1985; LAGERLÖF; TONE 1985; HEYWOOD et al., 1985; CHONGTHMMAKUN et al., 1986; ZIRKLE et al, 1988; HONG et al., 1989; RANDEL et al., 1992; FORNÉS et al., 1993; CHENOWETH et al., 2004; BROCAS et al., 1997; CHENOWETH et al., 2000; YUAN; SHI, 2000; EL-SHARAKY et al., 2010). O efeito antifertilidade masculina é dose e tempo dependente. A infertilidade ocorre por meio da inibição da motilidade dos espermatozoides, diminuição da concentração espermática, indução de lesão mitocondrial específica na cauda do espermatozoide e danos ao epitélio germinativo (RANDEL et al., 1992). Contudo, tais efeitos são reversíveis quando a ingestão do gossipol é cessada (HASSAN et al., 2004). Além disso, a administração de gossipol para ratos machos não interferiu no desenvolvimento embrionário e fetal da prole de fêmeas não tratadas (BEAUDOIN, 1988).

Os efeitos deletérios sobre a reprodução masculina não foram observados para todos os animais alimentados com farelo de algodão. Em caprinos (NUNES et al., 2010) e ovinos machos adultos (GUEDES; SOTO-BLANCO, 2010) alimentados com uma 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 e pela concentração, motilidade e anormalidades dos espermatozoides.

Tabela 2: Alguns estudos experimentais descrevendo os efeitos do gossipol na reprodução masculina de roedores e touros.

Animais	Dose de gossipol	Efeitos	Referências
Hamsters	10 mg/kg PV/dia	Degeneração de espermatozóides	HAHN et al., 1981
Ratos	20 mg/kg PV/dia	Degeneração de espermatozóides	HAHN et al., 1981
Camundongos	40 mg/kg PV/dia	Sem alterações	HAHN et al., 1981
Ratos	25 mg/kg PV/dia	Diminuição da espermatogênese, danos as células de Sertoli e túbulos seminíferos	HEYWOOD et al., 1985
Ratos	10 mg/kg PV/dia	Degeneração tubular, redução da concentração de testosterona, involução da próstata ventral e vesícula seminal	GÅFVELS et al., 1984
Ratos	5, 10 and 20 mg/kg PV/dia	Diminuição do número e motilidade de espermatozoides, aumento do número de espermatozoides anormais, níveis séricos reduzidos de testosterona, LH e FSH	EL-SHARAKY et al., 2010
Touros	16,4 mg/kg PV/dia	Produção de espermatozoides e motilidade reduzidas, aumento da proporção de anormalidades na peça intermediária de espermatozoides	CHENOWETH et al., 2000
Touros	8 mg/kg PV/dia	Anormalidades primárias e secundárias de espermatozoides, aumento do número de espermatozoides com vacúolos proximais	HASSAN et al., 2004

O mecanismo dos danos causados aos espermatozoides pelo gossipol ocorre devido ao bloqueio da produção e liberação de ATP utilizado por essas células (UENO et al., 1988). Outro efeito do gossipol é a redução do conteúdo celular de β -tubular em espermatócitos e espermátides (TENG, 1997). Além disso, o gossipol inibe o influxo de cálcio (BREITBART, 1984; BREITBART, 1989), e a atividade de Mg-ATPase e Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas do espermatozoide (BREITBART et al., 1984). Espermatozoides anormais ocorrem porque o gossipol produz alterações ultra-estruturais na membrana nuclear, nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (HAFFER, 1983; ARSHMAI; RUTTLE, 1988; CHENOWETH et al., 2000;

ROMUALDO; KLINEFELTER, 2002). Em suínos, em células de Sertoli cultivadas, o gossipol também diminui a atividade oxidativa e causa dano ao DNA (ZHANG et al., 2011). Em ratos alimentados com torta de algodão rico em gossipol, foi observada expressão nuclear reduzida de receptores androgênicos em células de Leydig, células de Sertoli e de células mioides (TIMURKAAN et al., 2011).

O gossipol também afeta a reprodução do sexo feminino (Tabela 3), sendo as fêmeas de ruminantes as mais tolerantes do que as fêmeas não-ruminantes (LIN et al., 1985; BROCAS et al., 1997; RANDEL et al., 1992; GRAY et al., 1993), provavelmente devido à desintoxicação ruminal. A exposição das fêmeas a esta substância tem sido associada à interferência no ciclo estral, gestação e no desenvolvimento embrionário inicial (RANDEL et al., 1992, 1996; GADELHA et al., 2011, 2014). Em roedores, o gossipol interferiu no ciclo estral (LIN et al., 1985; ADEYEMO; LONGE, 2007) e na função das células da granulosa em suínos (BASINI et al., 2009). Além disso, os ovários de novilhas alimentadas com farelo de algodão tiveram menos folículos antrais (> 5 mm) do que as novilhas que consumiram farelo de soja (RANDEL et al., 1996). Também foi relatado que afeta a esteroidogênese ovariana *in vitro* (GU et al., 1990; LIN et al., 1994a), bem como a expansão do *cumulos* e maturação nuclear de oócitos de bovinos (LIN et al., 1994a).

Tabela 3: Estudos experimentais que descrevem os efeitos do gossipol na reprodução de ratas e novilhas.

Animais	Dose de Gossipol	Efeitos	Referências
Ratas	5 mg/kg PV/dia	Diestro prolongado	GU;ANDERSON, 1985
Ratas	25 mg/kg/dia	Níveis mais baixos de 17 β - estradiol	LIN et al., 1985
Ratas	20 mg/kg/dia	Ciclo estral irregular e longo, tempo prolongado para o acasalamento, diminuição da taxa de gestação, redução do número de embriões viáveis	LAGERLÖF; TONE, 1985
Novilhas	~51 mg/kg PV/dia	Não houve interferência no ciclismo, na primeira concepção de ratas e na morfologia ovariana	GAMBILL; HUMPHREY, 1993
Novilhas	5g de gossipol livre/animal/dia	Redução no número de folículos ovarianos >5 mm	RANDEL et al., 1994

Estudos anteriores demonstraram que o gossipol interfere no desenvolvimento embrionário (ZIRKLE; LIN, 1988; LIN, 1991; RANDEL et al., 1992; BROCAS et al., 1997; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2005; VILLASEÑOR et al., 2008). Na verdade,

verificou-se que o gossipol pode chegar ao fluido uterino por meio da circulação sanguínea materna (VILLASEÑOR et al., 2008). O efeito embriotóxico do gossipol foi observado em estudos *in vitro* (LIN et al., 1994b; BROCAS et al., 1997; VELASQUEZ-PEREIRA et al., 2003; HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2005; VILLASEÑOR et al., 2008) e *in vivo* (LI et al., 1989; RANDER et al., 1996; VELASQUEZ-PEREIRA et al., 2003; VILLASEÑOR et al., 2008). A perda da gestação precoce promovido pelo gossipol não se deve exclusivamente aos danos diretos aos embriões, mas também à interferência na implantação do embrião (LIN, 1991). Além disso, a administração dessa substância em ratas prenhes foi responsável por uma redução significativa do peso corporal fetal, mas não foram observadas anormalidades fetais (SEIN; PHIL, 1986).

Provavelmente, o mecanismo de embriotoxicidade do gossipol ocorre por meio da ação citotóxica direta sobre o embrião (LI et al., 1989; RANDER et al., 1992). Esse efeito citotóxico pode ser promovido por: (1) geração de espécies reativas do oxigênio, que induz o estresse oxidativo (FORNÉS et al., 1993; MORALES et al., 1999; KOVACIC, 2003), (2) interrupção da comunicação intercelular (HERVÉ et al., 1996), (3) indução da apoptose (WANG et al., 2000; YURTCU et al., 2003; ERGUN et al., 2004; CUI et al., 2004; MOON et al., 2008, 2010; CENGIZ et al., 2010), ou (4) a interferência no transporte iônico nas membranas, aumentando os níveis de cálcio intracelular (CHENG et al., 2003).

1.1.8 Imunotoxicidade

O gossipol pode causar uma redução do número de leucócitos circulantes, principalmente linfócitos, o que pode afetar a imunocompetência do organismo (BRAGA et al., 2012). Experimentos em ratos, tanto *in vivo* como *in vitro*, mostraram atividade imunossupressora do gossipol que ocorre ao afetar linfócitos por inibição da proliferação e indução de apoptose (QUINTANA et al., 2000; XU et al., 2009). Os ratos que receberam gossipol apresentaram reduções significativas das populações de linfócitos no timo e nos nódulos linfáticos mesentéricos (SEIN; PHIL, 1986; SIJUN et al., 2012), na população de células totais do baço (SEIN; PHIL, 1986) e na capacidade do sangue e células linfáticas para produzir anticorpos após a imunização de eritrócitos de ovelhas (SEIN; PHIL, 1986; SIJUN et al., 2012). Além disso, o baço e linfonodos de camundongos que receberam gossipol apresentaram diminuição na população de tímócitos CD₄⁺ e aumento da população de linfócitos CD₈⁺ (SIJUN et al., 2012).

Em vários estudos, foi observado que o gossipol interfere com a função imune dos linfócitos (XU et al., 1988; NAGALAKSHMI et al., 2001; PATTANAIK et al., 2003; SIJUN et al., 2012). Após a inoculação de *Brucella abortus*, a produção específica de anticorpos anti-*Brucella* foi prejudicada em cordeiros (NAGALAKSHMI et al., 2001) e bezerros (PATTANAIK et al., 2003) alimentados com farelo de algodão. Camundongos tratados com gossipol apresentaram menor produção de IgM e IgG em resposta à imunização com eritrócitos de ovinos (SIJUN et al., 2012). Homens tratados com gossipol, como um contraceptivo masculino, apresentaram títulos reduzidos de IgG que podem estar relacionados aos danos produzidos nos linfócitos (XU et al., 1988).

A proliferação *in vitro* de macrófagos de camundongos foi inibida pelo gossipol (SIJUN et al., 2012). Além disso, a adição de gossipol ao meio de cultivo de macrófagos peritoneais de ratos incubados inibiu o metabolismo do ácido araquidônico e a produção de prostaglandina E₂ (OHUCHI et al., 1988). Por outro lado, a quimiotaxia de macrófagos induzida por *Edwardsiella ictaluri* foi aumentada em bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com semente de algodão (BARROS et al., 2002) ou que receberam gossipol (YILDIRIM et al., 2003). No entanto, estes peixes não foram afetados pelo gossipol em outro estudo (YILDIRIM-ALKSOY et al., 2004). O gossipol também aumentou a atividade da lisozima sérica em bagre do canal após o desafio com *E. ictaluri* (YILDIRIM et al., 2003; YILDIRIM-ALKSOY et al., 2004).

1.1.9 Medidas preventivas

As medidas preventivas envolvem o tratamento dos produtos de algodão para diminuir as concentrações de gossipol livre por meio da utilização de calor e pressão no processamento destes produtos (Tabela 4). A seleção genética produziu variedades de algodão desprovidas de glândulas produtoras de gossipol (FISHER et al., 1988), mas estas variedades são pouco cultivadas porque não são muito produtivas e são mais vulneráveis a ataques de insetos (SOTO-BLANCO, 2008; GADELHA et al., 2014). Uma alternativa é a seleção e utilização de variedades de algodão contendo um relativo aumento na proporção de (+) e (-) gossipol (BAILEY et al., 2000). A Normativa 2002/32 da União Europeia (2002L0032 - PT - 2013/02/26 - 017.001) afirma que as concentrações máximas de gossipol livre para caroço de algodão são 5.000 ppm, e 1.200 ppm para farelo ou torta de algodão, e para rações completas são 20 ppm para galinhas poedeiras e leitões, 60 ppm para coelhos e suínos, 100 ppm para aves e bezerros e 500

ppm para bovinos, ovinos e caprinos. Infelizmente, não há esse tipo de exigência na legislação brasileira.

O processamento de grãos por meio de tratamento térmico (BRODERICK; CRAIG, 1980; ARIELI, 1998) e o processo de extrusão (NOFTSGER et al., 2000) podem reduzir os níveis de gossipol livre nas sementes de algodão. No entanto, é possível que o conjugado formado possa liberar o gossipol durante a digestão (NOFTSGER et al., 2000). De fato, os animais alimentados com dietas contendo caroço de algodão com concentrações totais de gossipol semelhantes, mas diferentes concentrações de gossipol livre tiveram semelhante quantidade de gossipol total no plasma (NOFTSGER et al., 2000). Além disso, embora o processo de extrusão tenha reduzido a concentração de gossipol livre, mas não a concentração total de gossipol, pintos de corte alimentados com farelo de algodão extrusado mostrou diminuição do ganho de peso corporal, aumento do consumo de ração e conversão alimentar ineficiente (HENRY et al., 2001).

O tratamento do algodão por radiação gama (JADDOU et al., 1983; JO et al., 2003; SHAWRANG et al., 2011) e irradiação por feixe de elétrons (EBRAHIMI-MAHMOUDABAD; TAGHINEJAD-ROUDBANEH, 2011; SHAWRANG et al., 2011) pode reduzir os níveis de gossipol livre. De fato, a irradiação do gossipol reduziu sua atividade pró-oxidativa *in vitro* e sua embriotoxicidade em camundongas (JO et al., 2003). De fato, a irradiação ao gossipol reduz *in vitro* a atividade pro-oxidativa e embriotoxicidade em ratos (JO et al., 2003). O mecanismo de destruição do gossipol pela radiação é desconhecido, mas especula-se que pode ser resultado da agregação de moléculas de gossipol, ligação cruzada com outras moléculas e fragmentação ou quebra direta das moléculas (EBRAHIMI-MAHMOUDABAD; TAGHINEJAD-ROUDBANEH, 2011). Por outro lado, a aplicação de ureia, que é um procedimento utilizado para reduzir os níveis de aflatoxina em alimentos, aumenta a toxicidade do farelo de algodão em gado leiteiro (SMALLEY; BICKNELL, 1982).

Alguns fungos podem reduzir os níveis de gossipol livre de farelo de semente de algodão por fermentação, incluindo o *Aspergillus niger* (SHI et al., 1998; ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007b), *Aspergillus oryzae* (LIM; LEE, 2011), *Candida tropicalis* (ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007b; WENG; SUN, 2006; ZHANG et al., 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007b) e *Geotrichum candidum* (SUN et al., 2008). O uso de farelo de algodão fermentado para alimentar os animais parece ser seguro (LIM; LEE, 2011; SUN et al., 2013); esses

microrganismos podem ser utilizados no farelo de algodão antes de alimentar os animais, porém não estão comercialmente disponíveis atualmente.

A suplementação dietética com sulfato férrico reduz as concentrações de gossipol livre nos alimentos devido à ligação deste com grupos reativos de gossipol, formando um conjugado. A recomendação para a suplementação é 1 mol de gossipol para cada mol de ferro, o que poderia aumentar os níveis máximos toleráveis de gossipol de 50 para 150 ppm para aves poedeiras e de 100 ppm para 400 ppm para suínos e galinhas (SOTO-BLANCO, 2008). Outros nutrientes podem ser utilizados como um suplemento alimentar para reduzir a disponibilidade desta substância. Verificou-se que a suplementação da dieta com 1 mg de selenito de sódio por dia em ovinos adultos foi capaz de neutralizar a maioria dos efeitos tóxicos do gossipol sobre a qualidade do sêmen (EL-MOKADEM et al., 2012). A suplementação com vitamina E na dieta na dose de 4000 IU/ touro/dia também reverteu os efeitos negativos do gossipol sobre a produção e qualidade do sêmen de touros (VELASQUEZ-PEREIRA et al., 1998) e reduziu a fragilidade osmótica eritrocitária em novilhas (VELASQUEZ-PEREIRA et al., 2002) promovidos pela alimentação de farelo de algodão.

Na tentativa de produção de uma vacina, foi produzido com um conjugado de gossipol com albumina sérica bovina. Esse conjugado induziu a produção de anticorpos contra o gossipol em ratos, mas os animais imunizados foram mais sensíveis ao efeito hepatotóxico agudo do gossipol (FONSECA et al., 2013).

Tabela 4: Medidas preventivas para reduzir a toxicidade do gossipol.

Procedimentos	Referências
Tratamento térmico	
aquecimento	ARIELI, 1998
extrusão	ARIELI, 1998; NOFTSGER et al., 2000
Irradiação	
irradiação gama	JADDOU et al, 1983; JO et al, 2003; SHAWRANG et al., 2011
irradiação por feixe de elétrons	SHAWRANG et al., 2011; EBRAHIMI- MAHMOUDABAD; TAGHINEJAD- ROUDBANEH, 2011
Fermentação de fungos	
<i>Aspergillus niger</i>	SHI et al., 1998; ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007b
<i>Aspergillus oryzae</i>	LIM; LEE, 2011
<i>Candida tropicalis</i>	ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007b; WENG; SUN, 2006;
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZHANG et al., 2006 ZHANG et al., 2006;
<i>Geotrichum candidum</i>	ZHANG et al., 2007b SUN et al., 2008
Suplementação nutricional	
sulfato de ferro	SOTO-BLANCO, 2008
selenito de sódio	EL-MOKADEM et al., 2012
vitamina E	VELASQUEZ-PEREIRA et al., 1998, 2002

1.1.10 Considerações finais

A ingestão de gossipol presente na semente de algodão e seus produtos (torta e farelo) pode promover intoxicação clínica, lesão hepática, toxicidade reprodutiva masculina e feminina, e deficiência imunológica. 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 uma necessidade de mais estudos para compreender o dano reprodutivo feminino promovido pelo gossipol. A imunotoxicidade do gossipol está longe de ser completamente elucidada, mas esse impacto pode reduzir a resistência dos animais às infecções e prejudicar a eficiência das vacinas. Além disso, extensa pesquisa

será necessária para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e de baixo custo para reduzir a toxicidade do gossipol.

1.1.11 Objetivos

1.1.11.1 Geral

Avaliar os efeitos do gossipol no ciclo estral, na foliculogênese *in vivo* e *in vitro* e no desenvolvimento de embriões *in vitro* de roedores e galinhas.

1.1.11.2 Específicos

- Avaliar a interferência do gossipol sobre o ciclo estral de ratas Wistar;
- Determinar as alterações no perfil hormonal promovidas pelo gossipol em ratas;
- Estabelecer se há interferência do gossipol sobre a foliculogênese em ratas;
- Comparar a toxicidade *in vitro* do gossipol em folículos ovarianos de ratas, camundongas e galinhas;
- Estabelecer se há interferência no desenvolvimento de embriões de camundongas cultivados *in vitro* pela exposição ao gossipol;
- Determinar se o gossipol pode afetar a integridade celular e a viabilidade em embriões de camundongas.

1.1.12 Referências

ABOU-DONIA, M. B. Physiological effects and metabolism of gossypol. In: **Residue reviews**. Springer New York, v. 61, p. 125-160, 1976.

ABOU-DONIA, M. B.; DIECKERT, J. W. Gossypol: uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Life sciences**, v. 14, n. 10, p. 1955-1963, 1974.

ABOU-DONIA, M. B.; OTHMAN, M. A.; OBIH, P. Interspecies comparison of pharmacokinetic profile and bioavailability of ($\pm$)-gossypol in male Fischer-344 rats and male B6C3F mice. **Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 37-51, 1989.

ADEYEMO, G. O.; LONGE, O. G.; ADEJUMO, D. O. The reproductive performance of breeder cocks fed cottonseed cake-based diets. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 2, p. 140-144, 2007.

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.; PETEGHEM, C. VAN; VERGER, P. Gossypol as undesirable substance in animal feed: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **The EFSA Journal**, n. 908, p. 1-55, 2008.

ARIELI, A. Whole cottonseed in dairy cattle feeding: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 72, n. 1, p. 97-110, 1998.

ARINBASAROVA, A. Y.; MEDENTSEV, A. G.; KRUPYANKO, V. I. Gossypol inhibits electron transport and stimulates ROS generation in *Yarrowia lipolytica* mitochondria. **The open biochemistry journal**, v. 6, p. 11-15, 2012.

ARSHAMI, J.; RUTTLE, J. L. Effects of diets containing gossypol on spermatogenic tissues of young bulls. **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p. 507-516, 1988.

BADAWY, S. Z. A.; SOUID, A. K.; CUENCA, V.; MONTALTO, N.; SHUE F. Gossypol inhibits proliferation of endometrioma cells in culture. **Asian journal of andrology**, v. 9, n. 3, p. 388-393, 2007.

BAILEY, C. A. C.; STIPANOVIC, R. D.; ZIEHR, M. S.; HAQ, U.; SATTAR, M.; KUBENA, L. F.; KIM, H. L.; VIEIRA, R. M. Cottonseed with a high (+)-to (-)-gossypol enantiomer ratio favorable to broiler production. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5692-5695, 2000.

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.

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

BARROS, M. M.; LIM, C.; KLESIUS, P. H. Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. **Aquaculture**, v. 207, n. 3, p. 263-279, 2002.

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

BEAUDOIN, A. R. A developmental toxicity evaluation of gossypol. **Contraception**, v. 37, n. 2, p. 197-219, 1988.

BLEVINS, S.; SIEGEL, P. B.; BLODGETT, D. J.; EHRICH, M.; SAUNDERS, G. K.; LEWIS, R. M. Effects of silymarin on gossypol toxicosis in divergent lines of chickens. **Poultry science**, v. 89, n. 9, p. 1878-1886, 2010.

BORÉM, A. ; FREIRE, E. C.; CESAR, J.; PENNA, V.; VIANNA, P. A. Considerations about cotton gene escape in Brazil: a review. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 315-332, 2003.

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. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 163, n. 3, p. 147-152, 2012.

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

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. **International journal of andrology**, v. 7, n. 5, p. 439-447, 1984.

BRESSANI, R.; JARQUÍN, R.; ELÍAS, L. G. Cottonseed Flour, Free and Total Gossypol, Epsilon-Amino Lysine, and Biological Evaluation of Cottonseed Meals and Flours in Central America. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 278-282, 1964.

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

BRODERICK, G. A.; CRAIG, W. M. Effect of heat treatment on ruminal degradation and escape, and intestinal digestibility of cottonseed meal protein. **The Journal of nutrition**, v. 110, n. 12, p. 2381-2389, 1980.

CALHOUN, M. C.; KUHLMANN, S. W.; BALDWIN, B. C. Assessing the gossypol status of cattle fed cotton feed products. In: **Proc. Pacific Northwest Nutr. Conf.**, p. 147A-158A, 1995.

CENGIZ, E. et al. Overcoming drug resistance in hormone-and drug-refractory prostate cancer cell line, PC-3 by docetaxel and gossypol combination. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 3, p. 1269-1277, 2010.

CHANG, Q. et al. Drug synergistic antifertility effect of combined administration of low-dose gossypol with steroid hormones in rats. **Chinese Medical Journal-Beijing**, v. 124, n. 11, p. 1678-1682, 2011.

CHENG, J. et al. Effect of gossypol on intracellular Ca^{2+} regulation in human hepatoma cells. **Chin. J. Physiol**, v. 46, p. 117-122, 2003.

CHENOWETH, P. J. et al. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1193-1203, 2000.

CHENOWETH, P. J. et al. 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.

CHIEN, C. et al. The role of COX-2/PGE2 in gossypol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 8, p. 3128-3137, 2012.

CHONGTHAMMAKUN, S. et al. Effects of gossypol on human and monkey sperm motility in vitro. **Contraception**, v. 34, n. 3, p. 323-331, 1986.

COUTINHO, E. M. Gossypol: a contraceptive for men. **Contraception**, v. 65, n. 4, p. 259-263, 2002.

CUI, G. et al. A combined regimen of gossypol plus methyltestosterone and ethinylestradiol as a contraceptive induces germ cell apoptosis and expression of its related genes in rats. **Contraception**, v. 70, n. 4, p. 335-342, 2004.

DE PEYSTER, Ann et al. Oxygen radical formation induced by gossypol in rat liver microsomes and human sperm. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 118, n. 2, p. 573-579, 1984.

DEORAS, D. P. et al. Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats. **Veterinary research communications**, v. 21, n. 5, p. 317-323, 1997.

DODOU, K. Investigations on gossypol: past and present developments. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 14, n. 11, p. 1419-1434, 2005.

DUO, X. et al. Clinical safety of long-term administration of gossypol in 32 cases. **Contraception**, v. 37, n. 2, p. 129-135, 1988.

EAGLE, E. Effect of repeated doses of gossypol on the dog. **Archives of Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 68-71, 1950.

EAST, N. E.; ANDERSON, M.; LOWENSTINE, L. J. Apparent gossypol-induced toxicosis in adult dairy goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 4, p. 642-643, 1994.

EBRAHIMI-MAHMOUDABAD, S. R.; TAGHINEJAD-ROUDBANEH, M. Investigation of electron beam irradiation effects on anti-nutritional factors, chemical composition and digestion kinetics of whole cottonseed, soybean and canola seeds. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 1441-1447, 2011.

EL-MOKADEM, M. Y. et al. Alleviation of reproductive toxicity of gossypol using selenium supplementation in rams. **Journal of animal science**, v. 90, n. 9, p. 3274-3285, 2012.

EL-SHARAKY, A. S. et al. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3354-3361, 2010.

ERGUN, M. A. et al. Apoptosis and nitric oxide release induced by thalidomide, gossypol and dexamethasone in cultured human chronic myelogenous leukemic K-562 cells. **Cell biology international**, v. 28, n. 3, p. 237-242, 2004.

FERNANDEZ, S. R.; ZHANG, Y.; PARSONS, C. M. Dietary formulation with cottonseed meal on a total amino acid versus a digestible amino acid basis. **Poultry Science**, v. 74, n. 7, p. 1168-1179, 1995.

FISHER, G. S.; FRANK, A. W.; CHERRY, J. P. Total gossypol content of glandless cottonseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 42-44, 1988.

FOMBAD, R. B.; BRYANT, M. J. An evaluation of the use of cottonseed cake in the diet of growing pigs. **Tropical animal health and production**, v. 36, n. 3, p. 295-305, 2004.

FONSECA, N. B. S. et al. Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 149-153, 2013.

FORNES, M. W.; BARBIERI, A. M.; BURGOS, M. H. Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH. scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 195, n. 3, p. 1289-1293, 1993.

GADELHA, I. C. N. et al. Efeitos do gossypol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 129-135, 2011.

GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol toxicity from cottonseed products. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 231635, 2014.

GÅFVELS, M. et al. Toxic effects of the antifertility agent gossypol in male rats. **Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 325-333, 1984.

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.

GRAY, M. L.; GREENE, L. W.; WILLIAMS, G. L. Effects of dietary gossypol consumption on metabolic homeostasis and reproductive endocrine function in beef heifers and cows. **Journal of animal science**, v. 71, n. 11, p. 3052-3059, 1993.

GU, Y.; ANDERSON, N. O. Effects of gossypol on the estrous cycle and ovarian weight in the rat. **Contraception**, v. 32, n. 5, p. 491-496, 1985.

GU, Y.; LIN, Y. C.; RIKIHISA, Y. Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 169, n. 2, p. 455-461, 1990.

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

HAHN, D. W. et al. Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents. **Contraception**, v. 24, n. 1, p. 97-105, 1981.

HAN, M. L. et al. Gossypol in the treatment of endometriosis and uterine myoma. **Contributions to gynecology and obstetrics**, v. 16, p. 268-270, 1987.

HASCHEK, W. M. et al. Cottonseed meal (gossypol) toxicosis in a swine herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 5, p. 613-615, 1989.

HASSAN, M. E. et al. Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1171-1179, 2004.

HENRY, M. H. et al. The performance of broiler chicks fed diets containing extruded cottonseed meal supplemented with lysine. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 762-768, 2001.

HENRY, M. H.; PESTI, G. M.; BROWN, T. P. Pathology and histopathology of gossypol toxicity in broiler chicks. **Avian diseases**, p. 598-604, 2001.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J. et al. Timing of inhibitory actions of gossypol on cultured bovine embryos. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 3, p. 922-928, 2005.

HERVÉ, J. et al. Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. **European journal of pharmacology**, v. 313, n. 3, p. 243-255, 1996.

HEYWOOD, R. et al. The toxicity of gossypol to the male rat. **Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 279-284, 1986.

HOFFER, A. P. Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study. **Biology of reproduction**, v. 28, n. 4, p. 1007-1020, 1983.

HOLMBERG, C. A. et al. Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cotton seed meal diet. **Veterinary Pathology Online**, v. 25, n. 2, p. 147-153, 1988.

HONG, C. Y.; HUANG, J. J.; WU, P. The inhibitory effect of gossypol on human sperm motility: relationship with time, temperature and concentration. **Human & Experimental Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 49-51, 1989.

HRON, R. J. et al. Determination of (+)-,(-)-, and total gossypol in cottonseed by high-performance liquid chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 11, p. 1351-1355, 1999.

HSIAO, W. et al. Involvement of Smac, p53, and caspase pathways in induction of apoptosis by gossypol in human retinoblastoma cells. **Molecular vision**, v. 18, p. 2033-2042, 2012.

HUDSON, L. M.; KERR, L. A.; MASLIN, W. R. Gossypol toxicosis in a herd of beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 9, p. 1303-1305, 1988.

JADDOU, H. et al. Effect of Gamma-Radiation on Gossypol in Cottonseed Meal. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 3, p. 988-989, 1983.

JANERO, D. R.; BURGHARDT, B. Protection of rat myocardial phospholipid against peroxidative injury through superoxide-(xanthine oxidase)-dependent, iron-promoted Fenton chemistry by the male contraceptive gossypol. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 17, p. 3335-3342, 1988.

JIANG, J. et al. Gossypol inhibits growth, invasiveness, and angiogenesis in human prostate cancer cells by modulating NF- κ B/AP-1 dependent-and independent-signaling. **Clinical & experimental metastasis**, v. 29, n. 2, p. 165-178, 2012.

JO, C. et al. Irradiation effects on embryotoxicity and oxidative properties of gossypol dissolved in methanol. **Food and chemical toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1329-1336, 2003.

JOHNSON, P. W. M. New targets for lymphoma treatment. **Ann Oncol**, v. 19, n. 4, p. 56-59, 2008.

KAKANI, R. et al. Relative toxicity of cottonseed gossypol enantiomers in broilers. **Open Toxicology Journal**, v. 4, p. 26-31, 2010.

KENAR, J. A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 4, p. 269-302, 2006.

KERR, L. A. Gossypol toxicosis in cattle. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)**, v. 11, n. 9, 1989.

KIM, H. L.; CALHOUN, M. C.; STIPANOVIC, R. D. Accumulation of gossypol enantiomers in ovine tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 2, p. 417-420, 1996.

KO, C. et al. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. **International journal of cancer**, v. 121, n. 8, p. 1670-1679, 2007.

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

LAGERLÖF, R. K.; TONE, J. N. The effect of gossypol acetic acid on female reproduction. **Drug and chemical Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 469-482, 1985.

LI, Y. F.; BOOTH, G. M.; SEEGMILLER, R. E. Evidence for embryotoxicity of gossypol in mice and chicks with no evidence of mutagenic activity in the Ames test. **Reproductive Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 59-62, 1989.

LIM, S.; LEE, K. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 4, p. 494-503, 2011.

LIN, Y. C. et al. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life sciences**, v. 37, n. 1, p. 39-47, 1985.

LIN, Y. C. et al. Inhibition of in vitro fertilization and early embryonic development in hamsters by gossypol. **Life sciences**, v. 55, n. 14, p. 1139-1145, 1994.

LIN, Y. C.; CHITCHAROENTHUM, M.; RIKIHISA, Y. Effect of gossypol on thyroid hormones in young female rats. **Contraception**, v. 41, n. 4, p. 431-440, 1990.

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

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. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 4, p. 562-573, 1980.

LORDELO, M. M. et al. Relative toxicity of gossypol enantiomers in broilers. **Poultry science**, v. 84, n. 9, p. 1376-1382, 2005.

LORDELO, M. M. et al. Relative toxicity of gossypol enantiomers in laying and broiler breeder hens. **Poultry science**, v. 86, n. 3, p. 582-590, 2007.

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.

MARGALITH, P. Inhibitory effect of gossypol on microorganisms. **Applied microbiology**, v. 15, n. 4, p. 952, 1967.

MEKSONGSEE, L. A.; CLAWSON, A. J.; SMITH, F. H.. In vivo effect of gossypol on cytochrome oxidase, succinoxidase, and succinic dehydrogenase in animal tissues. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 18, n. 5, p. 917-920, 1970.

MENA, H. et al. The effects of varying gossypol intake from whole cottonseed and cottonseed meal on lactation and blood parameters in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 8, p. 2506-2518, 2004.

MOON, D. et al. Gossypol decreases tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression of NF- κ B activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 999-1005, 2011.

MOON, D. et al. Gossypol suppresses NF- κ B activity and NF- κ B-related gene expression in human leukemia U937 cells. **Cancer letters**, v. 264, n. 2, p. 192-200, 2008.

MORALES, H. et al. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 52, n. 2, p. 149-157, 1999.

MORGAN, S. et al. Clinical, clinicopathologic, pathologic, and toxicologic alterations associated with gossypol toxicosis in feeder lambs. **American journal of veterinary research**, v. 49, n. 4, p. 493-499, 1988.

NAGALAKSHMI, D. et al. Haematological and immunological response in lambs fed on raw and variously processed cottonseed meal. **ASIAN AUSTRALASIAN Journal of animal sciences**, v. 14, n. 1, p. 21-29, 2001.

NICHOLSON, S. S. Cottonseed toxicity. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**, R. C. Gupta, Ed., pp. 1161–1165, Academic Press, London, UK, 2nd edition, 2012.

NOFTSGER, S. M. et al. Effect of whole and expanded-expelled cottonseed on milk yield and blood gossypol. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 11, p. 2539-2547, 2000.

NUNES, F. D. C. R. et al. Effects of gossypol present in cottonseed cake on the spermatogenesis of goats. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 1, p. 75-78, 2010.

OHUCHI, K. et al. Inhibition by gossypol of tumor promoter-induced arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 971, n. 1, p. 85-91, 1988.

PATTANAIK, A. K. et al. 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 JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES**, v. 16, n. 9, p. 1291-1296, 2003.

PATTON, C. S. et al. Heart failure caused by gossypol poisoning in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, n. 6, p. 625-627, 1985.

PERCY, R. G.; CALHOUN, M. C.; KIM, H. L. Seed gossypol variation within *Gossypium barbadense* L. cotton. **Crop science**, v. 36, n. 1, p. 193-197, 1996.

POLSKY, B. et al. Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol. **Contraception**, v. 39, n. 6, p. 579-587, 1989.

PONS, W. A.; HOFFPAUIR, C. L.; HOPPER, T. H. Gossypol in Cottonseed, Influence of Variety of Cottonseed and Environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 1, n. 18, p. 1115-1118, 1953.

PRICE, W. D.; LOVELL, R. A.; MCCHESENEY, D. G. Naturally occurring toxins in feedstuffs: Center for Veterinary Medicine Perspective. **Journal of animal science**, v. 71, n. 9, p. 2556-2562, 1993.

QIAN, S.; WANG, Z. Gossypol: a potential antifertility agent for males. **Annual review of Pharmacology and Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 329-360, 1984.

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

QUINTANA, P. J. E. et al. Gossypol-induced DNA breaks in rat lymphocytes are secondary to cytotoxicity. **Toxicology letters**, v. 117, n. 1, p. 85-94, 2000.

RANDEL, R. D. et al. 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.

RANDEL, R. D.; CHASE JR, C. C.; WYSE, S. J. Effects of Gossypol and Cottonseed Products on Reproduction of Mammals 123. **J. Anim. Sci**, v. 70, N. 5, p. 1628-1638, 1992.

RIKIHISA, Y.; LIN, Y. C. Effect of gossypol on the thyroid in young rats. **Journal of comparative pathology**, 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. **Journal of dairy science**, v. 75, n. 10, p. 2787-2798, 1992.

ROGERS, G. M.; POORE, M. H.; PASCHAL, J. C. Feeding cotton products to cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 267-294, 2002.

ROGERS, P. A. M.; HENAGHAN, T. P.; WHEELER, B. Gossypol poisoning in young calves. **Irish veterinary journal**, v. 29, n. 1, p. 9-13, 1975.

ROMUALDO, G. S.; KLINEFELTER, G. R.; KEMPINAS, W. de G. Postweaning Exposure to Gossypol Results in Epididymis-Specific Effects Throughout Puberty and Adulthood in Rats. **Journal of andrology**, v. 23, n. 2, p. 220-228, 2002.

SCHEFFLER, J. A.; ROMANO, G. B. Modifying gossypol in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): a cost effective Method for small seed samples. **J Cotton Sci**, v. 12, p. 202-209, 2008.

SCHNEIDER, I. C. et al. Fermentation of cottonseed and other feedstuffs in cattle rumen fluid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2267-2273, 2002.

SEIN, G. M.; PHIL, M. The embryotoxic and immunodepressive effects of gossypol. **The American journal of Chinese medicine**, v. 14, n. 03n04, p. 110-115, 1986.

SHAWRANG, P. et al. Evaluation and comparison of gamma-and electron beam irradiation effects on total and free gossypol of cottonseed meal. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 761-762, 2011.

SIJUN, D. et al. Effects of gossypol acetic acid on cellular and humoral immune response in non-immunized and SRBC-immunized mice. **Central-European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 11-19, 2012.

SMALLEY, S. A.; BICKNELL, E. J. gossypol toxicity in dairy cattle. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v. 4, n. 9, p. S378-S381, 1982.

SOTO-BLANCO, B. Gossipol e fatores antinutricionais da soja. **Toxicologia Aplicada à Veterinária. Manole, São Paulo**, p. 531-545, 2008.

STIPANOVIC, R. D. et al. Total and percent atropisomers of Gossypol and Gossypol-6-methyl ether in seeds from Pima cottons and accessions of *Gossypium barbadense* L. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 2, p. 566-571, 2009.

SUN, H. et al. Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal. **Poultry science**, v. 92, n. 2, p. 392-401, 2013.

SUN, Z. T.; LIU, C.; DU, J. H. Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. **Annals of microbiology**, v. 58, n. 4, p. 683-690, 2008.

TANG, F.; WONG, P. Y. D. Serum potassium and aldosterone levels in gossypol-treated rats. **International journal of andrology**, v. 7, n. 2, p. 149-153, 1984.

TENG, C. S. Reversible changes in the content of cellular and microtubular tubulin in spermatogenic cells after gossypol treatment. **Contraception**, v. 55, n. 1, p. 41-46, 1997.

TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; TIMURKAAN, S. Effects of cottonseed flour on immunohistochemical localization of androgen receptors (AR) in rat testes. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 162, n. 1, p. 13-17, 2011.

TSO, W.; LEE, C.. Gossypol uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation in ejaculated boar spermatozoa. **Contraception**, v. 25, n. 6, p. 649-655, 1982.

TURCO, E. et al. The in vitro effect of gossypol and its interaction with salts on conidial germination and viability of *Fusarium oxysporum* sp. *vasinfectum* isolates. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2370-2381, 2007.

TUSZYNSKI, G. P.; COSSU, G. Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. **Cancer research**, v. 44, n. 2, p. 768-771, 1984.

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. et al. Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. **Contraception**, v. 37, n. 3, p. 333-341, 1988.

UZAL, F. A. et al. Gossypol toxicosis in a dog consequent to ingestion of cottonseed bedding. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 17, n. 6, p. 626-629, 2005.

VAN POZNAK, C. et al. Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. **Breast cancer research and treatment**, v. 66, n. 3, p. 239-248, 2001.

VELASQUEZ-PEREIRA, J. et al. Effects of gossypol from cottonseed meal and dietary vitamin E on the reproductive characteristics of superovulated beef heifers. **Journal of animal science**, v. 80, n. 9, p. 2485-2492, 2002.

VELASQUEZ-PEREIRA, J. et al. Reproductive effects of feeding gossypol and vitamin E to bulls. **Journal of animal science-Menasha then albany then champaign Illinois**, v. 76, n.11, p. 2894-2904, 1998.

VILLASEÑOR, M. et al. Gossypol disrupts embryo development in heifers. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 8, p. 3015-3024, 2008.

WANG, X. et al. Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells. **Life sciences**, v. 67, n. 22, p. 2663-2671, 2000.

WEI-MIN, H.; URTHALER, F. The direct negative inotropic effect of gossypol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 31-36, 1986.

WENG, X.; SUN, J. Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 226-232, 2006.

WEST, J. L. et al. Lesions of gossypol poisoning in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 96, p. 74-76, 1940.

WILLARD, S. T. et al. Effects of Free Gossypol in the Diet of Pregnant and Postpartum Brahman Cows on Calf Development and Cow Performance. **J. Anim. Sci**, v. 73, n. 2, p. 496-507, 1995.

WONG, F. Y. et al. Combination therapy with gossypol reveals synergism against gemcitabine resistance in cancer cells with high BCL-2 expression. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50786, 2012.

WU, D. et al. Pharmacokinetics of (±)-, (+)-, and (–)-gossypol in humans and dogs. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 39, n. 6, p. 613-618, 1986.

WU, Y. W.; CHIK, C. L.; KNAZEK, R. A. An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13 adrenocortical carcinoma. **Cancer research**, v. 49, n. 14, p. 3754-3758, 1989.

XU, W. et al. The immunosuppressive effect of gossypol in mice is mediated by inhibition of lymphocyte proliferation and by induction of cell apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 5, p. 597-604, 2009.

YANG, J. et al. Synthesis and anti-H5N1 activity of chiral gossypol derivatives and its analogs implicated by a viral entry blocking mechanism. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 9, p. 2619-2623, 2013.

YANG, J. et al. Synthesis and antiviral activities of novel gossypol derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 3, p. 1415-1420, 2012.

YANG, X. et al. Identification and proteomic analysis of a novel gossypol-degrading fungal strain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 943-951, 2012.

YE, W. et al. Modulation of multidrug resistance gene expression in human breast cancer cells by (-)-gossypol-enriched cottonseed oil. **Anticancer research**, v. 27, n. 1A, p. 107-116, 2007.

YILDIRIM, M. et al. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid. **Aquaculture**, v. 219, n. 1, p. 751-768, 2003.

YILDIRIM-AKSOY, M. et al. In vitro inhibitory effect of gossypol from gossypol-acetic acid, and (+)-and (–)-isomers of gossypol on the growth of *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 1, p. 87-92, 2004.

YING, W.; HAI-PENG, L. Hepatotoxicity of gossypol in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 53-64, 1987.

YU, Z-H.; CHAN, H. C. Gossypol as a male antifertility agent–why studies should have been continued. **International journal of andrology**, v. 21, n. 1, p. 2-7, 1998.

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 biology international**, v. 27, n. 9, p. 791-794, 2003.

ZBIDAH, M. et al. Gossypol-induced suicidal erythrocyte death. **Toxicology**, v. 302, n. 2, p. 101-105, 2012.

ZELSKI, R. Z. et al. Gossypol toxicity in preruminant calves. **Australian veterinary journal**, v. 72, n. 10, p. 394-398, 1995.

ZHANG, M. et al. DNA damage and decrease of cellular oxidase activity in piglet sertoli cells exposed to gossypol. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 14, p. 2797-2802, 2011.

ZHANG, W. et al. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science**, v. 111, n. 1, p. 1-9, 2007.

ZHANG, W. et al. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 1, p. 176-186, 2007.

ZHANG, W. et al. Effect of selected fungi on the reduction of gossypol levels and nutritional value during solid substrate fermentation of cottonseed meal. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 9, p. 690-695, 2006.

ZHANG, W. et al. Optimization of process parameters for reduction of gossypol levels in cottonseed meal by *Candida tropicalis* ZD-3 during solid substrate fermentation. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 221-226, 2006.

ZIRKLE, S. M. et al. Effect of gossypol on bovine embryo development during the preimplantation period. **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p. 575-582, 1988.

2 CAPÍTULO 2 - GOSSIPOL PROMOVE DEGENERAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE RATAS

Gossipol promove degeneração de folículos ovarianos de ratas

2.1 RESUMO

RESUMO - O gossipol é bem conhecido por causar efeitos tóxicos no sistema reprodutor masculino, mas os seus efeitos sobre a reprodução feminina foram minimamente descritos e não estão bem esclarecidos. O presente estudo teve como objetivo determinar se o gossipol interfere no ciclo estral e foliculogênese de ratas. Vinte e quatro ratas Wistar foram distribuídas em dois grupos iguais: um grupo controle (injeção de solução salina, por via subcutânea) e o outro tratado com gossipol (25 mg/kg/dia, por via subcutânea) durante 15 dias. As ratas sofreram eutanásia após o último dia do tratamento para coleta de sangue e de fragmentos de ovários, útero e tireoide. As concentrações séricas de estradiol, progesterona, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e hormônio estimulador da tireoide (TSH) foram determinadas por ELISA. Os ovários foram coletados para estudo histológico para avaliação qualitativa e quantitativa dos folículos ovarianos. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordial, primário, secundário ou antral) e como normal ou atrésico. Foi observado que o grupo tratado com gossipol apresentou redução da duração do estro, com um aumento na duração da fase do diestro. Além disto, este composto foi responsável por interferência hormonal, evidenciada pela redução nos níveis séricos de T4 e progesterona. Cinco ratas do grupo tratado apresentaram hidrometra, assim como uma rata do grupo controle. Foi observado que o gossipol foi responsável por uma redução significativa no número de folículos ovarianos normais e um aumento significativo no número de folículos atrésicos, em todas as fases de desenvolvimento. Em média, os ovários de ratas do grupo controle apresentam 83,3% de folículos normais e 16,7% de folículos atrésicos, enquanto que em ratas tratadas com gossipol apresentaram 36,6% e 63,4%, respectivamente. Em conclusão, o gossipol foi responsável pela interferência no ciclo estral de ratas causando uma redução no número de folículos viáveis e alterações nos níveis hormonais.

Palavras chave: toxicologia reprodutiva, antifertilidade, ciclo estral, reprodução feminina

2.2 INTRODUÇÃO

O gossipol é um composto polifenólico produzido pelas glândulas de pigmento presentes nas raízes, caules, folhas, sementes e botões de flores de algodão (*Gossypium* spp). A função deste composto é impedir que vários insetos alimentem-se da planta (GADELHA et al., 2011, 2014). Os sinais de intoxicação do gossipol incluem taxa de diminuição do crescimento, anorexia e dispneia em animais (GADELHA et al., 2014). Outros efeitos incluem danos aos hepatócitos (DEORAS et al., 1997; FONSECA et al., 2013) e citotoxicidade de linfócitos levando à imunodeficiência (XU et al., 2009; BRAGA et al., 2012; SONG et al., 2013).

A toxicidade do gossipol no sistema reprodutor masculino foi avaliada em diversos estudos (ALEXANDER et al., 2008). Esta substância inibe a espermatogênese, diminuindo a quantidade, a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides. O efeito da infertilidade masculina é causado pela lesão mitocondrial específica na cauda do espermatozoide e danos ao epitélio germinal (AKINOLA et al., 2006; TAHA et al., 2006; ROYCHOUDHURY et al., 2009; EL-SHARAKY et al., 2009). O mecanismo de distúrbios ao espermatozoide mediada pelo gossipol inclui a inibição da liberação e da utilização do ATP pelas células espermáticas (ARINBASAROVA et al., 2012) e a inibição do influxo de cálcio e a atividade da Mg-ATPase e da Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas do espermatozoide (BREITBART et al., 1984). Em cultivos de células de Sertoli de suínos, o gossipol também diminuiu a atividade da oxidase celular e causou danos ao DNA (ZHANG et al., 2011). A redução da expressão nuclear de receptores androgênicos foi observada em células de Leydig, células de Sertoli e células mioides de ratos alimentados com farinha de caroço de algodão rica em gossipol (TIMURKAAN et al., 2011).

Apesar do gossipol ser conhecido como responsável por efeitos tóxicos ao sistema reprodutor masculino, existem poucos estudos sobre os seus efeitos na reprodução feminina. A exposição da fêmea ao gossipol foi associada com a interferência no ciclo estral, na gestação e no desenvolvimento embrionário precoce (GADELHA et al., 2011, 2014). O gossipol demonstrou afetar o ciclo estral de roedores (LAGERLÖF; TONE, 1985; LIN et al., 1985) e a função das células da granulosa de suínos (BASINI et al., 2009). Além disto, o gossipol afetou a esteroidogênese ovariana *in vitro* (GU et al., 1990; LIN et al., 1994), bem como a expansão do cúmulus de oócitos de bovinos e a maturação nuclear (LIN et al., 1994). O presente estudo teve

como objetivo determinar se o gossipol interfere no ciclo estral e na foliculogênese ovariana de ratas. Nosso trabalho também propõem um modelo experimental para determinação dos efeitos de substâncias tóxicas sobre o metabolismo ovariano por meio da classificação e quantificação do folículo ovariano.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizadas 24 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), de 60 a 70 dias de vida, pesando cerca de 120 g cada, oriundas do biotério da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró, RN. Durante todo o período do estudo, as ratas foram alojadas em gaiolas de plástico sob condições ambientais controladas com um ciclo de luz/escuro de 12 h e a uma temperatura de 24 ± 3 °C. Foi fornecida ração (Labina, Purina, São Lourenço da Mata, PE, Brasil) e água *ad libitum*. Os estudos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA (Parecer N° 31/2014, Processo N°23091.003576/2014-66) e foram realizados em conformidade com os padrões éticos estabelecidos na Declaração de Helsinki de 1964 e suas posteriores alterações.

2.3.2 Delineamento experimental

Antes de iniciar o experimento, o ciclo estral das ratas foi monitorado duas vezes por dia por meio de lavado vaginal durante sete dias consecutivos; somente as ratas que exibiram ciclos estrais regulares foram utilizadas no estudo. Vinte e quatro ratas foram aleatoriamente e igualmente distribuídas em dois grupos: um grupo controle (tratados com solução salina por via subcutânea) e um grupo tratado com gossipol (25 mg/kg/dia por via subcutânea) durante 15 dias consecutivos.

Os lavados vaginais foram realizados em cada animal todos os dias 07:00h-9:00h e novamente 17:00h-18:00h, utilizando 20 µL de solução de NaCl a 0,9%, com auxílio de uma micropipeta automática (Figura 1). As amostras coletadas foram colocadas em lâminas e analisadas em microscópio de luz. As proporções das células e

morfologia foram utilizadas para a determinação das fases do ciclo estral, caracterizadas como proestro, estro, metaestro e diestro (Figura 2) (MARCONDES et al., 2002).



Figura 1: Realização do lavado vaginal de rata.
Fonte: Arquivo pessoal

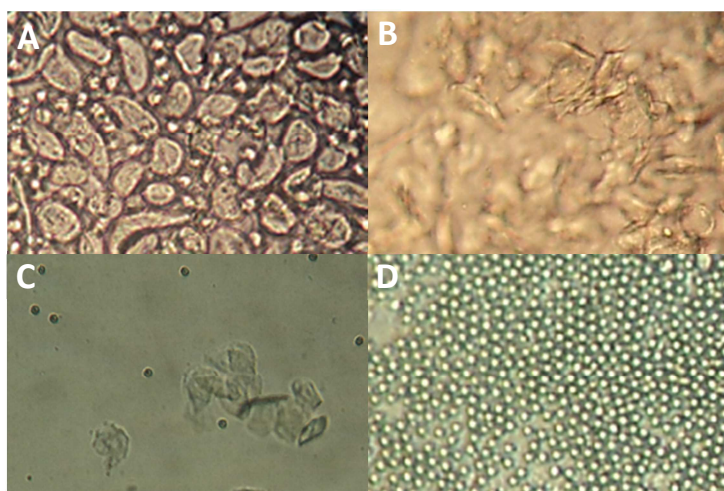


Figura 2: Citologia de lavado vaginas de ratas em diferentes fases do ciclo estral. (A) Proestro, grande quantidade de células basais e parabasais. (B) Estro, presença de células queratinizadas. (C) Metaestro, redução significativa na quantidade de células queratinizadas e início de infiltração leucocitária. (D) Diestro, grande quantidade de células leucocitárias. Fonte: Arquivo pessoal

No dia seguinte após a última dose, as ratas foram anestesiadas por administração intraperitoneal de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg), para coletar os ovários, útero, glândulas da tireoide e amostras de sangue a partir da veia cava (Figura 3).



Figura 3: Coleta de sangue através da punção da veia cava caudal para análise hormonal. Fonte: Arquivo pessoal

2.3.3 Análise hormonal

Foram utilizados soros congelados para a determinação dos níveis séricos de estradiol, progesterona, hormônio luteinizante (LH), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), e hormônio estimulante da tireoide (TSH). Os níveis hormonais foram determinados com o auxílio de um analisador automático ELISA (Elisys Uno, Human, Wiesbaden, Alemanha) com kits específicos (RPC Diagnostic Systems, Nizhny Novgorod, Rússia).

2.3.4 Análise morfológica de folículos ovarianos

Os ovários de cada rata foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Os cortes foram seccionados em 5 μ m de espessura, em intervalos de 60 μ m ao longo do tecido, e corados com H & E.

Foi realizada a análise histológica, incluindo a avaliação qualitativa e quantitativa dos folículos ovarianos. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento como primordial, primário, secundário ou antral (PEDERSEN; PETERS, 1968). Os folículos primordiais foram definidos como aqueles que apresentavam uma camada de células pavimentosas na granulosa, folículos primários apresentavam uma camada de células cuboides na granulosa, folículos secundários apresentavam mais de duas camadas de células cuboides na granulosa e folículos antrais apresentavam a cavidade antral (Figura 4).

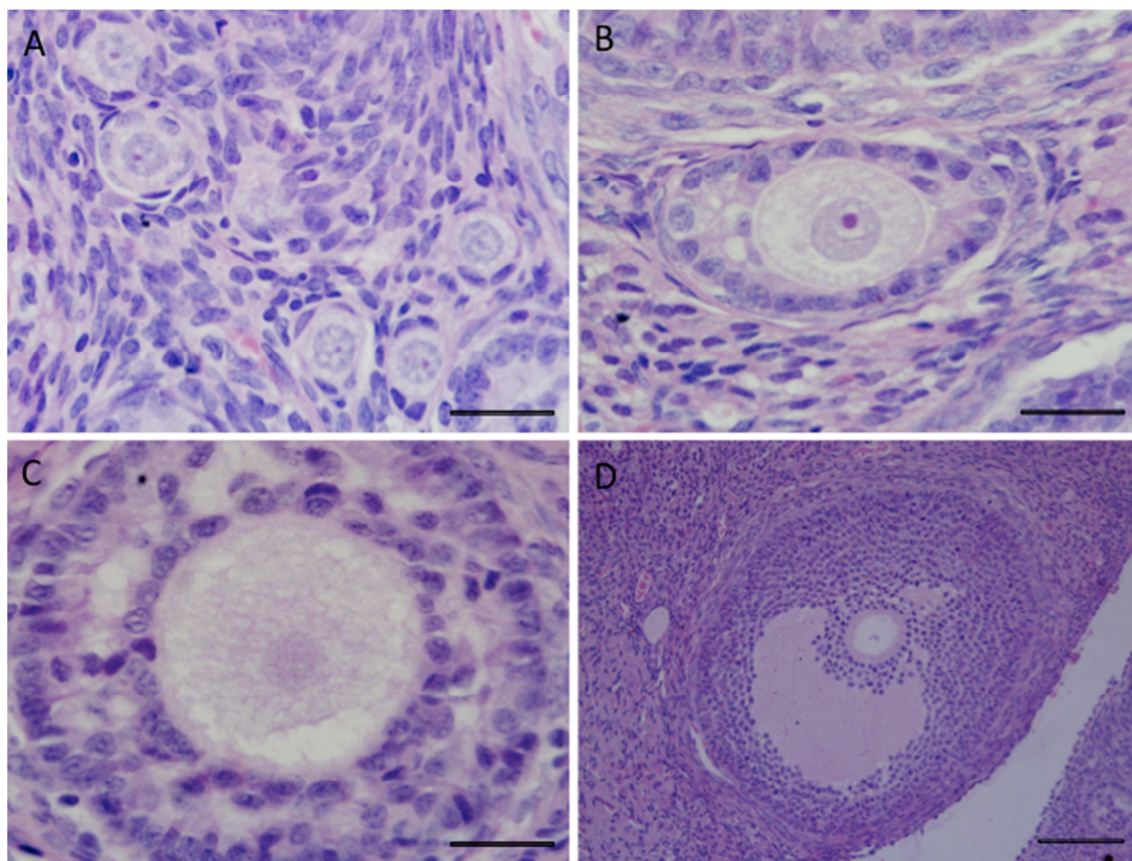


Figura 4: Ovários normais de ratas do grupo controle, mostrando folículos nas fases (A) primordial, (B) primário, (C) secundário (H&E, Barra = 25 μ m), e (D) antral (H&E, Barra = 100 μ m). Fonte: Arquivo pessoal.

Folículos também foram classificados como normais ou atresícos. Os folículos normais apresentaram uma forma regular e células da granulosa bem organizadas, sem sinais de atresia. Os folículos atresícos foram caracterizados por oócitos retraídos, núcleos picnóticos, descontinuidade da membrana basal e células da granulosa desorganizadas (ISRAELY et al., 2003; CAMBONI et al., 2005).

2.3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software R (versão 3.0.0). A normalidade dos dados foi avaliada através de um teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância foi avaliada através de um teste de F. O teste t de Welch foi empregado para comparação das médias e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.4 RESULTADOS

Não foram observados sinais clínicos de intoxicação nas ratas em estudo. Não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos no primeiro e no último dia do experimento, mas o ganho de peso corporal foi significativamente ($P < 0,05$) menor em ratas tratadas com gossipol (Tabela 1).

Com relação ao ciclo estral, o tratamento com gossipol aumentou significativamente ($P < 0,05$) a duração do diestro (Tabela 1). Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes nas demais fases do ciclo estral.

Na necropsia, foi observada hidrometra em cinco ratas tratadas com gossipol e em uma rata do grupo controle. Não foram encontradas lesões histológicas nas glândulas tiroideanas ou no útero das ratas.

Tabela 1: Peso corporal, ganho de peso corporal (em gramas) e duração (em horas) das fases do ciclo estral de ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia) ou 0,9% de solução salina (grupo controle) por via subcutânea durante 15 dias consecutivos.

	Controle (n=12)	Gossipol (n=12)	Valor de P^1
Peso corporal (g)			
Dia 0	190,4±4,32	192,2±7,62	n.s.
Dia 15	197,5±2,91	186,7±6,15	n.s.
Ganho de peso corporal (g)	7,08±2,07	-5,58±2,43	0,0006792
Diestro (h)	44,0±1,71	51,0±2,15	0,01875
Metaestro (h)	1,00±0,67	3,50±1,73	n.s.
Estro (h)	24,5±1,88	20,0±1,71	n.s.
Proestro (h)	26,5±1,16	21,5±2,39	n.s.

¹ teste t de Welch

n.s.: não significativa ($P > 0.05$)

Nossos resultados também verificaram que o gossipol foi responsável pela interferência hormonal, caracterizada por significativa redução ($P < 0,05$) dos níveis séricos T4 e progesterona e um aumento significativo ($P < 0,05$) da relação T3/T4 (Tabela 2). Por outro lado, no grupo tratado com gossipol não foram afetados os níveis séricos de T3, TSH, LH e estradiol.

Tabela 2: Concentrações de estradiol, progesterona, hormônio luteinizante (LH), tiroxina (T4), triiodotironina (T3), e hormônio estimulante da tireoide (TSH) em soro de

ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia) ou solução salina a 0,9% (grupo controle) por via subcutânea durante 15 dias consecutivos.

	Controle (n=12)	Gossipol (n=12)	Valor de P^1
T4 (ng/dl)	2,21±0,10	1,80±0,12	0,01446
T3 (pg/ml)	5,68±0,41	7,73±1,07	n.s.
Relação T3/T4	2,62±0,19	4,62± 0,77	0,02635
TSH (μ IU/ml)	4,00±1,76	3,91±1,75	n.s.
Progesterona (ng/ml)	48,3±7,61	24,5±4,16	0,01317
LH (mIU/ml)	0,22±0,04	0,21±0,04	n.s.
Estradiol (pg/ml)	10,7±3,83	16,7±4,53	n.s.

¹ teste t de Welch

n.s.: não significante ($P>0,05$)

Além disso, o tratamento com gossipol foi responsável por uma redução significativa ($P<0,05$) do número de folículos ovarianos normais e um aumento significativo ($P<0,05$) no número de folículos atresicos, em todas as fases de desenvolvimento (Tabela 3 e Figura 5). Em média, os ovários de ratas do grupo controle apresentaram 83,3% de folículos normais e 16,7% de folículos atresicos, enquanto as ratas tratadas com gossipol tiveram taxas de incidência de folículos normais e atresicos de 36,6% e 63,4%, respectivamente.

Tabela 3: Populações de folículos ovarianos de ratas tratadas com gossipol (25 mg/kg/dia) ou solução salina a 0,9% (grupo controle) por via subcutânea durante 15 dias consecutivos.

Folículos	Controle (n=12)	Gossipol (n=12)	Valor de P^1
Número de folículos normais			
Primordial	341,8±25,6	122,6±20,1	<0,0001
Primário	115,5±14,8	49,0±5,03	0,0008635
Secundário	62,6±11,3	20,1±4,54	0,003426
Antral	55,8±6,52	14,5±3,71	<0,0001
Total	575,6±51,8	206,2±27,9	<0,0001
Número de folículos atresicos			
Primordial	66,3±10,7	168,3±24,1	0,001489
Primário	22,5±2,32	65,8±6,99	<0,0001
Secundário	22,2±4,26	71,7±9,44	0,00023
Antral	8,08±1,52	39,6±3,95	<0,0001
Total	119,1±12,8	345,4±32,8	<0,0001
Proporção de folículos (em %)			
Normal	82,2±2,05	36,6±1,73	<0,0001
Atresico	17,8±2,05	63,4±1,73	<0,0001
Número total de folículos			
Total	694,7±54,5	551,6±57,2	n.s.

¹ teste t de Welch

n.s.: não significante ($P > 0,05$)

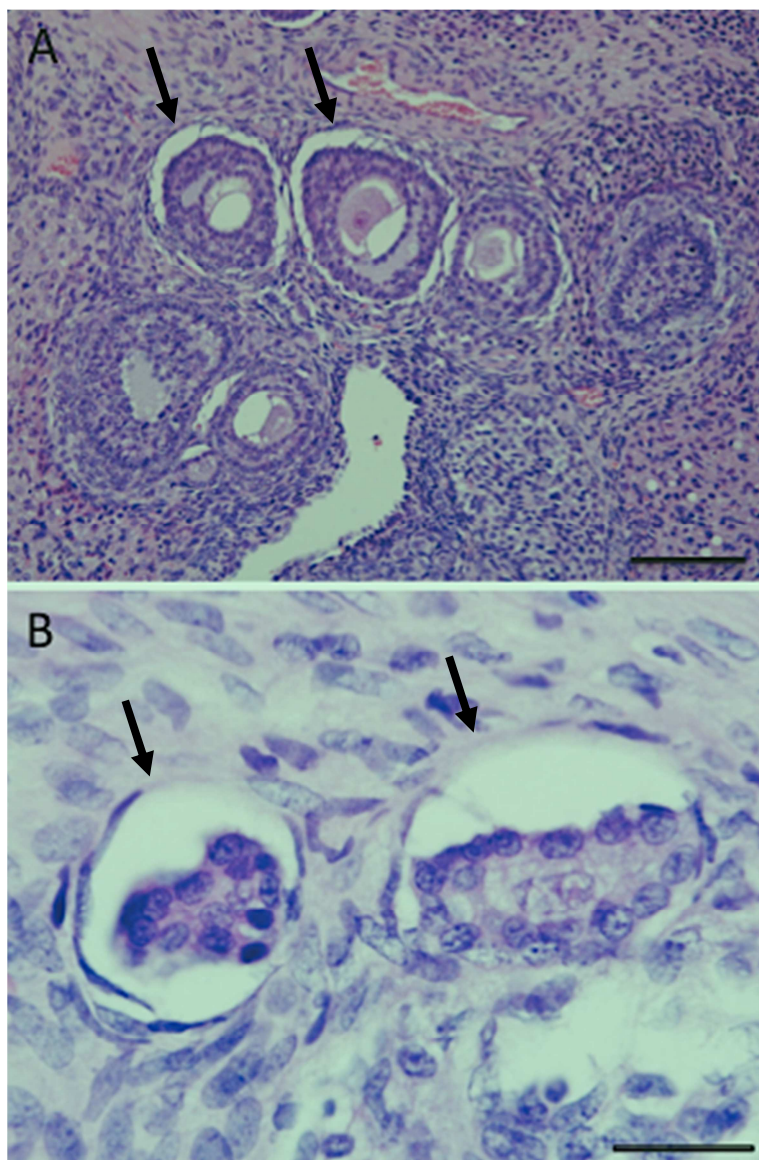


Figura 5: (A) Ovários de ratas tratadas com gossipol apresentando atresia nos folículos antrais (H&E, Barra = 100 μ m). (B) Folículos primários atresícos de uma rata tratada com gossipol (H&E, Barra = 25 μ m). Fonte: Arquivo pessoal.

2.5 DISCUSSÃO

Foi verificado que o tratamento com o gossipol resultou em aumento na duração das fases de diestro e metaestro (cerca de 116% e 350% dos controles, respectivamente) e redução da duração dos estágios de proestro e estro (ambos cerca de 81% dos controles). Interferências no ciclo estral também foram observadas por outros (LAGERLÖF; TONE, 1985; LIN et al., 1985). Em ratas, a administração de 20 mg/kg de gossipol-ácido acético, oralmente durante 60 dias (LAGERLÖF; TONE, 1985) e de

25 mg/kg de gossipol-ácido acético administrado através de injeção intramuscular de 3 a 5 dias (LIN et al., 1985), causando ciclos estrais prolongados e irregulares. As ratas tratadas com doses de 60 mg/kg de gossipol-ácido acético durante 30 dias apresentaram números reduzidos de ciclos estrais, o que não ocorreu quando foram tratadas com 40 mg/kg de gossipol (BENDER et al., 1988). De modo semelhante ao nosso estudo, a percentagem de animais em diestro foi maior em ratas tratadas com 5 ou 10 mg de gossipol/kg/dia, por via subcutânea durante 20 dias (GU; ANDERSON, 1985). Por outro lado, o tratamento com gossipol não demonstrou nenhum efeito sobre a ovulação em ratas (HAHN et al., 1981), e não alterou os ciclos estrais em hamsters (WU et al., 1981).

No presente estudo, foi verificado que o gossipol é responsável por interferência hormonal, como evidenciado pelos níveis séricos reduzidos de progesterona e T4, e um aumento da proporção T3/T4. Redução nos níveis séricos de progesterona foi relatado em ratas que receberam 25 mg/kg de gossipol-ácido acético por injeção intramuscular durante 3 a 5 dias (LIN et al., 1985) e em ratas prenhes, com administração por via oral de 60, 90 e 120 mg/kg/dia de gossipol-ácido acético nos primeiros 10 dias após o coito (YANG; WU, 1987). Os dados dos estudos *in vitro* indicam que o gossipol inibe a secreção de progesterona em células lúteas (GU et al., 1990; NAI-GONG et al., 1987), células da granulosa de folículos pequenos (VRANOVÁ et al., 1999) e complexos cumulus-oócito isoladas de grandes folículos antrais de suínos (KOLENA et al., 2001). Vários mecanismos podem estar envolvidos na inibição da síntese de progesterona, incluindo a inibição da adenilato-ciclase (LIN et al., 1985; NAI-GONG et al., 1987) e 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (GU et al., 1990), bem como a produção de óxido nítrico (VRANOVÁ et al., 1999). Assim, a interferência da esteroidegênese ovariana pode ser o mecanismo pelo qual o gossipol interfere no ciclo estral.

O gossipol é também um composto anti-tiroidiano (RIKIHISA; LIN., 1989; LIN et al., 1990). As ratas do presente estudo apresentaram redução nos níveis séricos de T4 livre e um aumento da relação T3/T4. Estudos anteriores com ratos machos (RIKIHISA; LIN, 1989) e fêmeas (LIN et al., 1990) mostraram diminuição dos níveis sanguíneos de T4 livre e T3 após administração de gossipol-ácido acético. Além disso, a avaliação histopatológica das glândulas da tireoide de ratos revelou degeneração e atrofia folicular (RIKIHISA; LIN, 1989), mas nenhuma alteração histológica foi observada na glândula tireoide em nosso estudo. Níveis reduzidos de T3 também foram observados em coelhos, mas esta redução foi revertida quando a dosagem foi interrompida (TAHA et

al., 2006). No entanto, outros trabalhos verificaram que a administração de gossipol resultou em aumento dos níveis séricos de T3, sem afetar T4, em ratos (TANG; WONG, 1984) e ovelhas (EL-MOKADEM et al., 2012). As células tireotróficas da glândula pituitária, que são especializadas em síntese e secreção do TSH, apresentaram hipertrofia, hiperplasia e degranulação após a administração de acetato de gossipol em ratos (UDOH et al., 1992). Este achado difere dos nossos resultados, que indicam que os níveis de TSH não foram afetados pelo tratamento gossipol. Embora estes resultados sejam conflitantes, há um consenso geral de que o gossipol interfira no metabolismo da glândula tireoide, mas o mecanismo é incerto.

O tratamento com gossipol foi também responsável por uma redução significativa no número de folículos normais e um aumento significativo do número de folículos atresícos em todas as fases de desenvolvimento. Em média, os ovários das ratas do grupo controle apresentaram 82,2% de folículos normais e 17,8% folículos atresícos, enquanto que as ratas tratadas com gossipol tiveram 36,6% de folículos normais e 63,4% folículos atresícos. Em decorrência do tratamento com gossipol, todos os tipos de células foliculares normais foram reduzidos em cerca de um terço e os tipos de células atresícas foram aumentados em cerca de três vezes. No mesmo sentido, o peso ovariano foi reduzido em ratas tratadas com 5 ou 10 mg de gossipol/kg/dia por via subcutânea durante 20 dias (GU; ANDERSON., 1985). Por outro lado, não foram encontradas lesões patológicas nos ovários de ratas tratadas com 40 ou 60 mg/kg de gossipol-ácido acético por 30 dias (BENDER et al., 1988). No entanto, em ambos os estudos (GU; ANDERSON., 1985; BENDER et al., 1988), os folículos ovarianos não foram classificados nem contados. Assim, a classificação e a contagem de folículos ovarianos usados em nosso estudo podem ser uma ferramenta útil para o estudo de compostos que potencialmente afetem a gametogênese feminina.

Em fêmeas mamíferas, o número de folículos primordiais do ovário é fixado no momento do nascimento. Os folículos primordiais desenvolvem-se em folículos primários, secundários e antrais em um processo contínuo e irreversível. O dano aos folículos primários, secundários e antrais pode levar à infertilidade temporária, quando os folículos primordiais não forem afetados. Por outro lado, a lesão dos folículos primordiais pode resultar em infertilidade permanente devido a eventual depleção do conjunto destes folículos (HIRSHFIELD, 1997). Portanto, é possível especular que a exposição ao gossipol possa reduzir a reserva de folículos nos ovários, prejudicando a fertilidade feminina. No entanto, o gossipol não parece ser uma droga potente para

promover a castração química de fêmeas devido a sua toxicidade, que no nosso estudo foi evidenciada pela perda de peso corporal.

Em um experimento *in vitro* com células da granulosa de suínos, foi observado que o gossipol inibiu a atividade esteroidogênica e o estado redox e estimulou a produção do fator de crescimento endotelial vascular (BASINI et al., 2009). Além disso, o gossipol apresentou atividade citotóxica e apoptótica em linhagens celulares de carcinoma de ovário (ATMACA et al., 2009; WANG et al., 2013). Devido ao aumento da atresia folicular, a foliculogênese pode ser severamente afetada pela ação deste composto, reduzindo drasticamente a taxa de concepção das fêmeas expostas. Na verdade, as ratas que receberam 20 mg/kg/dia de gossipol-ácido acético durante 60 dias apresentaram prolongamento do tempo para o acasalamento, uma taxa reduzida de prenhez e de embriões viáveis quando comparados com os controles (LAGERLÖF; TONE, 1985). Além disso, é provável que as fêmeas expostas terão senescência reprodutiva precoce.

Uma observação interessante feita na necropsia foi a ocorrência de hidrometra em cinco ratas do grupo tratado com gossipol e uma rata do grupo controle. Alta incidência de infertilidade e atrofia do útero foi observada em mulheres expostas ao gossipol através da ingestão de óleo de algodão na China (ALEXANDER et al., 2008). Assim, o aumento da frequência de hidrometra deve ser um dos efeitos do gossipol, o que provavelmente contribuiu para a infertilidade das fêmeas expostas através da ingestão de sementes de algodão.

2.6 CONCLUSÕES

O tratamento com gossipol foi responsável por interferência no ciclo estral de ratas. Esta interferência ocorreu em decorrência da redução do número de folículos viáveis, bem como as alterações hormonais, que podem afetar negativamente a reprodução feminina. Os resultados do presente estudo mostram a relevância da classificação e quantificação dos folículos ovarianos associadas à determinação do ciclo estral para a avaliação da toxicidade reprodutiva nas fêmeas, especialmente em estudos que visem determinar os efeitos de substâncias tóxicas sobre o metabolismo dos ovários.

REFERÊNCIAS

AKINOLA, O. B. et al. Proteinaceous diet inhibits gossypol-induced spermatotoxicity. **European Journal of Histochemistry**, v. 50, n. 3, p. 205-208, 2006.

ALEXANDER, J. et al. Gossypol as undesirable substance in animal feed: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **The EFSA Journal**, n. 908, p. 1-55, 2008.

ARINBASAROVA, A. Y.; MEDENTSEV, A. G.; KRUPYANKO, V. I. Gossypol inhibits electron transport and stimulates ROS generation in *Yarrowia lipolytica* mitochondria. **The open biochemistry journal**, v. 6, p. 11-15, 2012.

ATMACA, H. et al. Combined gossypol and zoledronic acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates angiogenic molecules in ovarian cancer cells. **European cytokine network**, v. 20, n. 3, p. 121-130, 2009.

BASINI, G. et al. Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function. **Domestic animal endocrinology**, v. 37, n. 1, p. 30-36, 2009.

BENDER, H. S.; SAUNDERS, G. K.; MISRA, Hara P. A histopathologic study of the effects of gossypol on the female rat. **Contraception**, v. 38, n. 5, p. 585-592, 1988.

BRAGA, A. P. et al. Extruded-expelled cottonseed meal decreases lymphocyte counts in male sheep. **Revue de Medecine Veterinaire**, 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. **International journal of andrology**, v. 7, n. 5, p. 439-447, 1984.

CAMBONI, A. et al. Contribution of transmission electron microscopy to the study of human ovarian tissue integrity after enzymatic isolation, cryopreservation or xenografting. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. S104, 2005.

CHENOWETH, P. J. et al. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1193-1203, 2000.

DEORAS, D. P. et al. Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats. **Veterinary research communications**, v. 21, n. 5, p. 317-323, 1997.

EL-MOKADEM, M. Y. et al. Alleviation of reproductive toxicity of gossypol using selenium supplementation in rams. **Journal of animal science**, v. 90, n. 9, p. 3274-3285, 2012.

EL-SHARAKY, A. S. et al. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3354-3361, 2010.

FONSECA, N. B. S. et al. Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 149-153, 2013.

GADELHA, I. C. N. et al. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 129-135, 2011.

GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol toxicity from cottonseed products. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 231635, 2014.

GU, Y. et al. Inhibitory effect of gossypol on human chorionic gonadotropin (hCG)-induced progesterone secretion in cultures bovine luteal cells. **Life sciences**, v. 47, n. 5, p. 407-414, 1990.

GU, Y.; ANDERSON, N. O. Effects of gossypol on the estrous cycle and ovarian weight in the rat. **Contraception**, v. 32, n. 5, p. 491-496, 1985.

GU, Y.; LIN, Y. C.; RIKIHISA, Y. Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 169, n. 2, p. 455-461, 1990.

HAHN, D. W. et al. Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents. **Contraception**, v. 24, n. 1, p. 97-105, 1981.

HASSAN, M. E. et al. Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1171-1179, 2004.

HIRSHFIELD, A. N. Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 29, n. 1, p. 10-15, 1997.

ISRAELY, T. et al. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 6, p. 2055-2064, 2003.

KOLENA, J. et al. Gossypol inhibits follicle-stimulating hormone-and epidermal growth factor-stimulated expansion of oocyte-cumulus complexes from porcine preovulatory follicles. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 627-630, 2001.

LAGERLÖF, R. K.; TONE, J. N. The effect of gossypol acetic acid on female reproduction. **Drug and chemical Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 469-482, 1985.

LIN, Y. C. et al. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life sciences**, v. 37, n. 1, p. 39-47, 1985.

LIN, Y. C.; CHITCHAROENTHUM, M.; RIKIHISA, Y. Effect of gossypol on thyroid hormones in young female rats. **Contraception**, v. 41, n. 4, p. 431-440, 1990.

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

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

NAI-GONG, W.; MU-ZHEN, G.; HAI-PENG, L. Effects of gossypol acetic acid on rat luteal cells in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 45-51, 1987.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 17, n. 3, p. 555-557, 1968.

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

ROMUALDO, G. S.; KLINEFELTER, G. R.; KEMPINAS, W. de G. Postweaning Exposure to Gossypol Results in Epididymis-Specific Effects Throughout Puberty and Adulthood in Rats. **Journal of andrology**, v. 23, n. 2, p. 220-228, 2002.

ROYCHOUDHURY, Shubhadeep et al. In vitro gossypol induced spermatozoa motility alterations in rabbits. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 44, n. 7, p. 730-741, 2009.

SONG, B. et al. Gossypol suppresses mouse T lymphocytes via inhibition of NF κ B, NFAT and AP-1 pathways. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, n. 5, p. 615-621, 2013.

TAHA, T. A. et al. Reproductive toxicological effects of gossypol on male rabbits: semen characteristics and hormonal levels. **Animal Science**, v. 82, n. 02, p. 259-269, 2006.

TANG, F.; WONG, P. Y. D. Serum potassium and aldosterone levels in gossypol-treated rats. **International journal of andrology**, v. 7, n. 2, p. 149-153, 1984.

TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; TIMURKAAN, S. Effects of cottonseed flour on immunohistochemical localization of androgen receptors (AR) in rat testes. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 162, n. 1, p. 13-17, 2011.

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.

VRANOVÁ, J. et al. Inhibitory effect of gossypol on basal and luteinization factor-stimulated progesterone synthesis in porcine granulosa cells. **Physiological research**, v. 48, n. 2, p. 119-128, 1999.

WANG, J. et al. Gossypol induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 6, p. 1489-1497, 2013.

WU, Y. M.; CHAPPEL, S. C.; FLICKINGER, G. L. Effects of gossypol on pituitary-ovarian endocrine function, ovulation and fertility in female hamsters. **Contraception**, v. 24, n. 3, p. 259-268, 1981.

XU, W. et al. The immunosuppressive effect of gossypol in mice is mediated by inhibition of lymphocyte proliferation and by induction of cell apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 5, p. 597-604, 2009.

YANG, Y. Q.; WU, X. Y. Antifertility mechanisms of gossypol acetic acid in female rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 80, n. 2, p. 425-429, 1987.

ZHANG, M. et al. DNA damage and decrease of cellular oxidase activity in piglet sertoli cells exposed to gossypol. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 14, p. 2797-2802, 2011.

3 CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO *IN VITRO* DA AÇÃO DO GOSSIPOL SOBRE FOLÍCULOS OVARIANOS DE ROEDORES E GALINHAS

Estudo comparativo *in vitro* da ação do gossipol sobre folículos ovarianos de roedores e galinhas

3.1 RESUMO

RESUMO: O gossipol interfere na reprodução, causando danos aos espermatozoides, prolongando as fases do ciclo estral e promovendo letalidade embrionária. Galinhas expostas a este composto apresentam redução na produção dos ovos. Em ratas, foi verificado que a administração do gossipol promove degeneração dos folículos ovarianos, mas não se sabe se esse efeito é direto ou indireto. Desta forma, o objetivo deste trabalho é determinar se há interferência do gossipol sobre a foliculogênese *in vitro* em ratas, camundongas e galinhas. Foram obtidos 32 ovários de ratas e camundongas e quatro de galinhas. Os ovários das ratas e de camundongas, e fragmentos dos ovários de galinhas foram cultivadas em placas de 24 poços de cultura de células contendo 1 ml de meio de cultura (meio α -MEM suplementado com 2,0 mM de glutamina, 2,0 mM de hipoxantina, 1,25 mg/ml de albumina sérica bovina e 50 ug/mL de ácido ascórbico). Foram testadas quatro concentrações de gossipol: 0 (controle), 5, 10 e 20 ug/mL. Todas as placas foram incubadas a 39 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas e sete dias. Após a incubação, os ovários foram fixados e processados para análise histológica. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e como viáveis ou atresícos. Foi verificado que todas as concentrações de gossipol aumentaram as proporções de folículos atresícos em todas as fases do desenvolvimento de ambas espécies, sendo proporcionalmente mais intensa no ovários das galinhas do que em ratas e camundongas. Assim, o gossipol pode afetar diretamente a maturação folicular, interferindo na fertilidade feminina. No presente estudo o melhor modelo experimental para a avaliação *in vitro* dos efeitos tóxicos do gossipol sobre os folículos ovarianos revelou ser com ovários de galinhas.

Palavras chave: foliculogênese, infertilidade, ovários.

3.2 INTRODUÇÃO

O gossipol é um composto polifenólico produzido pelas glândulas de pigmento presentes nas raízes, caules, folhas, sementes e botões florais do algodão (*Gossypium* spp). Esta planta é largamente cultivada para produção da fibra, empregada pela indústria têxtil, e do óleo, utilizado como alimento e biocombustível. Após a extração destes produtos, são obtidos os subprodutos caroço, farelo e torta de algodão. Estes subprodutos são muito utilizados para alimentação animal, principalmente animais de produção, pois são altamente nutritivos e possuem baixo custo (GADELHA et al., 2014a).

A toxicidade deste composto para a reprodução dos machos foi descrita por diversos autores (CHENOWETH et al., 2004; EL-SHARAKY et al., 2010; GADELHA et al., 2014a). A infertilidade ocorre por meio da inibição da motilidade dos espermatozoides, diminuição da concentração espermática, indução de lesão mitocondrial específica na cauda do espermatozoide e danos ao epitélio germinativo (RANDEL et al., 1992). Contudo, tais efeitos são reversíveis quando a ingestão do gossipol é cessada (HASSAN et al., 2004).

Ao contrário do que ocorre com machos, a toxicidade reprodutiva do gossipol para as fêmeas foi pouco estudada. Neste sentido, foi verificado que fêmeas expostas a este composto podem apresentar interferência no ciclo estral de roedores (LIN et al., 1985; ADEYEMO; LONGE, 2007; GADELHA et al., 2014b), na função das células da granulosa em suínos (BASINI et al., 2009), na gestação e no desenvolvimento embrionário inicial (RANDEL et al., 1992, 1996; GADELHA et al., 2011, 2014a,b). Além disso, os ovários de novilhas alimentadas com o farelo de algodão tiveram menor número de folículos grandes (> 5 mm) do que as novilhas que consumiram farelo de soja (RANDEL et al., 1996). Ratas tratadas com gossipol apresentaram uma redução significativa no número de folículos normais e um aumento significativo do número de folículos atrésicos em todas as fases de desenvolvimento. Em média, os ovários das ratas do grupo controle apresentaram 83,3% de folículos normais e 16,7% folículos atrésicos, enquanto que as ratas tratadas com gossipol tiveram 36,6% de folículos normais e 63,4% folículos atrésicos (GADELHA et al., 2014b). É provável que o gossipol possa afetar diretamente os folículos ovarianos, mas esta hipótese ainda não foi confirmada experimentalmente.

Em galinhas poedeiras alimentadas com farelo de algodão, o gossipol residual foi responsável por redução na produção (REID et al., 1987; FITZSIMMONS et al., 1989; PANIGRAHI et al., 1989) e peso dos ovos (PANIGRAHI et al., 1989), além de promover alteração na coloração da gema e/ou clara (LORDELO et al., 2007; PANIGRAHI et al., 1989; PANIGRAHI; HAMMONDS, 1990; PANIGRAHI, 1992; PANIGRAHI; PLUMB, 1996). A completa interrupção da postura também foi descrita (FITZSIMMONS et al., 1989). No entanto, nenhum trabalho até o momento determinou se o gossipol afeta os folículos ovarianos das galinhas.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar se o gossipol interfere nos folículos ovarianos *in vitro* de ratas, camundongas e galinhas, por meio da classificação e quantificação de folículos, observar efeito dose-resposta e comparar os resultados entre as espécies em estudo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais

Foram utilizadas 16 ratas Wistar adultas e 16 camundongas da linhagem Balb-C adultas, oriundas do biotério da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), Mossoró, RN. Durante todo o período do estudo, as ratas foram alojadas em gaiolas de plástico sob condições ambientais controladas com um ciclo de luz/escuro de 12 horas e temperatura de 24 ± 3 °C. A alimentação foi feita com ração específica para as ratas (Labina, Purina, São Lourenço da Mata, PE, Brasil) e camundongas (Nuvilab CR1, Sogorb, São Paulo, SP, Brasil), e a água foi oferecida *ad libitum*.

Também foram utilizadas quatro galinhas da raça Bantan (galinhas exóticas pequenas), oriundas de uma criação caipira em Limoeiro do Norte, CE. Os animais eram criados soltos e a alimentação era suplementada com farelo de milho.

As ratas e as camundongas foram anestesiadas (35 mg/kg de xilazina e 70 mg/kg cetamina) e posteriormente sacrificadas por exsanguinamento, enquanto as galinhas foram sacrificadas por deslocamento cervical. Foram obtidos 32 ovários de ratas e de camundongas, e quatro de galinhas, que foram isolados com o auxílio de instrumentos cirúrgicos em condições assépticas. Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% e, em seguida, duas vezes em α -MEM Meio Essencial Mínimo alfa acrescido de antibióticos (100 μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina).

3.3.2 Cultivo dos ovários

Os ovários coletados das ratas e camundongas, foram cultivados em placas de 24 poços de cultivo de células contendo 1,0 mL de meio de cultivo (meio α -MEM, suplementado com glutamina 2,0 mM, 2,0 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina de soro bovino-BSA e 50 μ g/mL de ascórbico ácido). Foram testados em quatro concentrações de gossipol: 0 (controle), 5, 10 e 20 μ g/mL. Todas as placas foram incubadas a 39°C e 5% de CO₂ (Panasonic CO₂ Incubator MCO-18AC) durante 24 horas e durante sete dias. O meio de cultivo foi renovado a cada 2 dias. Após a incubação, os ovários foram fixados em Carnoy (60% de etanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) por 12 horas, em seguida em álcool 70% e processados para análise histológica após coloração por hematoxilina e eosina. Os folículos ovarianos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento como primordial, transição, primário, secundário ou antral. Os folículos também foram classificados como viáveis ou atresícos. Os folículos viáveis apresentaram um formato regular e células da granulosa organizadas, sem sinais de atresia. Os folículos atresícos foram caracterizados por oócitos retraídos, núcleo picnótico, membrana basal interrompida e células da granulosa desorganizadas.

Os ovários das galinhas foram fragmentados com auxílio de instrumentos cirúrgicos e lâminas de bisturi estéreis. Um fragmento de ovário foi fixado em solução de Carnoy durante 12 horas (para controle *in situ*) para análise histológica. Os outros fragmentos foram cultivados da mesma forma aos ovários das ratas.

3.3.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o *software* R (versão 3.0.3) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009). As frequências de folículos viáveis e atresícos totais e de cada tipo de folículo foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido como $P < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Ratas

As proporções das diferentes classes de folículos ovarianos de ratas cultivados na ausência (controle) e em diferentes concentrações de gossipol (5, 10 e 20 µg/ml) por 24 horas e sete dias estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A frequência de folículos ovarianos atrésicos totais foi significativamente ($P < 0,05$) maior nos tratamentos com gossipol do que no grupo controle, tanto no cultivo por 24 horas quanto por sete dias. Em média, os fragmentos ovarianos do grupo controle apresentaram 57,6% de folículos viáveis e 42,4% de folículos atrésicos, enquanto que os fragmentos ovarianos submetidos ao gossipol nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL por 24 horas obtiveram 62,9%; 78,1% e 75,2% de folículos atrésicos, respectivamente. Esta quantidade aumentou para 76,9%; 77,6% e 79,4% de folículos atrésicos quando cultivados com gossipol nas mesmas concentrações por sete dias, sendo 40,5% no grupo controle. O número de folículos ovarianos primordiais foi insuficiente para a realização da análise estatística. Nos demais tipos de folículos ovarianos, a maior frequência de folículos atrésicos e consequente menor frequência de folículos viáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) nos dois tempos de incubação, exceto os folículos primários após incubação por 24 horas.

Tabela 1: Frequências (em %) de folículos ovarianos em ovários de ratas cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por 24 horas.

Folículos	Gossipol (em µg/ml)				P ^a
	0	5	10	20	
Primordiais					
viáveis	33,3 (1/3)	81,8 (9/11)	0	25 (4/16)	n.d.
atrésicos	66,6 (2/3)	17,2 (2/11)	0	75 (12/16)	
Transição					
viáveis	68,4 (13/19)	77,8 (14/18)	25 (2/8)	22,7 (5/22)	<0,001
atrésicos	31,6 (6/19)	22,2 (4/18)	75 (6/8)	77,3 (17/22)	
Primários					
viáveis	85,7 (24/28)	55,2 (16/29)	50 (15/30)	45,5 (15/33)	n.s.
atrésicos	14,3 (4/28)	44,8 (13/29)	50 (15/30)	54,5 (18/33)	
Secundários					
viáveis	48,5 (33/68)	28,1 (18/64)	19,1 (18/94)	24,6 (15/61)	<0,001
atrésicos	51,5 (35/68)	71,9 (46/64)	80,9 (76/94)	75,4 (46/61)	
Antrais					
viáveis	35,7 (5/14)	11,1 (5/45)	0	3,4 (1/29)	<0,01
atrésicos	64,3 (9/14)	88,9 (40/45)	100 (28/28)	96,6 (28/29)	
Total					
viáveis	57,6 (76/132)	37,1 (62/167)	21,9 (35/160)	24,8 (40/161)	<0,0001
atrésicos	42,4 (56/132)	62,9 (105/167)	78,1 (125/160)	75,2 (121/161)	

^a Teste Exato de Fisher; n.d.: não determinado; n.s.: não significante ($P > 0,05$)

Tabela 2: Frequências (em %) de folículos ovarianos em ovários de ratas cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por sete dias.

Folículos	Gossipol (em µg/ml)				P ^a
	0	5	10	20	
Primordiais					
viáveis	0	0	30 (3/10)	0	n.d.
atrésicos	0	0	70 (7/10)	100 (1/1)	
Transição					
viáveis	95,2 (20/21)	38,1 (8/21)	38,5 (10/26)	25 (6/24)	<0,0001
atrésicos	4,8 (1/21)	61,9 (13/21)	61,5 (16/26)	75 (18/24)	
Primários					
viáveis	85,2 (23/27)	53,3 (16/30)	44,4 (16/36)	36,6 (15/41)	<0,001
atrésicos	14,8 (4/27)	46,7 (14/30)	55,6 (20/36)	63,4 (26/41)	
Secundários					
viáveis	43,3 (26/60)	14,8 (12/81)	10 (5/50)	17,1 (12/70)	<0,0001
atrésicos	56,7 (34/60)	85,2 (69/81)	90 (50/90)	82,9 (58/70)	
Antrais					
viáveis	23,1 (3/13)	3,6 (1/28)	0	0	<0,01
atrésicos	76,9 (10/13)	94,4 (27/28)	100 (30/30)	100 (24/24)	
Total					
viáveis	59,5 (72/121)	23,1 (37/160)	22,4 (34/152)	20,6 (22/160)	<0,0001
atrésicos	40,5 (49/121)	76,9 (123/160)	77,6 (118/152)	79,4 (127/160)	

^a Teste Exato de Fisher; n.d.: não determinado

3.4.2 Camundongas

Os folículos ovarianos de camundongas cultivados nas diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por 24 horas e sete dias estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Os folículos classificados como viáveis e atrésicos apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) na percentagem total, sendo maior o número de atrésicos do que nos tratamentos com gossipol, tanto no cultivo por 24 horas quanto por sete dias. A amostra de folículos ovarianos primordiais foi insuficiente para a realização da análise estatística, e a de antrais não foi significativa no cultivo por 24 horas. A taxa de folículos atrésicos totais foi maior conforme o aumento na concentração de gossipol.

Tabela 3: Populações (em %) de folículos ovarianos em fragmentos de ovários murinos cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 µg/ml) por 24 horas.

Folículos	Gossipol (em µg/ml)				P^a
	0	5	10	20	
Primordiais					
viáveis	100 (3/3)	0	0	100 (7/7)	n.d.
atrésicos	0	0	0	0	
Transição					
viáveis	82,4 (28/34)	26,1 (6/23)	13,9 (5/36)	18,9 (7/37)	<0,0001
atrésicos	17,6 (6/34)	73,9 (17/23)	86,1 (31/36)	81,1 (30/37)	
Primários					
viáveis	52,6 (10/19)	24,3 (9/37)	15,2 (5/33)	37,5 (9/24)	0,02457
atrésicos	47,4 (9/19)	75,7 (28/37)	84,8 (28/33)	62,5 (15/24)	
Secundários					
viáveis	52,9 (27/51)	35,3 (18/51)	25,0 (12/48)	14,6 (6/41)	0,000729
atrésicos	47,1 (24/51)	64,7 (33/51)	75,0 (36/48)	85,4 (35/41)	
Antrais					
viáveis	76,9 (10/13)	88,9 (8/9)	66,7 (2/3)	45,5 (5/11)	n.s.
atrésicos	23,1 (3/13)	11,1 (1/9)	33,3 (1/3)	54,5 (6/11)	
Total					
viáveis	65,0 (78/120)	34,2	20,0	28,3 (34/120)	<0,0001
atrésicos	35,0 (42/120)	(41/120)	(24/120)	71,7 (86/120)	
		65,8	80,0		
		(79/120)	(96/120)		

^a Teste Exato de Fisher; n.d.: não determinado; n.s.: não significativo ($P < 0,05$)

Os percentuais de folículos ovarianos viáveis e atrésicos cultivadas por sete dias evidenciaram diferença significativa ($P < 0,05$) nos folículos de transição e primários (Tabela 4). A quantidade de folículos viáveis foi maior do que de folículos atrésicos após cultivo sem gossipol (86%), enquanto os ovários cultivados com gossipol apresentaram predomínio de folículos atrésicos em todas as concentrações dos folículos de transição (88,9%, 81,3% e 70,4%). Também foi observado que os folículos viáveis após o cultivo sem gossipol eram maioria em relação aos folículos atrésicos nos ovários cultivados com gossipol.

Tabela 4: Populações (em %) de folículos ovarianos em fragmentos de ovários murinos cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) por 7 dias.

Folículos	Gossipol (em $\mu\text{g/ml}$)				P^a
	0	5	10	20	
Primordiais					
viáveis	66,7 (4/6)	100 (2/2)	0	0	n.d.
atrésicos	33,3 (2/6)	0	100 (1/1)	0	
Transição					
viáveis	86,0 (37/43)	11,1 (3/27)	18,8 (9/48)	29,6 (16/54)	<0,0001
atrésicos	14,0 (6/43)	88,9 (24/27)	81,3 (39/48)	70,4 (38/54)	
Primários					
viáveis	76,0 (19/25)	59,5 (25/42)	66,7 (16/24)	10,0 (2/20)	<0,0001
atrésicos	24,0 (6/25)	40,5 (17/42)	33,3 (8/24)	90,0 (18/20)	
Secundários					
viáveis	32,6 (14/43)	12,8 (6/47)	20,9 (9/43)	15,6 (7/45)	n.s.
atrésicos	67,4 (29/43)	87,2 (41/47)	79,1 (34/43)	84,4 (38/45)	
Antrais					
viáveis	33,3 (1/3)	50,0 (1/2)	25,0 (1/4)	100 (1/1)	n.s.
atrésicos	66,7 (2/3)	50,0 (1/2)	75,0 (3/4)	0	
Total					
viáveis	62,5 (75/120)	30,8 (37/120)	29,2 (35/120)	21,7 (26/120)	<0,0001
atrésicos	37,5 (45/120)	69,2 (83/120)	70,8 (85/120)	78,3 (94/120)	

^a Teste Exato de Fisher; n.d.: não determinado; n.s.: não significante ($P < 0,05$)

3.4.3 Galinhas

O efeito do tempo de cultivo sobre as populações de folículos ovarianos de ovários de galinhas pode ser observado na Tabela 5. O cultivo dos fragmentos dos ovários das galinhas por 24 horas e sete dias não apresentaram diferença significativa nas populações de folículos em comparação aos ovários recém-coletados.

Tabela 5: População de folículos ovarianos (em %) em galinhas de ovários cultivados por 0, 24 e 168 horas.

Folículos	Horas de cultivo			<i>P</i> ^a
	0	24	168	
Primordial				
normal	66,7 (60/90)	71,4 (40/56)	65,4 (51/78)	n.s.
atrésico	33,3 (30/90)	28,6 (16/56)	34,6 (27/78)	
Transição				
normal	69,6 (16/23)	53,3 (8/15)	51,9 (14/27)	n.s.
atrésico	30,4 (7/23)	46,7 (7/15)	48,1 (13/27)	
Primário				
normal	83,3 (10/12)	70,0 (7/10)	56,3 (9/16)	n.s.
atrésico	16,7 (2/12)	30,0 (3/10)	43,8 (7/16)	
Secundário				
normal	68,2 (15/22)	42,9 (3/7)	57,1 (8/14)	n.s.
atrésico	31,8 (7/22)	57,1 (4/7)	42,9 (6/14)	
Antral				
normal	69,2 (9/13)	78,1 (57/73)	84,6 (22/26)	n.s.
atrésico	30,8 (4/13)	21,9 (16/73)	15,4 (4/26)	
Total				
normal	68,8 (110/160)	71,4 (115/161)	64,6 (104/161)	n.s.
atrésico	31,3 (50/160)	28,6 (46/161)	35,4 (57/161)	

^a Teste Exato de Fisher; n.s.: não significativa ($P > 0,05$)

Os percentuais de folículos ovarianos viáveis e atrésicos cultivadas por 24 horas apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tipos de folículos, exceto nos folículos secundários (Tabela 6). A percentagem de folículos viáveis foram maiores do que de folículos atrésicos após cultivo sem gossipol, enquanto os ovários cultivados com gossipol mostraram predomínio de folículos atrésicos.

Após o cultivo por sete dias, as percentagens de folículos ovarianos viáveis e atrésicos apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tipos de folículos (Tabela 7). Também foi encontrado predomínio de folículos viáveis após o cultivo sem gossipol e predominância de folículos atrésicos nos ovários cultivados com gossipol.

Tabela 6: População de folículos ovarianos (em %) em galinhas de ovários cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10, and 20 µg/ml) por 24 horas.

Folículos	Gossipol (em µg/ml)				<i>P</i> ^a
	0	5	10	20	
Primordial					
normal	71,4 (40/56)	52,7 (29/55)	48,7 (37/76)	37,0 (34/54)	0,0032
atrésico	28,6 (16/56)	47,3 (26/55)	51,3 (39/76)	63,0 (34/54)	
Transição					
normal	53,3 (8/15)	36,7 (11/30)	21,1 (8/38)	5,1 (2/39)	0,0003
atrésico	46,7 (7/15)	63,3 (19/30)	78,9 (30/38)	94,9 (37/39)	
Primário					
normal	70,0 (7/10)	26,3 (5/19)	27,3 (6/22)	0	0,0460
atrésico	30,0 (3/10)	73,7 (14/19)	72,7 (16/22)	100 (4/4)	
Secundário					
normal	42,9 (3/7)	34,8 (8/23)	9,1 (1/11)	30,0 (6/20)	n.s.
atrésico	57,1 (4/7)	65,2 (15/23)	90,9 (10/11)	70,0 (14/20)	
Antral					
normal	78,1 (57/73)	48,5 (16/33)	40,0 (8/20)	40,4 (23/57)	<0,0001
atrésico	21,9 (16/73)	51,5 (17/33)	60,0 (12/20)	59,6 (34/57)	
Total					
normal	71,4	43,1 (69/160)	35,9 (60/167)	29,3 (51/174)	<0,0001
atrésico	(115/161)	56,9 (91/160)	64,1	70,7	
	28,6 (46/161)		(107/167)	(123/174)	

^a Teste Exato de Fisher; n.s.: não significativa ($P > 0,05$)

Tabela 7: População de folículos ovarianos (em %) em galinhas de ovários cultivados com diferentes concentrações de gossipol (0, 5, 10, and 20 µg/ml) por sete dias.

Folículos	Gossipol (em µg/ml)				<i>P</i> ^a
	0	5	10	20	
Primordial					
normal	65,4 (51/78)	44,6 (33/74)	33,3 (27/81)	29,8 (25/84)	<0,000
atrésico	34,6 (27/78)	55,4 (41/74)	66,7 (54/81)	70,2 (59/84)	
Transição					
normal	51,9 (14/27)	30,0 (6/20)	20,6 (7/34)	10,0 (2/20)	0,0106
atrésico	48,1 (13/27)	70,0 (14/20)	79,4 (27/34)	90,0 (18/20)	
Primário					
normal	56,3 (9/16)	23,1 (3/13)	31,3 (5/16)	0	0,0335
atrésico	43,8 (7/16)	76,9 (10/13)	68,8 (11/16)	100 (8/8)	
Secundário					
normal	57,1 (8/14)	10,5 (2/19)	0	7,4 (2/27)	0,0006
atrésico	42,9 (6/14)	89,5 (17/19)	100 (9/9)	92,6 (25/27)	
Antral					
normal	84,6 (22/26)	0	24,1 (7/29)	0	<0,000
atrésico	15,4 (4/26)	100 (38/38)	75,9 (22/29)	100 (36/36)	
Total					
normal	64,6	26,8 (44/164)	27,2 (46/169)	16,6 (29/175)	<0,000

atrésico	(104/161)	73,2	72,8	83,4	1
	35,4 (57/161)	(120/164)	(123/169)	(146/175)	

^a Teste Exato de Fisher

3.5 DISCUSSÃO

Alguns trabalhos relataram que ratas apresentando ciclos estrais normais e tratadas com gossipol ácido-acético passaram a exibir aumento das irregularidades dos ciclos estrais, com diminuição do período de estro e prolongamento do diestro (GU; ANDERSON, 1985; LAGERLOFF; TONE, 1985; LIN et al., 1985a; BENDER et al., 1988; GADELHA et al., 2014b). Foi verificado, em roedores, que o tratamento com gossipol interrompa o padrão normal do ciclos estrais por meio do efeito sobre a secreção hormonal da hipófise e ovários (WU et al., 1981; RANDEL et al., 1992). No estudo de Gadelha et al. (2014b) verificou-se que o gossipol administrado por via subcutânea na dose de 25 mg/kg/dia, foi responsável pela significativa redução dos níveis séricos T4 e progesterona e um aumento significativo da relação T3/T4, porém não foram afetados os níveis séricos de T3, TSH, LH e estradiol.

Vários estudos mostraram que as galinhas poedeiras alimentadas com farelo de algodão podem apresentar efeitos adversos devido ao gossipol. Assim, diversos estudos demonstraram a produção de ovos reduzida após exposição ao gossipol, em alimentos contendo níveis dessa substância livre variáveis, tais como 101,5 mg/kg (REID et al., 1987), 126 mg/kg (FITZSIMMONS et al., 1989), 130 mg/kg (PANIGRAHI et al., 1989), 200 mg/kg (NARAIN et al., 1957) e 400 mg/kg (WALDEOUP; GOODNER, 1973). A cessação completa da produção de ovos foi observada em galinhas alimentadas com ração contendo 1.008 mg/kg (FITZSIMMONS et al., 1989) e 1.500 mg/kg (NARAIN et al., 1957). O peso do ovo foi reduzido pelo consumo de ração contendo níveis de gossipol livre de 255 mg/kg (PANIGRAHI et al., 1989) e 400 mg/kg (NARAIN et al., 1957; WALDEOUP GOODNER, 1973). Outro efeito adverso da exposição ao gossipol é a alteração da coloração da gema e clara dos ovos (REID et al., 1984; PANIGRAHI et al., 1989; PANIGRAHI; HAMMONDS, 1990; PANIGRAHI, 1992; PANIGRAHI; PLUMB, 1996; LORDELO et al., 2007).

Os efeitos da atividade sobre a produção e qualidade dos ovos podem ocorrer devido a danos causados aos ovários promovidos pelo gossipol. No entanto, não há estudos anteriores a este trabalho em espécies aviárias. Em ratos, o peso dos ovários foi diminuída após a administração de 5 ou 10 mg de gossipol/kg/dia por via subcutânea

durante 20 dias (GU; ANDERSON, 1985). Os ratos que receberam doses de 25 mg de gossipol/kg/dia por via subcutânea, durante 15 dias, apresentaram redução no número de folículos ovarianos normais e aumento do número de folículos atrésicos, em todos os estágios de desenvolvimento (GADELHA et al., 2014). O tratamento de ratas com gossipol (25 mg/kg/dia) foi responsável por uma redução do número de folículos ovarianos normais e um aumento no número de folículos atrésicos, em todas as fases de desenvolvimento. Em média, os ovários de ratas do grupo controle apresentaram 83,3% de folículos normais e 16,7% de folículos atrésicos, enquanto as ratas tratadas com gossipol tiveram taxas de incidência de folículos normais e atrésicos de 36,6% e 63,4%, respectivamente (GADELHA et al., 2014b). Em células da granulosa de suínas cultivadas em meio ao gossipol, ocorreu inibição da atividade esteroidogênica e do estado redox e estimulou a produção do fator de crescimento endotelial vascular (BASINI et al., 2009). Além disto, o gossipol foi responsável pela atividade citotóxica e apoptóticas em linhas de células de carcinoma de ovário (ATMACA et al., 2009; WANG et al., 2013).

No presente estudo, foi observado que os ovários de ratas, camundongas e galinhas cultivados com gossipol, em todas as concentrações, apresentaram aumento na proporção de folículos ovarianos atrésicos, e consequente redução na proporção de folículos viáveis, em todas as fases de desenvolvimento folicular. Deste modo, podemos afirmar que o gossipol promove danos diretamente aos folículos ovarianos de roedores e galinhas, resultando em aumento na proporção de folículos atrésicos. Os danos aos folículos primordiais do ovário interferem, permanentemente, na reprodução feminina, pois estes folículos se desenvolvem em folículos primários, secundários e antrais, em um processo contínuo e não-reversível (HIRSHFIELD, 1997). Assim, é provável que as fêmeas expostas ao gossipol possam apresentar senescência reprodutiva precoce após a redução da reserva de folículos do ovário. Em comparação ao grupo controle, a viabilidade de todos os folículos ovarianos das ratas e das camundongas foi reduzida na maior concentração de gossipol (20 µg/mL) após cultivo por 24 horas em 56,9% e 56,5%, respectivamente, e após 7 dias em 65,4% e 65,3%, respectivamente. Nas galinhas, as respectivas reduções foram de 59,0% e 74,3%. Assim, a comparação entre as espécies evidencia que a redução na viabilidade folicular foi proporcionalmente mais intensa no ovários das galinhas do que das ratas e camundongas. Deste modo, no presente estudo o melhor modelo experimental para a avaliação *in vitro* dos efeitos tóxicos do gossipol sobre os folículos ovarianos revelou ser com ovários de galinhas.

3.6 CONCLUSÕES

Foi verificado que todas as concentrações de gossipol testadas aumentaram as proporções de folículos atrésicos em todas as fases do desenvolvimento de todas as espécies tratadas, sendo proporcionalmente mais intensa no ovários das galinhas do que das ratas e camundongas. Assim, o gossipol pode afetar diretamente a maturação folicular, interferindo na fertilidade feminina. No presente estudo o melhor modelo experimental para a avaliação *in vitro* dos efeitos tóxicos do gossipol sobre os folículos ovarianos revelou ser com ovários de galinhas.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, G. O.; LONGE, O. G.; ADEJUMO, D. O. The reproductive performance of breeder cocks fed cottonseed cake-based diets. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 2, p. 140-144, 2007.

ATMACA, H.; GORUMLU, G., KARACA, B., DEGIRMENCI, M., TUNALI, D., CIRAK, Y., PURCU, D.U., UZUNOGLU, S., KARABULUT, B., SANLI, U.A. ;USLU, R. Combined gossypol and zoledronic acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates angiogenic molecules in ovarian cancer cells. **European cytokine network**, v. 20, n. 3, p. 121-130, 2009.

BASINI, G. et al. Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function. **Domestic animal endocrinology**, v. 37, n. 1, p. 30-36, 2009.

CHENOWETH, P. J. et al. 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.

- EL-SHARAKY, A. S. et al. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3354-3361, 2010.
- FITZSIMMONS, R. C.; NEWCOMBE, M.; MOUL, I. E. The long-term effects of feeding ground and whole cottonseed to laying hens. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 69, n. 2, p. 425-431, 1989.
- GADELHA, I. C. N. et al. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 129-135, 2011.
- GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol Promotes Degeneration of Ovarian Follicles in Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol toxicity from cottonseed products. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 231635, 2014.
- GU, Y.; ANDERSON, N. O. Effects of gossypol on the estrous cycle and ovarian weight in the rat. **Contraception**, v. 32, n. 5, p. 491-496, 1985.
- HASSAN, M. E. et al. Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1171-1179, 2004.
- HIRSHFIELD, A. N. Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 29, n. 1, p. 10-15, 1997.
- LIN, Y. C. et al. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life sciences**, v. 37, n. 1, p. 39-47, 1985.
- LORDELO, M. M. et al. Relative toxicity of gossypol enantiomers in laying and broiler breeder hens. **Poultry science**, v. 86, n. 3, p. 582-590, 2007.

NARAIN, R.; LYMAN, C. M.; COUCH, J. R. High levels of free gossypol in hen diets: Effects on body weight, feed consumption, and egg production. **Poultry Science**, v. 36, n. 6, p. 1351-1354, 1957.

PANIGRAHI, S.; PLUMB, V. E.; MACHIN, D. H. Effects of dietary cottonseed meal, with and without iron treatment, on laying hens. **British poultry science**, v. 30, n. 3, p. 641-651, 1989.

PANIGRAHI, S.; HAMMONDS, T. W. Egg discolouration effects of including screw-press cottonseed meal in laying hen diets and their prevention. **British Poultry Science**, v. 31, n. 1, p. 107-120, 1990.

PANIGRAHI, S. Effects of treating cottonseed meal with a solution of ferrous sulphate on laying hen performance and discolourations in eggs. **Animal feed science and technology**, v. 38, n. 2, p. 89-103, 1992.

PANIGRAHI, S.; PLUMB, V. E. Effects on dietary phosphorus of treating cottonseed meal with crystalline ferrous sulphate for the prevention of brown yolk discolouration. **British poultry science**, v. 37, n. 2, p. 403-411, 1996.

RANDEL, R. D. et al. 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.

RANDEL, R. D.; CHASE JR, C. C.; WYSE, S. J. Effects of Gossypol and Cottonseed Products on Repro B uction of Mammals 123. **J. Anim. Sci**, v. 70, N. 5, p. 1628-1638, 1992.

REID, B. L.; GALAVIZ-MORENO, S.; MAIORINO, P. M. Evaluation of isopropanol-extracted cottonseed meal for laying hens. **Poultry Science**, v. 66, n. 1, p. 82-89, 1987.

STATISTICAL PACKAGE, R. R: A language and environment for statistical computing. **Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing**, 2011.

WALDEOUP, P. W.; GOODNER, T. O. Tolerance levels of free gossypol in layer diets as influenced by iron: gossypol ratios. **Poultry Science**, v. 52, n. 1, p. 20-28, 1973.

WANG, J. et al. Gossypol induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 6, p. 1489-1497, 2013.

4 CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DO GOSSIPOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE MURINOS

Determinação dos efeitos do gossipol sobre desenvolvimento embrionário precoce de murinos

4.1 RESUMO

RESUMO: O gossipol é um pigmento polifenólico que apresenta coloração amarela e está presente em plantas pertencentes ao gênero *Gossypium*. Este pigmento promove toxicidade reprodutiva por meio da inibição da resposta gonadal. Alguns trabalhos evidenciaram o efeito embriotóxico do gossipol, mas ainda não há um bom modelo experimental para estudar este efeito. Portanto, objetivou-se verificar o efeito do gossipol sobre o desenvolvimento embrionário de camundongos. Fêmeas nulíparas de camundongos Balb-C foram superovuladas, utilizando 5 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e, 48 a 52 horas após, com 10 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), ambas administradas intraperitonealmente. Após a administração de hCG, as fêmeas foram alocadas com machos na proporção de 1:1. Na manhã seguinte, foi realizada a colheita de embriões na fase de 2-8 células. As tubas uterinas foram removidas e imersas em meio Human Tubal Fluid modificado (HTFm) com 25mM HEPES e 20% soro fetal bovino (SFB). Lavagens sequenciais das tubas foram realizadas para remoção dos embriões com o mesmo meio utilizado anteriormente para imersão. O líquido perfundido nas tubas foi recolhido em placas de Petri estéreis e examinado sob microscopia de luz invertida. Os embriões selecionados foram transferidos para novo meio de cultivo HTF sem HEPES suplementado com 10% de SFB. Para o cultivo, lotes de 5 a 8 embriões foram recolhidos e depositados em microgotas (30 µl) de meio suplementado em placas de 35x10 mm. Os embriões foram cultivados em meio sem a adição de gossipol (grupo controle) ou com concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml de gossipol, adicionadas em cada gota. Estas gotas foram imersas em óleo mineral e cultivadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, por 24 horas. Após o cultivo, os embriões foram incubados por 15 minutos em gotas de 100 µl com os fluoróforos *Yellow Lucifer* (90 µl) e calceína (5 µl) para a detecção de membranas rompidas e de células em processo de morte celular, respectivamente. Após 24 horas, todos os 5 (100%) embriões do grupo controle apresentavam-se normais. A degeneração foi observada em 4 de 5 (80%) embriões, no tratamento com 5 µg/ml de gossipol; 5 de 6 (83%) embriões, no grupo 10 µg/ml; e em todos os 8 (100%) embriões do grupo 20 µg/ml. Nos grupos com adição do gossipol, os embriões corados apresentaram blastômeros morfologicamente irregulares e degenerados, característicos do padrão necrótico. Concluindo, o cultivo por 24 horas com gossipol, nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml, afetou a viabilidade e a sobrevivência de embriões de murinos. Assim, esta espécie animal pode ser utilizada como modelo experimental para a avaliação experimental da embriotoxicidade do gossipol.

Palavras chave: toxicidade reprodutiva, embriotoxicidade, embrião, infertilidade.

4.2 INTRODUÇÃO

A cultura do algodão (*Gossypium* spp.) visa a geração de fibras para a indústria têxtil e de óleo para a alimentação e produção de combustíveis, e seu resíduo é largamente utilizado na alimentação de animais de produção. De fato, o algodão é uma fonte de proteína de alta qualidade (ALFORD et al., 1996). No entanto, o desenvolvimento de produtos de proteína comestível a partir de caroço de algodão é limitada pela presença de uma substância tóxica, o gossipol. Este composto polifenólico está presente nas glândulas de pigmento de algodão (FORMAN et al., 1991). Seu efeito negativo sobre a saúde animal tem sido reconhecido. Os animais não-ruminantes são muito mais sensíveis do que os ruminantes, devido à ligação do gossipol livre às proteínas solúveis no rúmen (WILLARD et al., 1995). Este fato limitou a utilização dos subprodutos desta lavoura na alimentação, principalmente, para aves e suínos (ANDRIGUETTO et al., 1988).

O gossipol pode trazer sérios problemas aos animais como perda de apetite, edemas pulmonares, hipertrofia de fígado (MORGAN et al., 1988), necrose muscular cardíaca, problemas reprodutivos, como também fragilidade dos eritrócitos (LINDSEY et al., 1980). Em alguns casos o acúmulo de gossipol no organismo pode levar o animal à morte (HASCHECK et al., 1989). Gamboa et al. (2001) relatam que a intensidade de seu efeito tóxico varia de acordo com o nível de consumo, o período de consumo, a idade do animal e das condições de estresse desse animal.

O gossipol também tem mostrado reduzir a fertilidade em ratos e hamsters (HAHN et al., 1981) e em touros (ARSHAMI; RUTTLE, 1988). Fornés et al. (1993) observaram que a adição de gossipol livre acarretou, *in vitro*, a perda da motilidade espermática de ratos por alteração na membrana celular dos espermatozóides. Outros estudos relatam que o gossipol interfere no ciclo estral de fêmeas roedoras (ADEYEMO; LONGE, 2007) e em células da granulosa de suínas (BASINI et al., 2009). Alguns estudos têm demonstrado que o gossipol afeta *in vitro* e *in vivo* a qualidade e o desenvolvimento embrionário (RANDEL et al., 1996; BROCAS et al., 1997; SANTOS et al., 2003; VILLASENOR et al., 2003). Portanto, este composto possui propriedades contraceptivas em fêmeas (LIN et al., 1985; ANDREAZZI et al., 1998), pois novilhas alimentadas com gossipol possuíam menos blastômeros e o tempo de desenvolvimento destes era mais prolongado. No entanto, ainda não há um bom modelo experimental para estudar o efeito embriotóxico do gossipol. Desta forma, o

objetivo deste estudo foi estabelecer se há interferência no desenvolvimento de embriões de camundongos cultivados *in vitro* pela exposição ao gossipol, avaliando a integridade celular e a viabilidade dos embriões.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Obtenção de embriões de camundongas

Para a obtenção de embriões foram utilizadas 12 camundongas, da linhagem Balb-C, provenientes do Biotério da UFERSA. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no mesmo Biotério, com água e ração própria (Labina, Purina, São Lourenço da Mata, PE, Brasil) fornecidos *ad libitum*, com ciclos de luz/escuro a cada 12 horas e temperatura média de 26°C.

O procedimento experimental seguiu as normas éticas para experimentação animal preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA (processo nº 23091.000690/2012-72).

Para otimizar a coleta dos embriões e obtenção em número e estágio adequados, fêmeas nulíparas foram superovuladas, utilizando-se o seguinte protocolo:

- 1) 5 UI de gonadotrofina coriônica equina (PMSG - *pregnant mare serum gonadotropin*, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), administrada intraperitonealmente;
- 2) 48 a 52 horas após, 10UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG, Pregnyl-Organon do Brasil, SP, BR), também administrada por via intraperitoneal;
- 3) alojamento das fêmeas nas gaiolas dos machos na proporção de 1:1, imediatamente após a administração de hCG, para pernoite.

Na manhã seguinte, as fêmeas foram examinadas para conferir a presença de um tampão vaginal mucoso e realizada a colpocitologia vaginal. As fêmeas que apresentaram esta estrutura ou espermatozoides foram consideradas prenhes e no dia 0 da gestação.

No dia 2 pós-hCG, as fêmeas prenhes foram anestesiadas por administração intraperitoneal de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) para a colheita de embriões nas fases de 2-8 células. Este procedimento envolve laparotomia, remoção das tubas e

imersão destas em meio (HTFm) Human Tubal Fluid modificado com 25mM HEPES (Irvine Scientific, Santa Ana, Califórnia, EUA) e 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab do Brasil, Campinas, SP, BR). Durante toda a manipulação para a obtenção dos embriões, as amostras foram mantidas sobre placa aquecida, a 37 °C, sob a proteção da luz e sistema de fluxo de ar filtrado.

Os embriões foram retirados da tuba por meio de lavagens sequenciais com o auxílio de uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha gengival 30G (BD, Curitiba, PR) contendo meio de cultura HTF suplementado com SBF e HEPES (conforme mencionado anteriormente). Sob microscópio estereoscópico, a seringa foi inserida na extremidade distal do oviduto, onde cerca de 1 mL de meio foi suavemente injetado, para permitir o arraste de elementos presentes na superfície luminal deste órgão (Figura 1). O líquido perfundido pelas tubas foi recolhido em placas de Petri de 60x10 mm estéreis e examinado sob microscopia de luz invertida, para a seleção e coleta dos embriões na fase de 2 a 8 células. Os embriões selecionados quanto ao número de blastômeros e qualidade morfológica de suas células, foram transferidos para novo meio de cultivo HTF sem HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino.



Figura 1: Lavagens sequenciais das tubas uterinas para coleta dos embriões com auxílio de um microscópio estereoscópico. Fonte: arquivo pessoal.

4.3.2 Cultivo de embriões de camundongas

Para o cultivo, lotes de cinco a oito embriões foram recolhidos e depositados em microgotas (30 μ l) de meio suplementado em placas de 35x10 mm (Figura 2). Cada uma destas gotas, por sua vez, foi imersa em óleo mineral (Sigma Chemical Co., Saint

Louis, MO, EUA), previamente equilibrado em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ a 37 °C, por 24 horas.

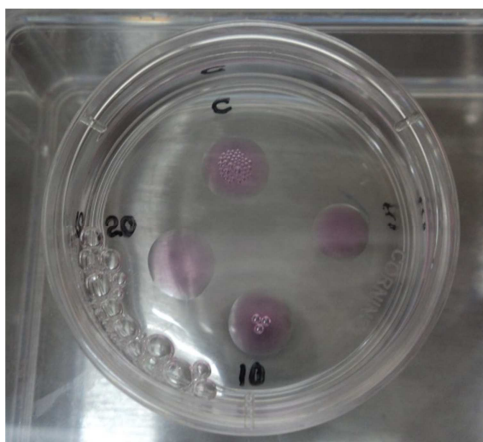


Figura 2: Placa 35x10 mm, contendo 4 microgotas de 30 µl, sendo uma controle (C - acima), outra contendo 5 µg/mL de gossipol (5 - lado direito), outra 10 µg/mL (10 - abaixo) e 20 µg/mL (20 - lado esquerdo). Fonte: arquivo pessoal.

4.3.3 Delineamento experimental

Foram utilizados embriões de camundongas obtidos conforme descrito. Os grupos experimentais consistiram de lotes de cerca de cinco a oito embriões, recolhidos dos cornos uterinos na fase de 2-8 células e imediatamente cultivados em microgotas, conforme detalhado no item 4.3.2. No total foram realizados 4 grupos experimentais, um grupo controle, em que os embriões foram cultivados em meio suplementado e três grupos experimentais, nas quais os embriões foram respectivamente cultivados na presença de gossipol nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL.

Os embriões foram analisados logo após o processo de obtenção dos embriões para a seleção de embriões saudáveis na fase de 2 a 8 células e após 24 horas de cultivo, para classificação de seu desenvolvimento. Para esta classificação, foram considerados principalmente o número de blastômeros e a morfologia embrionária. Este procedimento foi realizado sob estereomicroscópio no aumento final de 40x ou sob microscopia de luz invertida com contraste de fase e magnitude da ordem de 200x.

A presença de células em processo de morte nos embriões de camundongas cultivados em decorrência do tratamento com gossipol foi avaliada por técnica colorimétrica. Após o cultivo, os embriões foram incubados por 15 minutos em gotas de 100 µl com os fluoróforos *Yellow Lucifer* (3mg/mL) e *calceína* (5 µl) para a detecção de

membranas rompidas, e de células em processo de morte celular, respectivamente. Além disso, foi utilizado o corante *Hoechst 33342* (10µg/mL) para verificar a para evidenciar ácidos nucleicos.

4.3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o *software* R (versão 3.0.3) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). As frequências de embriões viáveis e degenerados foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido como $P < 0,05$.

4.4 RESULTADOS

Após 24 horas de cultivo, no grupo controle os 5 (100%) embriões apresentaram-se normais. Nos grupos expostos ao gossipol, a degeneração foi observada em quatro (80%) dos embriões na concentração de 5 µg/mL, em cinco (83%) com 10 µg/mL e em todos os oito (100%) embriões com 20 µg/mL. Assim, houve uma evidente relação dose-efeito do gossipol na proporção de embriões degenerados (Tabela 1).

À avaliação morfológica, os embriões do grupo controle incubados e corados apresentaram evidência dos padrões dos blastômeros, sendo visualizadas também as cromatinas, desta forma, os embriões apresentavam-se normais. Nos grupos em que os embriões foram cultivados na presença de gossipol foram observados que os embriões sofreram degeneração, apresentando padrões necróticos. Não foram observadas outras alterações como relacionadas à apoptose como formação de *blebbings*, apenas o padrão típico de degeneração da organização morfológica e lise celular, condizentes com o processo necrótico.

Tabela 01: Embriões coletados e analisados após 24 horas de cultivo em meio contendo gossipol (5, 10 e 20 µg/mL) e sem gossipol (grupo controle).

Concentração do gossipol	Embriões coletados	Embriões viáveis após cultivo
0 µg/mL (controle)	5	5 (100%)
5 µg/mL	5	1 (20%)
10 µg/mL	6	1 (16,7%)
20 µg/mL	8	0

$P < 0,001$, Teste Exato de Fisher.

4.5 DISCUSSÃO

No presente estudo, os embriões murinos cultivados com gossipol apresentaram taxa aumentada de degeneração, em todas as concentrações estudadas. Estes resultados estão de acordo com os relatados na literatura. Em ovos embrionados de galinhas, a aplicação de 0,25 mg de gossipol aumentou a taxa de mortalidade após 48 e 72 horas, mas não após 24 e 96 horas (LI et al., 1989). Em vacas, a exposição ao gossipol reduz a taxa de prenhez após a inseminação artificial (SANTOS et al., 2003). A taxa de clivagem dos embriões de bovinos foi reduzida pelo cultivo com 10 µg/mL de gossipol (BROCAS et al., 1987), enquanto em hamsters a redução desta taxa ocorreu com concentrações a partir de 5 µg/mL de gossipol (LIN et al., 1994). Por outro lado, em outro estudo também com bovinos, a taxa de clivagem não foi afetada pelo cultivo dos embriões com até 10 µg/mL de gossipol (HERNÁNDEZ-CERÓN et al., 2005) e 5 µg/mL (BROCAS et al., 1987). Em hamsters, a aplicação de 200 µg de gossipol em cada corno uterino inibiu o desenvolvimento para a fase de mórulas (LIN et al., 1994). A porcentagem de embriões degenerados foi aumentada em embriões de bovinos cultivados com 10 µg/mL de gossipol por 96 horas (VILLASEÑOR et al., 2008).

Em ratas que receberam 20 mg/kg/dia de gossipol-ácido acético durante 60 dias apresentaram prolongamento do tempo para o acasalamento, uma taxa reduzida de prenhez e de embriões viáveis quando comparados com os animais do grupo controle (LAGERLÖF; TONE, 1985). Em camundongos, a administração de 60 e 120 mg/kg/dia do sexto ao décimo-terceiro dias de gestação resultou em aumento da taxa de perda pós-

implantação (LI et al., 1989). Em ratas a administração de 12,5 e 25 mg/kg/dia de gossipol nos primeiros oito dias da prenhez resultou em redução do número de implantações embrionárias nos úteros (LIN et al., 1985), o que sugere aumento na perda embrionária. Da mesma forma, a aplicação de 50 a 500 µg de gossipol em cada corno uterino de ratas foi responsável por redução no número de pontos de implantação (LIN et al., 1991). Em camundongos, a administração de 50 e 75 mg/kg/dia do primeiro ao décimo-quinto dia de gestação resultou em aumento do número de fetos inviáveis e redução do peso fetal, mas não foram observadas anormalidades fetais (SEIN; PHIL, 1986). Vacas leiteiras que consumiram gossipol presente no algodão pima (*Gossypium barbadense*) reduziu o número de blastômeros viáveis e o diâmetro embrionário (VILLASEÑOR et al., 2008). Por outro lado, nenhuma alteração no desenvolvimento foi observada em embriões de vacas alimentadas com torta de algodão avaliados 6 a 7 dias após a inseminação artificial (VELASQUEZ-PEREIRA et al., 2002).

A ação embriotóxica do gossipol observada neste trabalho e nos demais estudos deve ser produzida por citotoxicidade direta do gossipol. 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).

4.6 CONCLUSÕES

O cultivo de embriões murinos em meio contendo gossipol (5, 10 e 20 µg/ml) afetou a viabilidade e a sobrevivência após 24 horas. Assim, esta espécie animal pode ser utilizada como modelo experimental para a avaliação experimental da embriotoxicidade do gossipol.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, O. G.; LONGE, D. O. The reproductive performance of breeder cocks fed cottonseed meal cake-based diets. **International Journal of Poultry Science**, v. 2, n. 2, p. 140-144, 2007.

ALFORD, B. B.; LIEPA, G. U.; VANBEBER, A. D. Cottonseed protein: what does the future hold. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 1–11, 1996.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal, as bases e os fundamentos da nutrição animal**: os alimentos. vol. 1, 4. ed. Editora Nobel, 1988.

ARSHAMI, J.; RUTTLE, J. L. Effects of diets containing gossypol on spermatogenic tissues of young bulls. **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p.507-516, 1988.

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

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

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. **Chinese Journal of Physiology**, v. 46, n. 3, p. 117-122, 2003.

FORMAN, L.; MATHEWS, S.; KING, C. C. New food, feed uses for glandless cottonseed. **Inform**, v. 2, p. 737-739, 1991.

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

GAMBOA, D. A.; CALHOUN, M. C.; KUHLMANN, S. W.; HAQ, A. U.; BAILEY, C. A. Use of expanded cottonseed meal in broiler diets formulated on a digestible amino acid basis. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p.789-94, 2001.

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

HASCHEK, W. M.; BEASLEY, V. R.; BUCK, W. B.; FINNELL, J. H. Cottonseed meal (gossypol) toxicosis in a swine herd. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, v. 195, n. 5, p. 613-615, 1989.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; JOUSAN, F. D.; SOTO, P.; HANSEN, P. J. Timing of inhibitory actions of gossypol on cultured bovine embryos. **Journal Dairy Science**, 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. **European Journal of Pharmacology**, v. 313, n. 3, p. 243-255, 1996.

LAGERLÖF, R. K.; TONE, J. N. The effect of gossypol acetic acid on female reproduction. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 469-482, 1985.

LI, Y.F.; BOOTH, G.M.; SEEGMILLER, R.E. Evidence for embryotoxicity of gossypol in mice and chicks with no evidence of mutagenic activity in the Ames test. **Reproductive Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 59-62, 1989.

LIN, Y. C.; FUKAYA, T.; RIKIHISA, Y.; WALTON, A. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life Sciences**, 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.

LIN, Y. C.; SANBUISSHO, A.; COSKUN, S.; RIKIHISA, Y. Inhibition of in vitro fertilization and early embryonic development in hamsters by gossypol. **Life Sciences**, v. 55, n. 14, p. 1139-1145, 1994.

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

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 Letters**, v. 264, n. 2, p. 192-200, 2008.

MORGAN, S. E.; STAIR, E. L.; MARTIN, T. M.; EDWARDS, W. C.; MORGAN, G. L. Clinical, clinicopathologic, pathologic, and toxicology alterations associated with gossypol toxicoses in feeder lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 4, p. 493-499, 1988.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2009.

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 heifer treated with bFSH. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 911-922, 1996.

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

SEIN, G. M.; PHIL, M. The embryotoxic and immunodepressive effects of gossypol. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 14, n. 03n04, p. 110-115, 1986.

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. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 9, p. 2485–2492, 2002.

VILLASEÑOR, M., COSCIONI, A. C.; GALVÃO, K. N.; JUCHEM, S. O.; SANTOS, J. E. P. AND PUSCHNER B. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo development and viability in vivo and *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 86, Suppl., p. 240, 2003.

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 cow performance. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 496-507, 1995.

ANEXOS

ANEXO I - "GOSSYPOL TOXICITY FROM COTTONSEED PRODUCTS"

Review Article

Gossypol Toxicity from Cottonseed Products

Ivana Cristina N. Gadelha,¹ Nayanna Brunna S. Fonseca,¹ Silvia Catarina S. Oloris,² Marília M. Melo,³ and Benito Soto-Blanco³

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, BR 110 Km 47, 59628-360 Mossoró, RN, Brazil

² Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro 80, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, 30123-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Benito Soto-Blanco; bsotoblanco@yahoo.com.br

Received 29 January 2014; Revised 4 April 2014; Accepted 16 April 2014; Published 6 May 2014

Academic Editor: Chad C. Chase Jr.

Copyright © 2014 Ivana Cristina N. Gadelha et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Gossypol is a phenolic compound produced by pigment glands in cotton stems, leaves, seeds, and flower buds (*Gossypium* spp.). Cottonseed meal is a by-product of cotton that is used for animal feeding because it is rich in oil and proteins. However, gossypol toxicity limits cottonseed use in animal feed. High concentrations of free gossypol may be responsible for acute clinical signs of gossypol poisoning which include respiratory distress, impaired body weight gain, anorexia, weakness, apathy, and death after several days. However, the most common toxic effects is the impairment of male and female reproduction. Another important toxic effect of gossypol is its interference with immune function, reducing an animal's resistance to infections and impairing the efficiency of vaccines. Preventive procedures to limit gossypol toxicity involve treatment of the cottonseed product to reduce the concentration of free gossypol with the most common treatment being exposure to heat. However, free gossypol can be released from the bound form during digestion. Agronomic selection has produced cotton varieties devoid of glands producing gossypol, but these varieties are not normally grown because they are less productive and are more vulnerable to attacks by insects.

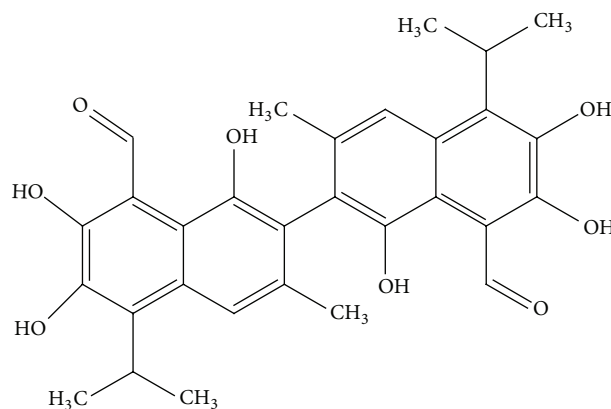
1. Introduction

Cotton (*Gossypium* spp.) is an arborescent plant from the Malvaceae family. It is one of the earliest plants that were cultivated by man and it has been used for over 4,000 years. It is primarily cultivated for fiber used in the textile industry and the oil from the cotton seed [1]. The genus *Gossypium* spp. includes many species distributed throughout the world, but only four species are grown for cotton fiber: *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* L., and *Gossypium herbaceum* L. The most economically important cotton species is *G. hirsutum*, which is grown to produce 90% of the world's cotton [2]. Cotton fiber and oil production generate byproducts rich in fat from oil and protein which are used for animal feeding. However, this plant contains a toxic compound, gossypol [1].

2. Chemistry of Gossypol

Gossypol is a phenolic compound that was first isolated in 1899. The name is derived from the plant genus scientific name (*Gossypium*) combined with the ending "ol" from phenol [1]. Gossypol has a 518.55 Dalton molecular weight, has a yellow pigment, is crystalline, is insoluble in water and hexane, is soluble in acetone, chloroform, ether, and methyl ethyl ketone (butanone), and is partly soluble in crude vegetable oils. The chemical formula is $C_{30}H_{30}O_8$, and the chemical structural formula is 2,2'-bis(8-formyl-1,6,7-trihydroxy-5-isopropyl-3-methylnaphthalene) (Figure 1) [1, 3, 4].

Gossypol is produced by pigment glands in cotton stems, leaves, seeds, and flower buds. The pigment glands are small black spots distributed throughout the cotton plant but their greatest concentration is in the seeds [1, 4–6]. The seed of



Chemical formula: $C_{30}H_{30}O_8$

Chemical structural formula: 2,2'-bis(8-formyl-1,6,7-trihydroxy-5-isopropyl-3-methylnaphthalene)

FIGURE 1: Chemical structure, formula, and structural formula of gossypol.

G. barbadense may contain up to 34 g of gossypol/kg [7]. Gossypol promotes several toxic effects in vertebrates but provides the cotton plant with resistance to pests [1, 4–6]. The pigment glands produce additional phenolic pigments (at least 14), but they are at concentrations well below the concentration of gossypol and thus have little toxicological significance [1].

Gossypol is a mixture of two enantiomers, (–) and (+) gossypol [1, 8–11]. The (–) gossypol enantiomer is more slowly eliminated [12], although it is the most biologically active form. Consequently, it is more toxic than the (+) gossypol [11, 13]. The *Gossypium* species produces both enantiomers in varying proportions, which is genetically determined [1, 9, 10, 14]. For example, the (–) gossypol proportion ranges from 33.8 to 47.0% in the seeds of upland variety (*G. hirsutum*) [15, 16] and from 24.9 to 68.9% in the seeds of *G. barbadense* [7].

Two gossypol forms have been observed, free and bound [6]. The bound form is produced via covalent bonds between gossypol and the free epsilon-amino groups from lysine and arginine [1, 17, 18] through the browning or Maillard reaction [1]. However, this reaction reduces the availability of amino acids for absorption by the animal with lysine being the most affected [18].

Total gossypol production is influenced by several factors, including weather conditions and cotton species. Considering weather conditions, gossypol production is positively correlated with the rainfall rate and negatively correlated with temperature [19]. Regarding variation among cotton species, *G. barbadense* has higher gossypol concentrations than *G. hirsutum*. On the other hand, cotton storage slightly decreases the free gossypol content [1].

3. Gossypol in Cotton Products

The free gossypol content in whole cotton seeds varies among the many cotton varieties [6, 20]; gossypol concentrations

range from 0.02 to 6.64% [21]. Cottonseed may contain concentrations greater than 14,000 mg/kg of total gossypol and 7,000 mg/kg of free gossypol [6]. However, after oil extraction from the seeds, up to 0.6% is available following solvent extraction, but approximately 0.06% is available, if the extraction process involves mechanical pressure and heat treatment [22].

In addition to its harmful effects, gossypol and its derivatives have potential therapeutic use. These compounds showed *in vitro* action against some viruses such as human immunodeficiency virus [23, 24] and H5N1 influenza virus [24, 25] and several bacteria and yeasts [26–29]. Gossypol is a promising treatment for leukemia [30], lymphoma [31], colon carcinoma [32], breast cancer [33, 34], myoma [35], prostate cancer [36], and other malignancies [37–43]. Furthermore, it was used in China, in 1970, to treat uterine fibroids, endometriosis, and uterine bleeding in women [35].

4. Toxicokinetics

The gossypol absorption rate is inversely proportional to the amount of iron in the diet [71], and dietary supplementation with ferrous sulfate inactivates free gossypol [72]. In ruminants, microbial fermentation in the rumen binds dietary free gossypol with proteins [73], but it is not known whether the bound form can be absorbed by the intestines or the microorganisms can release free gossypol from the bound form. The absorbed gossypol accumulates in the liver [74] and kidneys [75]. The primary gossypol excretion route is through bile; it is then eliminated through feces after conjugation with glucuronides and sulfates [76]. In rats dosed orally with 5 mg of both racemic forms of gossypol, 70.4% of (+) and 80.2% of (–) gossypol were excreted in the feces within five days, whereas 2.30% of (+) and 2.79% of (–) gossypol were excreted in the urine [77]. Small amounts of gossypol are also excreted in expired air [1]. Little to no gossypol is excreted in the milk [74]. The half-lives ($t_{1/2}$) of total (+) and (–) gossypol in rats

TABLE 1: Experimental studies showing liver damage induced by gossypol.

Animals	Gossypol dose	Route of administration	Duration of treatment	Reference
Broiler	0.4% of total gossypol in food	Oral	20 days	[11]
Chickens	0.1% of free gossypol in food	Oral	21 days	[44]
Rats	25 mg/kg BW	Intraperitoneal	Single dose	[45]
Rats	30 mg/kg BW	Intraperitoneal	Single dose	[46]
Rats	5, 10 and 20 mg/kg BW	Intraperitoneal	10 days	[47]

following a single intravenous dose were estimated as 25.26 hours and 10.53 hours, respectively [77].

5. Gossypol Poisoning

Cottonseed includes sufficiently high gossypol concentrations to produce acute poisoning. However, there are cumulative effects of dietary gossypol and toxicity which can occur following an ingestion period of one to three months [1, 78–81]. Gossypol poisoning has been reported in many species, including broiler chicks [82], pigs [71], dogs [83, 84], sheep [85], and goats [86]. Monogastric animals, such as pigs, birds, fish, and rodents, are more susceptible to gossypol toxicity than ruminants [5, 6, 20, 87]. Moreover, young ruminants are more sensitive to gossypol compared with adult ruminants [1] because gossypol is not bound during ruminal fermentation, as it occurs in animals with fully functional rumens. However, if the gossypol intake overwhelms the ruminal detoxification capacity, free gossypol may be absorbed at hazardous concentrations even in adult ruminant animals [88].

General signs of acute toxicity are similar among animal species and include respiratory distress, impaired body weight gain, anorexia, weakness, apathy, and death after several days [1, 6, 80, 85, 89–93]. Heart failure was reported in calves [90, 94], lambs [85], and dogs [79].

The postmortem findings in ruminants include pulmonary edema, yellowish liquid in the chest and peritoneal cavities, gastroenteritis, centrilobular liver necrosis, and hypertrophic cardiac fiber degeneration. In calves, the major pathologic findings are ascites, visceral edema, acute centrilobular hepatocyte necrosis, kidney damage, and cardiovascular lesions. Increased pneumonia has also been observed, likely due to an increased sensitivity to secondary infections [85, 90–92].

Pigs may present reduced weight gain, anorexia, respiratory distress, cardiac insufficiency, coughing, and exercise intolerance. Necropsy findings include fluid accumulation in the body cavities; edema and congestion in the liver, lung, and spleen; and cardiac hypertrophy with degenerated muscle fiber [71].

Anemia is often observed in animals fed cottonseed. In fact, gossypol is a highly reactive compound that readily binds to minerals and amino acids. Binding with iron forms a gossypol-iron complex, which inhibits the absorption of this metal. The consequent iron deficiency affects erythropoiesis. Furthermore, gossypol promotes increased erythrocyte fragility [57, 74, 87, 95]. Gossypol also stimulates the eryptosis (apoptosis-like erythrocyte death) by increasing

cytosolic Ca^{2+} activity resulting in cell membrane scrambling and contraction, which contributes to anemia [96].

Gossypol also affects thyroidal metabolism [68, 97–100]. Some studies with male [98] and female [99] rats showed decreased blood concentrations of T4 and T3 after dosing with gossypol. On the other hand, gossypol dosing resulted in increased T3 serum concentrations without affecting T4 in rats [97] and sheep [68]. The histopathological evaluation of thyroid glands from male rats dosed with gossypol revealed follicular degeneration and atrophy [98]. The thyrotropic cells in the pituitary gland, which are specialized for TSH synthesis and secretion, showed hypertrophy, hyperplasia, and degranulation after gossypol dosing in rats [100].

Certain clinical signs of gossypol poisoning have been attributed to reduced antioxidants in tissues and increased reactive oxygen species formation, which produces lipid peroxidation [101–104]. At high concentrations, gossypol also impairs energy generation from oxidative metabolism by interfering with enzymatic activity in the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation [105–107]. Furthermore, gossypol decreases the contraction force of the heart and the extent of contraction of cardiac fibers [108].

6. Liver Damage

In addition to such effects, gossypol is hepatotoxic (Table 1) [11, 44–47, 71, 109, 110]. Ascites and hepatocyte degeneration (strong cytoplasmic eosinophilia and nuclear pyknosis) were observed in rats that received a single intraperitoneal gossypol dose of 25 mg/kg BW [45] or 30 mg/kg BW [46]. Rats that received lower gossypol doses (15 mg/kg/day for four weeks or 30 mg/kg/day for two weeks) showed morphological changes in the liver, as observed through electron microscopy, which were characterized by mitochondrial vacuolation, an enlarged endoplasmatic reticulum, an expanded perinuclear space, and collagen fiber proliferation in the perisinusoidal space [109]. Chickens fed a diet with 0.1% free gossypol for 21 days had increased plasma gamma glutamyltransferase activity and liver lipidosis [44]. Broilers that received a diet with 0.4% total gossypol for 20 days had greater liver weights [11].

7. Reproductive Effects

Gossypol affects male and female gametogenesis and promotes embryo lesions [81]. In the 1950s, China underwent a sharp drop in the birthrate in many rural areas where

TABLE 2: Selected experimental studies describing effects of gossypol on male reproduction.

Animals	Gossypol dose	Effects	Reference
Hamsters	10 mg/kg BW/day	Degeneration of spermatocytes	[48]
Rats	20 mg/kg BW/day	Degeneration of spermatocytes	[48]
Mice	40 mg/kg BW/day	No degeneration	[48]
Rats	25 mg/kg BW/day	Decreased spermatogenesis, Sertoli cell, and seminiferous tubules damage	[49]
Rats	10 mg/kg BW/day	Tubular degeneration, reduced testosterone concentrations, and involutions of ventral prostate and seminal vesicles	[50]
Rats	5, 10 and 20 mg/kg BW/day	Decreased sperm count and motility, increased abnormal sperm count, and reduced serum levels of testosterone, LH, and FSH	[47]
Bulls	16.4 mg/kg BW/day	Reduced sperm production and motility and increased proportion of sperm midpiece abnormalities	[51]
Bulls	8 mg/kg BW/day	Primary and secondary sperm abnormalities and increased number of sperm with proximal droplets	[52]

humans were consuming cottonseed oil containing gossypol. This observation was initially associated with male infertility caused by gossypol in the cottonseed oil that they were consuming. Gossypol has been investigated for use as a male contraceptive in a number of experimental studies [1, 81, 111–115].

The gossypol toxicity for male reproduction (Table 2) was reported in several studies showing that it inhibits spermatogenesis, which decreases the sperm count and spermatozoid motility and viability [20, 47–51, 53, 55, 102, 116–120]. The male antifertility effect is dose and time dependent; in effective doses, gossypol causes infertility by inhibiting sperm motility, decreasing sperm concentrations, inducing specific mitochondrial injury to the sperm tail, and damaging the germinal epithelium [20]. However, such effects are reversible when gossypol is no longer ingested [52]. Furthermore, gossypol administration to male rats did not interfere in the embryonic and fetal development of untreated dam offspring [121].

The deleterious effects on male reproduction have not been observed for all animals fed cottonseed meal. In adult male goats [122] and sheep [123] fed a diet with 0.5 kg/animal/day cottonseed meal for 120 consecutive days, no detrimental effects on semen volume, sperm concentration, motility, and morphology.

The gossypol-mediated spermatozoid disturbance mechanism includes the inhibition of release and utilization of ATP by the sperm cells [124]. Another effect of gossypol is the reduction of cellular and microtubular β -tubular content in spermatocytes and spermatids [125]. Furthermore, gossypol inhibits calcium influx [126, 127] and Mg-ATPase and Ca-Mg-ATPase activity in spermatozoid plasmatic membranes [126]. Abnormal spermatozooids are produced because gossypol produces ultrastructural alterations in the nuclear membrane, endoplasmic reticulum, and mitochondria [119, 128–130]. In cultivated Sertoli cells from piglets, gossypol

also decreases cellular oxidase activity and damages the DNA [131]. Reduced nuclear expression of androgen receptors was observed in Leydig cells, Sertoli cells, and myoid cells from rats fed gossypol-rich cottonseed flour [132].

Gossypol also affects female reproduction (Table 3), and ruminant females tolerate higher dietary gossypol concentrations than nonruminant females [20, 54, 118, 133], probably due to the ruminal detoxification. Female exposure to gossypol has been associated with interference with the estrous cycle, pregnancy, and early embryonic development [20, 57, 81]. Gossypol interfered with rodent estrous cycles [54, 134] and pig granulosa cell function [135]. Furthermore, ovaries from heifers fed cottonseed meal had fewer large follicles (>5 mm) than heifers fed soybean meal [57]. Gossypol affected *in vitro* ovarian steroidogenesis [136, 137] as well as bovine oocyte cumulus expansion and nuclear maturation [137].

Previous studies have shown that gossypol interferes with embryonic development [118, 138–141]. In fact, gossypol may reach the uterine fluids through the maternal circulation [141]. A gossypol-mediated embryotoxic effect has been observed in *in vitro* [118, 138, 140–142] and *in vivo* [57, 139, 141, 143] studies. The early pregnancy loss promoted by gossypol is not due exclusively to direct damage to embryos but also to interference with implantation of the embryo [139]. However, this compound significantly reduced the fetal body weight in pregnant mice, but no fetal abnormalities were observed [144].

The probable mechanism for gossypol embryotoxicity is through direct embryonic cytotoxicity [20, 143]. This cytotoxic effect might be promoted by (1) generation of reactive oxygen species inducing oxidative stress [102, 104, 145], (2) intercellular communication disruption [146], (3) apoptosis induction [32, 147–152], or (4) interference with ionic transport in membranes, which increases intracellular calcium [153].

TABLE 3: Selected experimental studies describing effects of gossypol on female reproduction.

Animals	Gossypol dose	Effects	Reference
Rats	5 mg/kg BW/day	Longer diestrus	[53]
Rats	25 mg/kg/day	Lower levels of estradiol-17 β	[54]
Rats	20 mg/kg/day	Irregular and longer estrous cycles, prolonged time for mating, decreased pregnancy rate, and reduced number of viable embryos	[55]
Heifers	~51 mg/kg BW/day	No interference on cycling, first service conception rate, and ovarian morphology	[56]
Heifers	5 g of free gossypol/animal/day	Reduced number of ovarian follicles >5 mm	[57]

8. Immunotoxicity

Gossypol may cause a reduced number of leukocytes and primarily lymphocytes, which affects the immunocompetence of the organism [154]. *In vivo* and *in vitro* mouse experiments also demonstrated that gossypol has immunosuppressive activity [155], which operates by affecting lymphocytes through inhibiting proliferation and inducing apoptosis [155, 156]. Mice that received gossypol had significantly decreased numbers of lymphocytes in the thymus and mesenteric lymph nodes [157], in the total spleen cell population [144], and in the capacity of blood and lymphatic cells to produce antibodies after sheep erythrocyte immunization [144, 157]. Furthermore, the spleen and lymph nodes from mice receiving gossypol had decreased CD4⁺ thymocyte populations and increased CD8⁺ lymphocyte populations [157].

The interference of gossypol with lymphocytes influence immune function as observed in a number of studies [157–160]. After inoculation with *Brucella abortus* smooth strain 99 (S99), specific anti-*Brucella* antibody production was impaired in lambs [159] and calves [160] fed cottonseed meal. Mice treated with gossypol had decreased IgM and IgG production after sheep erythrocyte immunization [157]. Men treated with gossypol as a male contraceptive showed reduced IgG titers which could be associated with altered lymphocytes [158].

In vitro murine macrophage proliferation was inhibited by gossypol [157]. Furthermore, rat peritoneal macrophages incubated with gossypol inhibited arachidonic acid metabolism and prostaglandin E₂ production [161]. On the other hand, macrophage chemotaxis induced by *Edwardsiella ictaluri* challenge was increased in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed cottonseed [162] or receiving gossypol [163], but catfish were unaffected by gossypol in another study [27]. Gossypol also increased serum lysozyme activity in channel catfish following an *E. ictaluri* challenge [27, 163].

9. Preventive Procedures

The preventive procedures at this time involve the treatment of cottonseed products to decrease the concentrations of free gossypol through the use of heat and pressure in the processing of these products (Table 4). Agronomic selection

TABLE 4: Preventive procedures for reducing gossypol toxicity.

Procedures	Reference
Heat treatment	
Roasting	[58]
extrusion	[58, 59]
Irradiation	
Gamma irradiation	[156–158]
Electron beam irradiation	[60, 61]
Fungal fermentation	
<i>Aspergillus niger</i>	[161–163]
<i>Aspergillus oryzae</i>	[62]
<i>Candida tropicalis</i>	[63–66]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[63, 64]
<i>Geotrichum candidum</i>	[67]
Nutritional supplementation	
Ferric sulfate	[1]
Sodium selenite	[68]
Vitamin E	[69, 70]

has produced cotton varieties devoid of glands producing gossypol [164], but these varieties are less grown because they are not as productive and are more vulnerable to attacks by insects [1]. One alternative is the selection and use of cotton varieties containing a relatively high (+) to (–) gossypol enantiomer ratio [13]. The directive 2002/32 of the European Union (2002L0032 - EN - 26.02.2013 - 017.001) states that the maximum free gossypol concentrations for cottonseed are 5,000 ppm and 1,200 ppm for cottonseed meal or cake and, for complete feeding stuffs, are 20 ppm for laying hens and piglets, 60 ppm for rabbits and pigs, 100 ppm for poultry and calves, and 500 ppm for cattle, sheep, and goats.

Processing including heat treatment [58, 165] and extrusion process [59] can reduce free gossypol concentrations in cottonseed. However, it is possible that the conjugate formed can release free gossypol during digestion. In fact, cows fed diets containing whole cottonseed with similar total gossypol concentrations but different free gossypol concentrations had similar total plasma gossypol [59]. Furthermore, even though the extrusion process reduced free gossypol concentration but not the total gossypol concentration; broiler chicks fed extruded cottonseed meal or feed-grade cottonseed meal showed decreased body weight gain, increased feed intake, and inefficient feed conversion rate [166].

Radiation treatment using gamma [60, 167, 168] or electron beam irradiation [60, 61] may reduce free gossypol concentrations. In fact, gossypol irradiation reduced *in vitro* prooxidative activity and embryotoxicity in mice [168]. The mechanism for gossypol destruction through radiation is unknown, but it has been speculated that gossypol molecule aggregation, gossypol cross-linking with other molecules, and gossypol molecule fragmentation or breakdown may produce such destruction [61]. On the other hand, ammoniation, which is a procedure that is used to reduce aflatoxin content of food, increased cottonseed meal toxicity in dairy cattle [169].

Some fungus may reduce free gossypol concentrations in cottonseed meal by fermentation, including *Aspergillus niger* [63, 64, 170], *Aspergillus oryzae* [62], *Candida tropicalis* [63–66], *Saccharomyces cerevisiae* [63, 64], and *Geotrichum candidum* [67]. The use of fermented cottonseed meal to feed animals seems to be safe [62, 171]. However, while these microorganisms could be used to reduce free gossypol concentration in cottonseed meal, they are not currently commercially available.

Supplementation with ferric sulfate reduces free gossypol concentrations in food due to ferric sulfate binding with reactive groups from gossypol, which forms a conjugate. The recommendation for supplementation is 1 mol of gossypol for each mol of iron, which could increase the maximum concentration of gossypol from 50 to 150 ppm for laying birds and from 100 ppm to 400 ppm for pigs and poultry [1]. Additional nutrients may be used for dietary supplementation to reduce gossypol availability. Supplementing the diet with 1 mg of sodium selenite per day in adult sheep reduced the gossypol toxicity affecting semen quality [68]. Dietary vitamin E supplementation at 4000 IU/bull/day also reversed the negative effects of gossypol on sperm production and semen quality of bulls [69] and reversed the increased erythrocyte osmotic fragility in heifers [70] promoted by feeding cottonseed meal.

Gossypol was produced as a conjugate with bovine serum albumin for vaccines. This conjugate induces antibody production against gossypol in rats, but the immunized animals were more sensitive to the acute hepatotoxic effect of gossypol [46].

10. Conclusions and Future Research Directions

The ingestion of gossypol present in cottonseed and its products (cakes and meal) may promote clinical poisoning, liver damage, male and female reproductive toxicity, and immunological impairment. The acute poisoning is not currently a significant problem but the reproductive damage causes serious economic losses to the livestock industry. Even though the male reproductive toxicity is well known, there is a need for more studies to understand the female reproductive damage promoted by gossypol. The immunotoxicity of gossypol is far from being completely elucidated, but it impacts animals by reducing their resistance to infections and by impairing the efficiency of vaccines. Extensive research is needed to develop more efficient and inexpensive technologies to reduce gossypol toxicity.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

This work received support for language editing by the Pró-Reitoria de Pesquisa of the Universidade Federal de Minas Gerais (Edital PRP-UFGM 03/2013).

References

- [1] B. Soto-Blanco, "Gossypol e fatores antinutricionais da soja," in *Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária*, H. S. Spinosa, S. L. Górniak, and J. P. Neto, Eds., pp. 531–545, Manole, Barueri, Brazil, 2008.
- [2] A. Borém, E. C. Freire, J. Cesar, V. Penna, and P. A. Vianna, "Considerations about cotton gene escape in Brazil: a review," *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 315–332, 2003.
- [3] M. B. Abou-Donia, "Physiological effects and metabolism of gossypol," *Residue Reviews*, vol. 61, pp. 125–160, 1976.
- [4] G. M. Rogers, M. H. Poore, and J. C. Paschal, "Feeding cotton products to cattle," *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 18, no. 2, pp. 267–294, 2002.
- [5] J. A. Kenar, "Reaction chemistry of gossypol and its derivatives," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 83, no. 4, pp. 269–302, 2006.
- [6] J. Alexander, D. Benford, A. Cockburn et al., "Gossypol as undesirable substance in animal feed," *EFSA Journal*, vol. 908, pp. 1–55, 2008.
- [7] R. G. Percy, M. C. Calhoun, and H. L. Kim, "Seed gossypol variation within *Gossypium barbadense* L. cotton," *Crop Science*, vol. 36, no. 1, pp. 193–197, 1996.
- [8] R. J. Hron Sr., H. L. Kim, M. C. Calhoun, and G. S. Fisher, "Determination of (+)-, (–)-, and total gossypol in cottonseed by high-performance liquid chromatography," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 76, no. 11, pp. 1351–1355, 1999.
- [9] M. M. Lordelo, A. J. Davis, M. C. Calhoun, M. K. Dowd, and N. M. Dale, "Relative toxicity of gossypol enantiomers in broilers," *Poultry Science*, vol. 84, no. 9, pp. 1376–1382, 2005.
- [10] M. M. Lordelo, M. C. Calhoun, N. M. Dale, M. K. Dowd, and A. J. Davis, "Relative toxicity of gossypol enantiomers in laying and broiler breeder hens," *Poultry Science*, vol. 86, no. 3, pp. 582–590, 2007.
- [11] R. Kakani, D. A. Gamboa, M. C. Calhoun, A. U. Haq, and C. A. Bailey, "Relative toxicity of cottonseed gossypol enantiomers in broilers," *Open Toxicology Journal*, vol. 4, pp. 26–31, 2010.
- [12] D.-F. Wu, Y.-W. Yu, Z.-M. Tang, and M.-Z. Wang, "Pharmacokinetic of (±)-, (+)-, and (–)-gossypol in humans and dogs," *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 39, no. 6, pp. 613–618, 1986.
- [13] C. A. Bailey, R. D. Stipanovic, M. S. Ziehr et al., "Cottonseed with a high (+)- to (–)-gossypol enantiomer ratio favorable to broiler production," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 11, pp. 5692–5695, 2000.
- [14] J. A. Scheffler and G. B. Romano, "Breeding and genetics: modifying gossypol in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): a cost

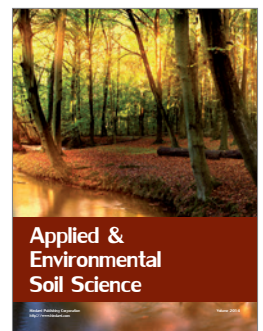
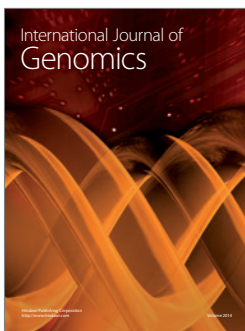
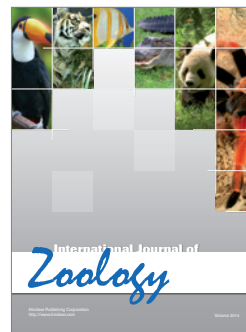
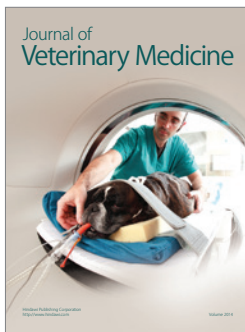
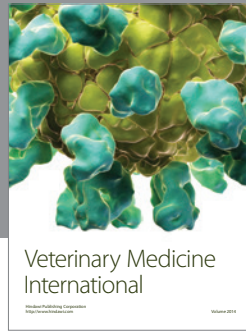
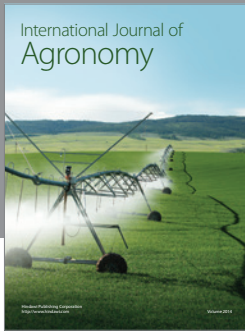
- effective method for small seed samples," *Journal of Cotton Science*, vol. 12, no. 3, pp. 202–209, 2008.
- [15] M. C. Calhoun, S. K. Kuhlmann, and B. C. Balwin, "Assessing the gossypol status of cattle fed cotton feed products," pp. 147A–158A, Proceedings of the Pacific Northwest Animal Nutrition Conference, 1995.
 - [16] R. D. Stipanovic, L. S. Puckhaber, J. Liu, and A. A. Bell, "Total and percent atropisomers of Gossypol and Gossypol-6-methyl ether in seeds from Pima cottons and accessions of *Gossypium barbadense* L," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 2, pp. 566–571, 2009.
 - [17] R. Bressani, R. Jarquín, and L. G. Elías, "Free and total gossypol, epsilon-amino lysine, and biological evaluation of cottonseed meals and flours in Central America," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 12, no. 3, pp. 278–282, 1964.
 - [18] S. R. Fernandez, Y. Zhang, and C. M. Parsons, "Dietary formulation with cottonseed meal on a total amino acid versus a digestible amino acid basis," *Poultry Science*, vol. 74, no. 7, pp. 1168–1179, 1995.
 - [19] W. A. Pons Jr., C. L. Hoffpauir, and T. H. Hopper, "Gossypol in cottonseed: influence of variety of cottonseed and environment," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 1, no. 18, pp. 1115–1118, 1953.
 - [20] R. D. Randel, C. C. Chase Jr., and S. J. Wyse, "Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals," *Journal of Animal Science*, vol. 70, no. 5, pp. 1628–1638, 1992.
 - [21] W. D. Price, R. A. Lovell, and D. G. McChesney, "Naturally occurring toxins in feedstuffs: center for veterinary medicine perspective," *Journal of Animal Science*, vol. 71, no. 9, pp. 2556–2562, 1993.
 - [22] S. S. Nicholson, "Cottonseed toxicity," in *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, R. C. Gupta, Ed., pp. 1161–1165, Academic Press, London, UK, 2nd edition, 2012.
 - [23] B. Polsky, S. J. Segal, P. A. Baron, J. W. M. Gold, H. Ueno, and D. Armstrong, "Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol," *Contraception*, vol. 39, no. 6, pp. 579–587, 1989.
 - [24] J. Yang, F. Zhang, J. Li et al., "Synthesis and antiviral activities of novel gossypol derivatives," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 22, no. 3, pp. 1415–1420, 2012.
 - [25] J. Yang, G. Chen, L. L. Li et al., "Synthesis and anti-H5N1 activity of chiral gossypol derivatives and its analogs implicated by a viral entry blocking mechanism," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 23, no. 9, pp. 2619–2623, 2013.
 - [26] P. Margalith, "Inhibitory effect of gossypol on microorganisms," *Applied Microbiology*, vol. 15, no. 4, pp. 952–953, 1967.
 - [27] P. Yildirim-Aksoy, C. Lim, M. K. Dowd, P. J. Wan, P. H. Klesius, and C. Shoemaker, "In vitro inhibitory effect of gossypol from gossypol-acetic acid, and (+)- and (–)-isomers of gossypol on the growth of *Edwardsiella ictaluri*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 97, no. 1, pp. 87–92, 2004.
 - [28] E. Turco, C. Vizzuso, S. Franceschini, A. Ragazzi, and F. M. Stefanini, "The in vitro effect of gossypol and its interaction with salts on conidial germination and viability of *Fusarium oxysporum* sp. vasinfectum isolates," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, no. 6, pp. 2370–2381, 2007.
 - [29] Y. Anna, A. G. Medentsev, and V. I. Krupyanko, "Gossypol inhibits electron transport and stimulates ROS generation in yarrowia lipolytica mitochondria," *Open Biochemistry Journal*, vol. 6, pp. 11–15, 2012.
 - [30] K. Balakrishnan, W. G. Wierda, M. J. Keating, and V. Gandhi, "Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells," *Blood*, vol. 112, no. 5, pp. 1971–1980, 2008.
 - [31] P. W. M. Johnson, "New targets for lymphoma treatment," *Annals of Oncology*, vol. 19, no. 4, pp. iv56–iv59, 2008.
 - [32] X. Wang, J. Wang, S. C. H. Wong et al., "Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells," *Life Sciences*, vol. 67, no. 22, pp. 2663–2671, 2000.
 - [33] C. van Poznak, A. D. Seidman, M. M. Reidenberg et al., "Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 66, no. 3, pp. 239–248, 2001.
 - [34] W. Ye, H.-L. Chang, L.-S. Wang et al., "Modulation of multidrug resistance gene expression in human breast cancer cells by (–)-gossypol-enriched cottonseed oil," *Anticancer Research*, vol. 27, no. 1, pp. 107–116, 2007.
 - [35] M.-L. Han, Y.-F. Wang, M.-Y. Tang et al., "Gossypol in the treatment of endometriosis and uterine myoma," *Contributions to Gynecology and Obstetrics*, vol. 16, pp. 268–270, 1987.
 - [36] J. Jiang, V. Slivova, A. Jedinak, and D. Sliva, "Gossypol inhibits growth, invasiveness, and angiogenesis in human prostate cancer cells by modulating NF- κ B/AP-1 dependent and independent signaling," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 29, no. 2, pp. 165–178, 2012.
 - [37] G. P. Tuszyński and G. Cossu, "Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines," *Cancer Research*, vol. 44, no. 2, pp. 768–771, 1984.
 - [38] Y.-W. Wu, C. L. Chik, and R. A. Knazek, "An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13 adrenocortical carcinoma," *Cancer Research*, vol. 49, no. 14, pp. 3754–3758, 1989.
 - [39] S. Z. A. Badawy, A.-K. Souid, V. Cuenca, N. Montalto, and F. Shue, "Gossypol inhibits proliferation of endometrioma cells in culture," *Asian Journal of Andrology*, vol. 9, no. 3, pp. 388–393, 2007.
 - [40] C.-H. Ko, S.-C. Shen, L.-Y. Yang, C.-W. Lin, and Y.-C. Chen, "Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells," *International Journal of Cancer*, vol. 121, no. 8, pp. 1670–1679, 2007.
 - [41] C.-C. Chien, C.-H. Ko, S.-C. Shen, L.-Y. Yang, and Y.-C. Chen, "The role of COX-2/PGE2 in gossypol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, no. 8, pp. 3128–3137, 2012.
 - [42] W.-T. Hsiao, M.-D. Tsai, G.-M. Jow, L.-T. Tien, and Y.J. Lee, "Involvement of Smac, p53, and caspase pathways in induction of apoptosis by gossypol in human retinoblastoma cells," *Molecular Vision*, vol. 18, pp. 2033–2042, 2012.
 - [43] F. Y. Wong, N. Liem, C. Xie et al., "Combination therapy with gossypol reveals synergism against gemcitabine resistance in cancer cells with high BCL-2 expression," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, Article ID e50786, 2012.
 - [44] S. Blevins, P. B. Siegel, D. J. Blodgett, M. Ehrich, G. K. Saunders, and R. M. Lewis, "Effects of silymarin on gossypol toxicosis in divergent lines of chickens," *Poultry Science*, vol. 89, no. 9, pp. 1878–1886, 2010.
 - [45] D. P. Deoras, P. Young-Curtis, R. R. Dalvi, and F. E. Tippet, "Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats," *Veterinary Research Communications*, vol. 21, no. 5, pp. 317–323, 1997.

- [46] N. B. S. Fonseca, I. C. N. Gadelha, S. C. S. Oloris, and B. Soto-Blanco, "Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 56, pp. 149–153, 2013.
- [47] A. S. El-Sharakly, A. A. Newairy, N. M. Elguindy, and A. A. Elwafa, "Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 12, pp. 3354–3361, 2010.
- [48] D. W. Hahn, C. Rusticus, and A. Probst, "Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents," *Contraception*, vol. 24, no. 1, pp. 97–105, 1981.
- [49] R. Heywood, G. K. Lloyd, S. K. Majeed, and C. Gopinath, "The toxicity of gossypol to the male rat," *Toxicology*, vol. 40, no. 3, pp. 279–284, 1986.
- [50] M. Gåfvels, J. Wang, A. Bergh, J. E. Damberg, and G. Selstam, "Toxic effects of the antifertility agent gossypol in male rats," *Toxicology*, vol. 32, no. 4, pp. 325–333, 1984.
- [51] P. J. Chenoweth, C. A. Risco, R. E. Larsen, J. Velez, T. Tran, and C. C. Chase Jr., "Effects of dietary gossypol on aspects of semen quality, sperm morphology and sperm production in young Brahman bulls," *Theriogenology*, vol. 42, no. 1, pp. 1–13, 1994.
- [52] M. E. Hassan, G. W. Smith, R. S. Ott et al., "Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls," *Theriogenology*, vol. 61, no. 6, pp. 1171–1179, 2004.
- [53] Y. Gu and N. O. Anderson, "Effects of gossypol on the estrous cycle and ovarian weight in the rat," *Contraception*, vol. 32, no. 5, pp. 491–496, 1985.
- [54] Y. C. Lin, T. Fukaya, Y. Rikihisa, and A. Walton, "Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats," *Life Sciences*, vol. 37, no. 1, pp. 39–47, 1985.
- [55] R. K. Lagerlöf and J. N. Tone, "The effect of gossypol acetic acid on female reproduction," *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 8, no. 6, pp. 469–482, 1985.
- [56] M. D. Gambill and W. D. Humphrey, "Effects of diets containing gossypol on ovarian histology, function and fertility in prepubertal beef heifers," *Theriogenology*, vol. 40, no. 3, pp. 585–593, 1993.
- [57] R. D. Randel, S. T. Willard, S. J. Wyse, and L. N. French, "Effects of diets containing free gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function in brangus heifers treated with bFSH," *Theriogenology*, vol. 45, no. 5, pp. 911–922, 1996.
- [58] A. Arieli, "Whole cottonseed in dairy cattle feeding: a review," *Animal Feed Science and Technology*, vol. 72, no. 1–2, pp. 97–110, 1998.
- [59] S. M. Noftsker, B. A. Hopkins, D. E. Diaz, C. Brownie, and L. W. Whitlow, "Effect of whole and expanded-exelled cottonseed on milk yield and blood gossypol," *Journal of Dairy Science*, vol. 83, no. 11, pp. 2539–2547, 2000.
- [60] P. Shawrang, M. H. Mansouri, A. A. Sadeghi, and F. Ziaie, "Evaluation and comparison of gamma- and electron beam irradiation effects on total and free gossypol of cottonseed meal," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 80, no. 6, pp. 761–762, 2011.
- [61] S. R. Ebrahimi-Mahmoudabad and M. Taghinejad-Roudbanel, "Investigation of electron beam irradiation effects on anti-nutritional factors, chemical composition and digestion kinetics of whole cottonseed, soybean and canola seeds," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 80, no. 12, pp. 1441–1447, 2011.
- [62] S.-J. Lim and K.-J. Lee, "A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*," *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 42, no. 4, pp. 494–503, 2011.
- [63] W.-J. Zhang, Z.-R. Xu, J.-Y. Sun, and X. Yang, "Effect of selected fungi on the reduction of gossypol levels and nutritional value during solid substrate fermentation of cottonseed meal," *Journal of Zhejiang University B: Science*, vol. 7, no. 9, pp. 690–695, 2006.
- [64] W.-J. Zhang, Z.-R. Xu, S.-H. Zhao, J.-Y. Sun, and X. Yang, "Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal," *Animal Feed Science and Technology*, vol. 135, no. 1–2, pp. 176–186, 2007.
- [65] X.-Y. Weng and J.-Y. Sun, "Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 32, no. 3, pp. 226–232, 2006.
- [66] W.-J. Zhang, Z.-R. Xu, S.-H. Zhao, J.-F. Jiang, Y.-B. Wang, and X.-H. Yan, "Optimization of process parameters for reduction of gossypol levels in cottonseed meal by *Candida tropicalis* ZD-3 during solid substrate fermentation," *Toxicon*, vol. 48, no. 2, pp. 221–226, 2006.
- [67] Z.-T. Sun, C. Liu, and J.-H. Du, "Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology," *Annals of Microbiology*, vol. 58, no. 4, pp. 683–690, 2008.
- [68] M. Y. EL-Mokadem, T. A. Taha, M. A. Samak, and A. M. Yassen, "Alleviation of reproductive toxicity of gossypol using selenium supplementation in rams," *Journal of Animal Science*, vol. 90, no. 9, pp. 3274–3285, 2012.
- [69] J. Velasquez-Pereira, P. J. Chenoweth, L. R. McDowell et al., "Reproductive effects of feeding gossypol and vitamin E to bulls," *Journal of Animal Science*, vol. 76, no. 11, pp. 2894–2904, 1998.
- [70] J. Velasquez-Pereira, C. F. Aréchiga, L. R. McDowell et al., "Effects of gossypol from cottonseed meal and dietary vitamin E on the reproductive characteristics of superovulated beef heifers," *Journal of Animal Science*, vol. 80, no. 9, pp. 2485–2492, 2002.
- [71] W. M. Haschek, V. R. Beasley, W. B. Buck, and J. H. Finnell, "Cottonseed meal (gossypol) toxicosis in a swine herd," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 195, no. 5, pp. 613–615, 1989.
- [72] M. L. Barraza, C. E. Coppock, K. N. Brooks, D. L. Wilks, R. G. Saunders, and G. W. Latimer Jr., "Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle," *Journal of Dairy Science*, vol. 74, no. 10, pp. 3457–3467, 1991.
- [73] I. C. Schneider, M. L. Ames, M. A. Rasmussen, and P. J. Reilly, "Fermentation of cottonseed and other feedstuffs in cattle rumen fluid," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 8, pp. 2267–2273, 2002.
- [74] T. O. Lindsey, G. E. Hawkins, and L. D. Guthrie, "Physiological responses of lactating cows to gossypol from cottonseed meal rations," *Journal of Dairy Science*, vol. 63, no. 4, pp. 562–573, 1980.
- [75] H. L. Kim, M. C. Calhoun, and R. D. Stipanovic, "Accumulation of gossypol enantiomers in ovine tissues," *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 113, no. 2, pp. 417–420, 1996.
- [76] M. B. Abou-Donia, M. A. Othman, and P. Obih, "Interspecies comparison of pharmacokinetic profile and bioavailability of

- ($\pm$)-gossypol in male Fischer-344 rats and male B6C3F mice," *Toxicology*, vol. 55, no. 1-2, pp. 37-51, 1989.
- [77] Q. Q. Chen, H. Chen, and H. P. Lei, "Comparative study on the metabolism of optical gossypol in rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 20, no. 1, pp. 31-37, 1987.
- [78] E. Eagle, "Effect of repeated doses of gossypol on the dog," *Archives of Biochemistry*, vol. 26, no. 1, pp. 68-71, 1950.
- [79] C. S. Patton, A. M. Legendre, R. E. Gompf, and M. A. Walker, "Heart failure caused by gossypol poisoning in two dogs," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 187, no. 6, pp. 625-627, 1985.
- [80] L. A. Kerr, "Gossypol toxicosis in cattle," *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, vol. 11, no. 9, pp. 1139-1146, 1989.
- [81] I. C. N. Gadelha, A. H. do Nascimento Rangel, A. R. Silva, and B. Soto-Blanco, "Efeitos do gossipol na reprodução animal," *Acta Veterinaria Brasilica*, vol. 5, no. 2, pp. 129-135, 2011.
- [82] M. H. Henry, G. M. Pesti, and T. P. Brown, "Pathology and histopathology of gossypol toxicity in broiler chicks," *Avian Diseases*, vol. 45, no. 3, pp. 598-604, 2001.
- [83] J. L. West, "Lesions of gossypol poisoning in the dog," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 96, pp. 74-76, 1940.
- [84] F. A. Uzal, B. Puschner, J. M. Tahara, and R. W. Nordhausen, "Gossypol toxicosis in a dog consequent to ingestion of cottonseed bedding," *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 17, no. 6, pp. 626-629, 2005.
- [85] S. Morgan, E. L. Stair, T. Martin, W. C. Edwards, and G. L. Morgan, "Clinical, clinicopathologic, pathologic, and toxicologic alterations associated with gossypol toxicosis in feeder lambs," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 49, no. 4, pp. 493-499, 1988.
- [86] N. E. East, M. Anderson, and L. J. Lowenstine, "Apparent gossypol-induced toxicosis in adult dairy goats," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 204, no. 4, pp. 642-643, 1994.
- [87] W.-J. Zhang, Z.-R. Xu, X.-L. Pan, X.-H. Yan, and Y.-B. Wang, "Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding," *Livestock Science*, vol. 111, no. 1-2, pp. 1-9, 2007.
- [88] S. T. Willard, D. A. Neuendorff, A. W. Lewis, and R. D. Randel, "Effects of free gossypol in the diet of pregnant and postpartum Brahman cows on calf development and cow performance," *Journal of Animal Science*, vol. 73, no. 2, pp. 496-507, 1995.
- [89] P. A. M. Rogers, T. P. Henaghan, and B. Wheeler, "Gossypol poisoning in young calves," *Irish Veterinary Journal*, vol. 29, no. 1, pp. 9-13, 1975.
- [90] C. A. Holmberg, L. D. Weaver, W. M. Gutterbock, J. Genes, and P. Montgomery, "Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cotton seed meal diet," *Veterinary Pathology*, vol. 25, no. 2, pp. 147-153, 1988.
- [91] C. A. Risco, C. A. Holmberg, and A. Kutches, "Effect of graded concentrations of gossypol on calf performance: toxicological and pathological considerations," *Journal of Dairy Science*, vol. 75, no. 10, pp. 2787-2798, 1992.
- [92] R. Z. Zelski, J. T. Rothwell, R. E. Moore, and D. J. Kennedy, "Gossypol toxicity in pruruminant calves," *Australian Veterinary Journal*, vol. 72, no. 10, pp. 394-398, 1995.
- [93] R. B. Fombad and M. J. Bryant, "An evaluation of the use of cottonseed cake in the diet of growing pigs," *Tropical Animal Health and Production*, vol. 36, no. 3, pp. 295-305, 2004.
- [94] L. M. Hudson, L. A. Kerr, and W. R. Maslin, "Gossypol toxicosis in a herd of beef calves," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 192, no. 9, pp. 1303-1305, 1988.
- [95] H. Mena, J. E. P. Santos, J. T. Huber, M. Tarazon, and M. C. Calhoun, "The effects of varying gossypol intake from whole cottonseed and cottonseed meal on lactation and blood parameters in lactating dairy cows," *Journal of Dairy Science*, vol. 87, no. 8, pp. 2506-2518, 2004.
- [96] M. Zbidah, A. Lupescu, N. Shaik, and F. Lang, "Gossypol-induced suicidal erythrocyte death," *Toxicology*, vol. 302, no. 2-3, pp. 101-105, 2012.
- [97] F. Tang and P. Y. D. Wong, "Serum potassium and aldosterone levels in gossypol-treated rats," *International Journal of Andrology*, vol. 7, no. 2, pp. 149-153, 1984.
- [98] Y. Rikihisa and Y. C. Lin, "Effect of gossypol on the thyroid in young rats," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 100, no. 4, pp. 411-417, 1989.
- [99] Y. C. Lin, M. Chitcharoenthum, and Y. Rikihisa, "Effect of gossypol on thyroid hormones in young female rats," *Contraception*, vol. 41, no. 4, pp. 431-440, 1990.
- [100] P. Udoh, D. R. Patil, and M. K. Deshpande, "Histopathological and biochemical effects of gossypol acetate on pituitary-gonadal axis of male albino rats," *Contraception*, vol. 45, no. 5, pp. 493-509, 1992.
- [101] D. R. Janero and B. Burghardt, "Protection of rat myocardial phospholipid against peroxidative injury through superoxide(xanthine oxidase)-dependent, iron-promoted fenton chemistry by the male contraceptive gossypol," *Biochemical Pharmacology*, vol. 37, no. 17, pp. 3335-3342, 1988.
- [102] M. W. Fornes, A. M. Barbieri, and M. H. Burgos, "Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH. scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 195, no. 3, pp. 1289-1293, 1993.
- [103] A. de Peyster, A. Quintanilha, L. Packer, and M. T. Smith, "Oxygen radical formation induced by gossypol in rat liver microsomes and human sperm," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 118, no. 2, pp. 573-579, 1984.
- [104] P. Kovaci, "Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 24, pp. 2711-2718, 2003.
- [105] L. A. Meksongsee, A. J. Clawson, and F. H. Smith, "The in vivo effect of gossypol on cytochrome oxidase, succinoxidase, and succinic dehydrogenase in animal tissues," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 18, no. 5, pp. 917-920, 1970.
- [106] M. B. Abou Donia and J. W. Dieckert, "Gossypol: uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation," *Life Sciences*, vol. 14, no. 10, pp. 1955-1963, 1974.
- [107] W. W. Tso and C. S. Lee, "Gossypol uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation in ejaculated boar spermatozoa," *Contraception*, vol. 25, no. 6, pp. 649-655, 1982.
- [108] W. M. Huang and F. Urthaler, "The direct negative inotropic effect of gossypol," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 17, no. 1, pp. 31-36, 1986.
- [109] Y. Wang and H.-P. Lei, "Hepatotoxicity of gossypol in rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 20, no. 1, pp. 53-64, 1987.
- [110] S. Manabe, D. C. Nuber, and Y. C. Lin, "Zone-specific hepatotoxicity of gossypol in perfused rat liver," *Toxicol*, vol. 29, no. 6, pp. 787-790, 1991.
- [111] S. Z. Qian and Z. G. Wang, "Gossypol: a potential antifertility agent for males," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 24, pp. 329-360, 1984.

- [112] Z.-H. Yu and H. C. Chan, "Gossypol as a male antifertility agent—why studies should have been continued," *International Journal of Andrology*, vol. 21, no. 1, pp. 2–7, 1998.
- [113] E. M. Coutinho, "Gossypol: a contraceptive for men," *Contraception*, vol. 65, no. 4, pp. 259–263, 2002.
- [114] K. Dodou, "Investigations on gossypol: past and present developments," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 14, no. 11, pp. 1419–1434, 2005.
- [115] Q. Chang, Z. Liu, W.-Z. Ma et al., "Drug synergistic antifertility effect of combined administration of low-dose gossypol with steroid hormones in rats," *Chinese Medical Journal*, vol. 124, no. 11, pp. 1678–1682, 2011.
- [116] S. Chongthammakun, C. Ekavipat, B. Sanitwongse, and K. Pavasuthipaisit, "Effects of gossypol on human and monkey sperm motility in vitro," *Contraception*, vol. 34, no. 3, pp. 323–331, 1986.
- [117] C. Y. Hong, J. J. Huang, and P. Wu, "The inhibitory effect of gossypol on human sperm motility: relationship with time, temperature and concentration," *Human Toxicology*, vol. 8, no. 1, pp. 49–51, 1989.
- [118] C. Brocas, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes et al., "Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes, and embryos," *Biology of Reproduction*, vol. 57, no. 4, pp. 901–907, 1997.
- [119] P. J. Chenoweth, C. C. Chase Jr., C. A. Risco, and R. E. Larsen, "Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls," *Theriogenology*, vol. 53, no. 5, pp. 1193–1203, 2000.
- [120] Y. Y. Yuan and Q. X. Shi, "Inhibition of hamster sperm acrosomal enzyme by gossypol is closely associated with the decrease in fertilization capacity," *Contraception*, vol. 62, no. 4, pp. 203–209, 2000.
- [121] A. R. Beaudoin, "A developmental toxicity evaluation of gossypol," *Contraception*, vol. 37, no. 2, pp. 197–219, 1988.
- [122] F. D. C. R. Nunes, D. A. F. V. de Araujo, M. B. Bezerra, and B. Soto-Blanco, "Effects of gossypol present in cottonseed cake on the spermatogenesis of goats," *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 9, no. 1, pp. 75–78, 2010.
- [123] F. C. B. Guedes and B. Soto-Blanco, "Sperm quality of sheep fed cottonseed cake," *Acta Scientiae Veterinariae*, vol. 38, no. 4, pp. 415–418, 2010.
- [124] H. Ueno, M. K. Sahni, S. J. Segal, and S. S. Koide, "Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes," *Contraception*, vol. 37, no. 3, pp. 333–341, 1988.
- [125] C. S. Teng, "Reversible changes in the content of cellular and microtubular tubulin in spermatogenic cells after gossypol treatment," *Contraception*, vol. 55, no. 1, pp. 41–46, 1997.
- [126] H. Breitbart, S. Rubinstein, and L. Nass-Arden, "Effect of gossypol-acetic acid on calcium transport and ATPase activity in plasma membranes from ram and bull spermatozoa," *International Journal of Andrology*, vol. 7, no. 5, pp. 439–447, 1984.
- [127] H. Breitbart, A. Mayevsky, and L. Nass-Arden, "Molecular mechanisms of gossypol action on sperm motility," *International Journal of Biochemistry*, vol. 21, no. 10, pp. 1097–1102, 1989.
- [128] A. P. Hoffer, "Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study," *Biology of Reproduction*, vol. 28, no. 4, pp. 1007–1020, 1983.
- [129] J. Arshami and J. L. Ruttle, "Effects of diets containing gossypol on spermatogenic tissues of young bulls," *Theriogenology*, vol. 30, no. 3, pp. 507–516, 1988.
- [130] G. S. Romualdo, G. R. Klinefelter, and W. de Grava Kempinas, "Postweaning exposure to gossypol results in epididymis-specific effects throughout puberty and adulthood in rats," *Journal of Andrology*, vol. 23, no. 2, pp. 220–228, 2002.
- [131] M. Zhang, H. Yuan, Z. He et al., "DNA damage and decrease of cellular oxidase activity in piglet sertoli cells exposed to gossypol," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 14, pp. 2797–2802, 2011.
- [132] N. Timurkaan, F. Yilmaz, and S. Timurkaan, "Effects of cottonseed flour on immunohistochemical localization of androgen receptors (AR) in rat testes," *Revue de Medecine Veterinaire*, vol. 162, no. 1, pp. 13–17, 2011.
- [133] M. L. Gray, L. W. Greene, and G. L. Williams, "Effects of dietary gossypol consumption on metabolic homeostasis and reproductive endocrine function in beef heifers and cows," *Journal of Animal Science*, vol. 71, no. 11, pp. 3052–3059, 1993.
- [134] G. O. Adeyemo, O. G. Longe, and D. O. Adejumo, "The reproductive performance of breeder cocks fed cottonseed cake-based diets," *International Journal of Poultry Science*, vol. 6, no. 2, pp. 140–144, 2007.
- [135] G. Basini, S. Bussolati, L. Baioni, and F. Grasselli, "Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function," *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 37, no. 1, pp. 30–36, 2009.
- [136] Y. Gu, Y. C. Lin, and Y. Rikihisa, "Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 169, no. 2, pp. 455–461, 1990.
- [137] Y. C. Lin, S. Coskun, and A. Sanbuissho, "Effects of gossypol on in vitro bovine oocyte maturation and steroidogenesis in bovine granulosa cells," *Theriogenology*, vol. 41, no. 8, pp. 1601–1611, 1994.
- [138] S. M. Zirkle, Y. C. Lin, F. C. Gwazdauskas, and R. S. Canseco, "Effect of gossypol on bovine embryo development during the preimplantation period," *Theriogenology*, vol. 30, no. 3, pp. 575–582, 1988.
- [139] Y. C. Lin, P. Rajamahendran, and Y. Rikihisa, "Inhibition of rat embryo implantation in the gossypol-treated uterine horn," *Theriogenology*, vol. 35, no. 4, pp. 769–777, 1991.
- [140] J. Hernández-Cerón, F. D. Jousan, P. Soto, and P. J. Hansen, "Timing of inhibitory actions of gossypol on cultured bovine embryos," *Journal of Dairy Science*, vol. 88, no. 3, pp. 922–928, 2005.
- [141] M. Villaseñor, A. C. Coscioni, K. N. Galvão, R. C. Chebel, and J. E. P. Santos, "Gossypol disrupts embryo development in heifers," *Journal of Dairy Science*, vol. 91, no. 8, pp. 3015–3024, 2008.
- [142] Y. C. Lin, A. Sanbuissho, S. Coskun, and Y. Rikihisa, "Inhibition of in vitro fertilization and early embryonic development in hamsters by gossypol," *Life Sciences*, vol. 55, no. 14, pp. 1139–1145, 1994.
- [143] Y. F. Li, G. M. Booth, and R. E. Seegmiller, "Evidence for embryotoxicity of gossypol in mice and chicks with no evidence of mutagenic activity in the ames test," *Reproductive Toxicology*, vol. 3, no. 1, pp. 59–62, 1989.
- [144] G. M. Sein, "The embryotoxic and immunodepressive effects of gossypol," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 14, no. 3–4, pp. 110–115, 1986.
- [145] H. Morales, P. Tilquin, J. F. Rees, A. Massip, F. Dessy, and A. van Langendonck, "Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 52, no. 2, pp. 149–157, 1999.

- [146] J.-C. Hervé, F. Pluciennik, B. Bastide et al., "Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells," *European Journal of Pharmacology*, vol. 313, no. 3, pp. 243–255, 1996.
- [147] E. Yurtcu, M. A. Ergun, and A. Menevse, "Apoptotic effect of gossypol on human lymphocytes," *Cell Biology International*, vol. 27, no. 9, pp. 791–794, 2003.
- [148] G.-H. Cui, Z.-L. Xu, Z.-J. Yang, Y.-Y. Xu, and S.-P. Xue, "A combined regimen of gossypol plus methyltestosterone and ethinylestradiol as a contraceptive induces germ cell apoptosis and expression of its related genes in rats," *Contraception*, vol. 70, no. 4, pp. 335–342, 2004.
- [149] M. A. Ergun, E. Konac, D. Erbas, and A. Ekmekci, "Apoptosis and nitric oxide release induced by thalidomide, gossypol and dexamethasone in cultured human chronic myelogenous leukemic K-562 cells," *Cell Biology International*, vol. 28, no. 3, pp. 237–242, 2004.
- [150] D.-O. Moon, M.-O. Kim, J.-D. Lee, and G.-Y. Kim, "Gossypol suppresses NF- κ B activity and NF- κ B-related gene expression in human leukemia U937 cells," *Cancer Letters*, vol. 264, no. 2, pp. 192–200, 2008.
- [151] E. Cengiz, B. Karaca, Y. Kucukzeybek et al., "Overcoming drug resistance in hormone-and drug-refractory prostate cancer cell line, PC-3 by docetaxel and gossypol combination," *Molecular Biology Reports*, vol. 37, no. 3, pp. 1269–1277, 2010.
- [152] D.-O. Moon, Y. H. Choi, S.-K. Moon, W.-J. Kim, and G.-Y. Kim, "Gossypol decreases tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression of NF- κ B activity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 4, pp. 999–1005, 2011.
- [153] J.-S. Cheng, Y.-K. Lo, J.-H. Yeh et al., "Effect of gossypol on intracellular Ca^{2+} regulation in human hepatoma cells," *Chinese Journal of Physiology*, vol. 46, no. 3, pp. 117–122, 2003.
- [154] A. P. Braga, M. V. MacIel, D. G. F. Guerra, I. S. A. S. Maia, S. C. S. Oloris, and B. Soto-Blanco, "Extruded-expelled cottonseed meal decreases lymphocyte counts in male sheep," *Revue de Medecine Veterinaire*, vol. 163, no. 3, pp. 147–152, 2012.
- [155] W.-B. Xu, L.-H. Xu, H.-S. Lu et al., "The immunosuppressive effect of gossypol in mice is mediated by inhibition of lymphocyte proliferation and by induction of cell apoptosis," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 30, no. 5, pp. 597–604, 2009.
- [156] P. J. E. Quintana, A. de Peyster, S. Klatzke, and H. J. Park, "Gossypol-induced DNA breaks in rat lymphocytes are secondary to cytotoxicity," *Toxicology Letters*, vol. 117, no. 1-2, pp. 85–94, 2000.
- [157] D. Sijun, A. Pawlak, B. Poźniak et al., "Effects of gossypol acetic acid on cellular and humoral immune response in non-immunized and SRBC-immunized mice," *Central-European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 11–19, 2012.
- [158] D. Xu, W.-J. Cai, B.-H. Zhu, C.-J. Dong, Z.-C. Zheng, and Z.-Q. Gao, "Clinical safety of long-term administration of gossypol in 32 cases," *Contraception*, vol. 37, no. 2, pp. 129–135, 1988.
- [159] D. Nagalakshmi, V. R. B. Sastry, D. K. Agrawal, and R. C. Katiyar, "Haematological and immunological response in lambs fed on raw and variously processed cottonseed meal," *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 14, no. 1, pp. 21–29, 2001.
- [160] A. K. Pattanaik, V. R. B. Sastry, D. K. Singh, T. K. Goswami, and D. N. Mohanty, "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 Journal of Animal Sciences*, vol. 16, no. 9, pp. 1291–1296, 2003.
- [161] K. Ohuchi, M. Watanabe, N. Hirasawa, S. Tsurufuji, T. Ozeki, and H. Fujiki, "Inhibition by gossypol of tumor promoter-induced arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages," *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, vol. 971, no. 1, pp. 85–91, 1988.
- [162] M. M. Barros, C. Lim, and P. H. Klesius, "Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge," *Aquaculture*, vol. 207, no. 3-4, pp. 263–279, 2002.
- [163] M. Yildirim, C. Lim, P. J. Wan, and P. H. Klesius, "Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid," *Aquaculture*, vol. 219, no. 1-4, pp. 751–768, 2003.
- [164] G. S. Fisher, A. W. Frank, and J. P. Cherry, "Total gossypol content of glandless cottonseed," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 36, no. 1, pp. 42–44, 1988.
- [165] G. A. Broderick and W. M. Craig, "Effect of heat treatment on ruminal degradation and escape, and intestinal digestibility of cottonseed meal protein," *Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 12, pp. 2381–2389, 1980.
- [166] M. H. Henry, G. M. Pesti, R. Bakalli et al., "The performance of broiler chicks fed diets containing extruded cottonseed meal supplemented with lysine," *Poultry Science*, vol. 80, no. 6, pp. 762–768, 2001.
- [167] H. Jaddou, M. Al Hakim, L. Z. Al Adamy, and M. T. Mhaisen, "Effect of gamma-radiation on gossypol in cottonseed meal," *Journal of Food Science*, vol. 48, no. 3, pp. 988–989, 1983.
- [168] C. Jo, H. S. Yook, M. S. Lee et al., "Irradiation effects on embryotoxicity and oxidative properties of gossypol dissolved in methanol," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 41, no. 10, pp. 1329–1336, 2003.
- [169] S. A. Smalley and E. J. Bicknell, "Gossypol toxicity in dairy cattle," *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, vol. 4, no. 9, pp. S378–S381, 1982.
- [170] X. Yang, J.-Y. Sun, J.-L. Guo, and X.-Y. Weng, "Identification and proteomic analysis of a novel gossypol-degrading fungal strain," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 92, no. 4, pp. 943–951, 2012.
- [171] H. Sun, J. W. Tang, C. L. Fang et al., "Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal," *Poultry Science*, vol. 92, no. 2, pp. 392–401, 2013.



ANEXO II – “GOSSYPOL PROMOTES DEGENERATION OF OVARIAN
FOLLICLES IN RATS”

Research Article

Gossypol Promotes Degeneration of Ovarian Follicles in Rats

Ivana Cristina Nunes Gadelha,¹ Michelly Fernandes de Macedo,¹
Sílvia Catarina Salgado Oloris,² Marília Martins Melo,³ and Benito Soto-Blanco³

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, BR 110 Km 47,
59628-360 Mossoró, RN, Brazil

² Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro 80, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais,
Av. enida Antônio Carlos 6627, 30123-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Benito Soto-Blanco; bsotoblanco@yahoo.com.br

Received 28 April 2014; Accepted 15 July 2014; Published 23 July 2014

Academic Editor: Elisabetta Baldi

Copyright © 2014 Ivana Cristina Nunes Gadelha et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present study aimed to determine if gossypol interferes with ovarian follicles in rats. Twenty-four female Wistar rats were assigned to two equal groups: one control group and the other dosed with gossypol (25 mg/kg/day, subcutaneously) for 15 days. Ovarian follicles were histologically classified according to the stage of development and as normal or atretic. Gossypol treatment reduced the length of estrous with an increase in the duration of the diestrus phase. This compound was responsible for reduced serum levels of T4 and progesterone. Treatment with gossypol was responsible for a significant reduction in the number of normal ovarian follicles and a significant increase in the number of atretic follicles, both in all stages of development. Thus, treatment of rats with gossypol was responsible for reduction in the number of viable follicles and changes in hormone levels that resulted in interference of the estrous cycle.

1. Introduction

Gossypol (2,2-bi(8-formyl-1,6,7-trihydroxy-5-isopropyl-3-methylnaphthalene)) is a polyphenolic compound produced by pigment glands in roots, stems, leaves, seeds, and flower buds of cotton (*Gossypium* spp). The function of this compound is to deter various insects from feeding on the plant [1, 2]. Signs of gossypol toxicosis include decreased growth rate, anorexia, labored breathing, and dyspnea [2]. Other effects include damage to hepatocytes [3, 4] and lymphocyte cytotoxicity leading to immunodeficiency [5–7].

The male reproductive toxicity of gossypol has been reported in many studies [8]. Gossypol inhibits spermatogenesis by decreasing the sperm count and spermatozoid motility and viability. The male infertility effect is caused by impaired sperm motility, decreased sperm concentrations, and specific mitochondrial injury to the sperm tail and damage to the germinal epithelium [9–12]. The gossypol-mediated

spermatozoid disturbance mechanism includes inhibition of the release and utilization of ATP by sperm cells [13]. Furthermore, gossypol inhibits calcium influx and Mg-ATPase and Ca-Mg-ATPase activity in spermatozoid plasmatic membranes [14]. Abnormal spermatozooids are produced because gossypol produces ultrastructural alterations in the nuclear membrane, endoplasmic reticulum, and mitochondria [15, 16]. In cultured Sertoli cells from pigs, gossypol also decreased cellular oxidase activity and DNA damage [17]. Reduced nuclear expression of androgen receptors was observed in Leydig cells, Sertoli cells, and myoid cells from rats fed gossypol-rich cottonseed flour [18]. However, such effects are reversible after the cessation of gossypol exposure [19].

Even though gossypol has well-known toxic effects in the male reproductive system, there are few studies on its effects on female reproduction. Female exposure to gossypol has been associated with interference of the estrous cycle,

pregnancy, and early embryonic development [1, 2]. Gossypol has been shown to affect rodent estrous cycles [20, 21] and pig granulosa cell function [22]. Gossypol affected ovarian steroidogenesis *in vitro* [23, 24] as well as bovine oocyte cumulus expansion and nuclear maturation [24]. The present study aimed to determine whether gossypol interferes with the ovarian folliculogenesis in rats. Our work also proposes a model for determining the effects of toxic substances on ovarian metabolism by ovarian follicle classification and quantification.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Female Wistar rats, 60 to 70 days old, weighing approximately 120 g each, from the Animal Sciences Department, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil, were used. During the entire study period, the rats were housed in plastic cages under controlled environmental conditions with a 12 h light/dark cycle and at a temperature of $24 \pm 3^\circ\text{C}$. Regular rodent chow (Labina, Purina, São Lourenço da Mata, PE, Brazil) and tap water were provided *ad libitum*. Animal studies have been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Universidade Federal Rural do Semi-Árido/UFERSA (process number 23091.000690/2012-72) and have been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

2.2. Experimental Design. The estrous cycle of the rats was monitored twice a day by vaginal smear for seven consecutive days; only rats that exhibited regular estrous cycles were used in the experiment. Twenty-four female rats were randomly and equally distributed into two groups: a control group (injected with saline solution subcutaneously) and a group dosed with gossypol (25 mg/kg/day subcutaneously) for 15 consecutive days. Rats were dosed with (+/-) gossypol acetic acid (Fluka, G4382) with purity about 95%.

Vaginal smears were carried out on each animal every day between 7:00 and 9:00 a.m. and again between 5:00 and 6:00 p.m. The smears were collected by lavage with 20 μL of 0.9% NaCl solution, spotted thinly on a microscope slide, and evaluated under a light microscope. The cell counts and morphology were used for the determination of the estrous cycle phases, characterized as proestrus, estrus, metestrus, and diestrus [25].

On the day after the last dosing, all rats were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (5 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) to collect the ovaries, uterus, thyroid glands, and blood samples from the vena cava. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were sliced into 5 μm thick sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis.

2.3. Hormonal Analysis. Frozen sera were used for the determination of the serum levels of estradiol, progesterone, luteinizing hormone (LH), thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), and thyroid stimulating hormone (TSH). Hormone levels were analyzed by an ELISA automated analyzer (Elisys

Uno, Human, Wiesbaden, Germany) with specific kits (RPC Diagnostic Systems, Nizhny Novgorod, Russia).

2.4. Morphological Analysis of the Ovarian Follicles. The ovaries from all rats were collected and fixed in 10% buffered formalin. Five-micron thick paraffin-embedded sections were collected at 60 μm intervals throughout the tissue and stained with H&E. Histological analysis, including qualitative and quantitative assessment of ovarian follicles, was performed. Follicles were classified according to the stage of development as primordial, primary, secondary, or antral [26]. Primordial follicles were defined as those with one layer of flattened granulosa cells, primary follicles presented one layer of cuboidal granulosa cells, secondary follicles presented two layers of cuboidal granulosa cells, and antral follicles presented the antral cavity (Figure 1).

Follicles were also classified as normal or atretic. Normal follicles presented a regular shape and well-organized granulosa cells, without signs of atresia. Atretic follicles were characterized by retracted oocytes, a pyknotic nucleus, discontinued basement membrane, and disorganized granulosa cells [27, 28].

2.5. Statistical Analysis. The obtained data were statistically analyzed using R software (version 3.0.0). Data normality was evaluated using a Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance was evaluated using an *F* test. Welch's *t*-test was employed and *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

No clinical signs of poisoning were observed in any of the rats. There was no significant difference in body weight between the groups on the first and last days of the experiment, but body weight gain was significantly ($P < 0.05$) reduced in rats dosed with gossypol (Table 1). Furthermore, the treatment with gossypol significantly ($P < 0.05$) increased the length of the diestrus stage (Table 1).

At necropsy, hydrometra was observed in five of the rats dosed with gossypol and in one rat from the control group. No histological lesions were found in the thyroid glands or the uterus from any of the rats.

Our results also verified that gossypol was responsible for hormonal interference, characterized by significantly ($P < 0.05$) reduced serum levels of T4 and progesterone and a significantly ($P < 0.05$) increased T3/T4 ratio (Table 2). Conversely, gossypol treatment did not affect the serum levels of T3, TSH, LH, and estradiol.

Additionally, treatment with gossypol was responsible for a significant ($P < 0.05$) reduction in the number of normal ovarian follicles and a significant ($P < 0.05$) increase in the number of atretic follicles, both in all stages of development (Table 3 and Figure 2). On average, the ovaries of female rats in the control group had 83.3% normal follicles and 16.7% atretic follicles, whereas rats treated with gossypol had normal and atretic follicle incidence rates of 36.6% and 63.4%, respectively.

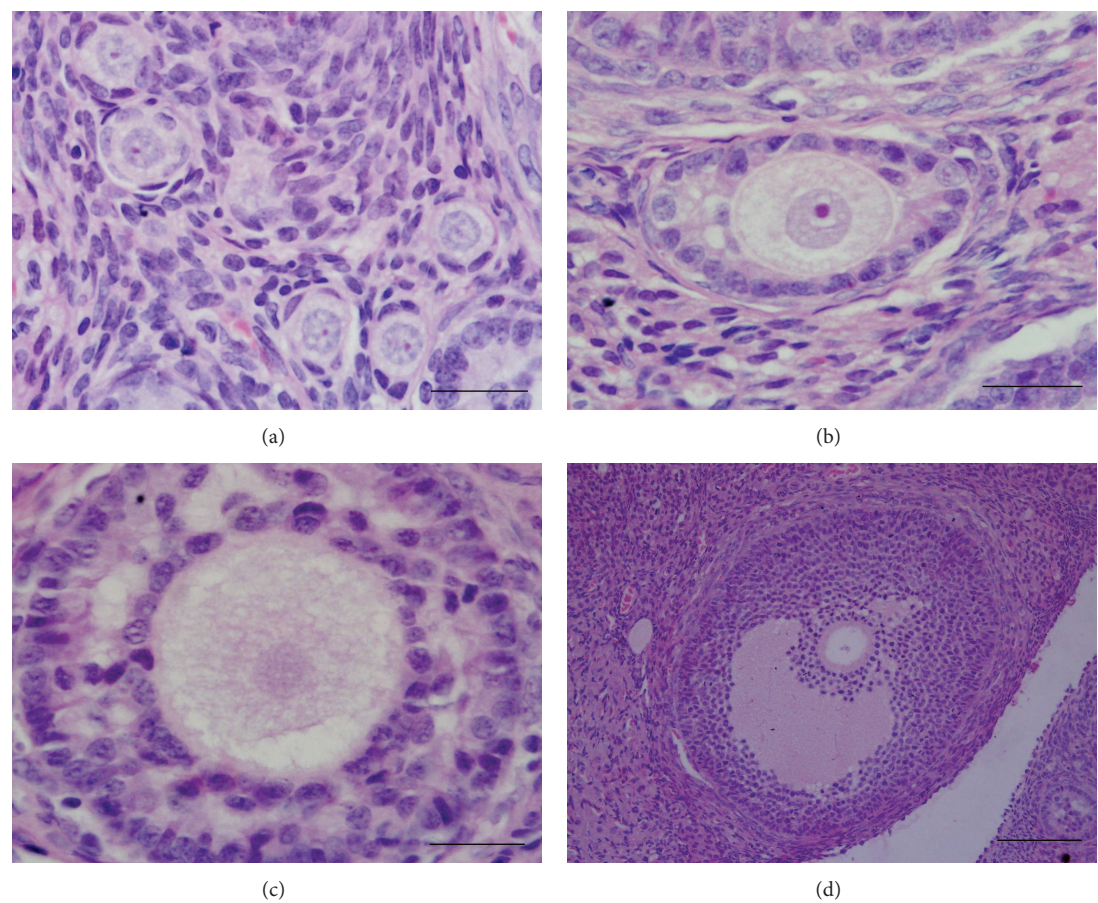


FIGURE 1: Ovaries from control rats showing normal (a) primordial, (b) primary, (c) secondary (H&E, bar = 25 μm), and (d) antral follicles (H&E, bar = 100 μm).

TABLE 1: Body weight, body weight gain (in grams), and length (in hours) of the estrous cycle phases of female rats dosed with gossypol (25 mg/kg/day) or 0.9% saline (control group) subcutaneously for 15 consecutive days.

	Control (<i>n</i> = 12)	Gossypol (<i>n</i> = 12)	<i>P</i> value ¹
Body weight (g)			
Day 0	190.4 ± 4.32	192.2 ± 7.62	n.s.
Day 15	197.5 ± 2.91	186.7 ± 6.15	n.s.
Body weight gain (g)	7.08 ± 2.07	−5.58 ± 2.43	0.0006792
Diestrus (h)	44.0 ± 1.71	51.0 ± 2.15	0.01875
Metestrus (h)	1.00 ± 0.67	3.50 ± 1.73	n.s.
Estrus (h)	24.5 ± 1.88	20.0 ± 1.71	n.s.
Proestrus (h)	26.5 ± 1.16	21.5 ± 2.39	n.s.

¹ Welch's *t* test.
n.s.: not significant (*P* > 0.05).

4. Discussion

We found that gossypol treatment resulted in increase in the length of the diestrus and metestrus stages (about 116% and 350% of controls, resp.) and reduction in the length of the proestrus and estrus stages (both about 81% of controls). Interferences on estrous cycle were observed by others [20, 21]. The administration of 20 mg/kg of gossypol acetic acid

orally for 60 days [20] and of 25 mg/kg gossypol acetic acid via intramuscular injection for 3 to 5 days [21] caused prolonged and irregular estrous cycles in rats. Female rats dosed with 60 mg/kg gossypol acetic acid for 30 days showed a reduced number of estrus cycles, which did not occur when they were dosed with 40 mg/kg [29]. Similarly to our study, the percentage of animals in diestrus was increased in rats dosed with 5 or 10 mg gossypol/kg/day subcutaneously for 20 days

TABLE 2: Serum concentrations of estradiol, progesterone, luteinizing hormone (LH), thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), and thyroid stimulating hormone (TSH) in female rats dosed with gossypol (25 mg/kg/day) or 0.9% saline (control group) subcutaneously for 15 consecutive days.

	Control (<i>n</i> = 12)	Gossypol (<i>n</i> = 12)	<i>P</i> value ¹
T4 (ng/dL)	2.21 ± 0.10	1.80 ± 0.12	0.01446
T3 (pg/mL)	5.68 ± 0.41	7.73 ± 1.07	n.s.
T3/T4 ratio	2.62 ± 0.19	4.62 ± 0.77	0.02635
TSH (μIU/mL)	4.00 ± 1.76	3.91 ± 1.75	n.s.
Progesterone (ng/mL)	48.3 ± 7.61	24.5 ± 4.16	0.01317
LH (mIU/mL)	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.04	n.s.
Estradiol (pg/mL)	10.7 ± 3.83	16.7 ± 4.53	n.s.

¹ Welch's *t* test.

n.s.: not significant (*P* > 0.05).

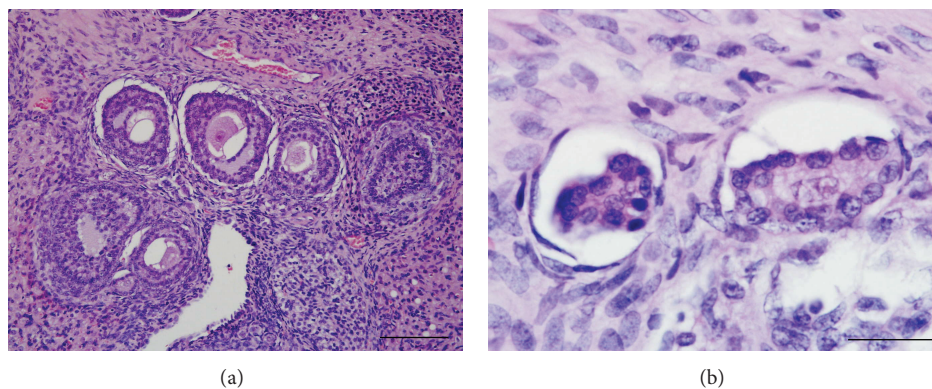


FIGURE 2: (a) Ovaries from gossypol treated rats showing atretic primordial, primary, and secondary follicles (H&E, bar = 100 μm). (b) Atretic primordial and primary follicles from a gossypol-dosed rat (H&E, bar = 25 μm).

[30]. Conversely, gossypol treatment has been shown to have no effect on ovulation in rats [31] and did not alter estrous cycles in hamsters [32].

Our results verified that gossypol is responsible for hormonal interference, as evidenced by reduced serum levels of progesterone and T4 and an increased T3/T4 ratio. Reduced serum levels of progesterone were reported in female rats that received 25 mg/kg gossypol acetic acid via intramuscular injection for 3 to 5 days [21] and in pregnant rats dosed orally with 60, 90, and 120 mg/kg/day gossypol acetic acid for the first 10 days after coitus [33]. Data from the *in vitro* studies indicate that gossypol inhibited the basal and stimulated progesterone secretion levels in luteal cells [23, 34], granulosa cells from small follicles [35], and oocyte-cumulus complexes isolated from large antral porcine follicles [36]. Several mechanisms may be involved in the inhibition of progesterone synthesis, including the inhibition of adenylate cyclase [23, 34] and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase [37], as well as by nitric oxide generation [35]. Thus, the interference of ovarian steroidogenesis may be the mechanism by which gossypol affects the estrous cycle.

Gossypol is also an antithyroidal compound [38, 39]. Rats from the present study showed reduced serum levels of free T4 and had an increased T3/T4 ratio. Earlier studies with male [38] and female [39] rats showed decreased blood levels of free T4 and T3 levels after dosing with gossypol acetic acid.

Moreover, the histopathological evaluation of thyroid glands from male rats revealed follicular degeneration and atrophy [38], but no histological alteration was observed in thyroid glands in our study. Reduced T3 levels were also observed in rabbits, but this reduction was reverted when dosing was discontinued [10]. However, gossypol dosing resulted in increased T3 serum levels without affecting T4 in rats [40] and sheep [41]. The thyrotropic cells in the pituitary gland, which specializes in TSH synthesis and secretion, showed hypertrophy, hyperplasia, and degranulation after gossypol acetate dosing in rats [42]. This finding differs from our results, which indicated that TSH levels were not affected by gossypol treatment. Although these findings are conflicting, there is a general consensus that gossypol affects thyroid gland metabolism, but the mechanism is uncertain.

The treatment with gossypol was also responsible for both a significant reduction in the number of normal follicles and a significant increase in the number of atretic follicles in all stages of development. On average, the ovaries of the rats in the control group had 83.3% normal follicles and 16.7% atretic follicles, whereas the rats treated with gossypol had 36.6% normal follicles and 63.4% atretic follicles. All types of normal follicle cell types are reduced about a third and the atretic follicle cell types are increased about three times. The ovarian weight was decreased in rats dosed with 5 or 10 mg gossypol/kg/day subcutaneously for 20 days [30].

TABLE 3: Ovarian follicle populations in female rats dosed with gossypol (25 mg/kg/day) or 0.9% saline (control group) subcutaneously for 15 consecutive days.

Follicles	Control (n = 12)	Gossypol (n = 12)	P value ¹
Number of normal follicles			
Primordial	341.8 ± 25.6	122.6 ± 20.1	<0.0001
Primary	115.5 ± 14.8	49.0 ± 5.03	0.0008635
Secondary	62.6 ± 11.3	20.1 ± 4.54	0.003426
Antral	55.8 ± 6.52	14.5 ± 3.71	<0.0001
Total	575.6 ± 51.8	206.2 ± 27.9	<0.0001
Number of atretic follicles			
Primordial	66.3 ± 10.7	168.3 ± 24.1	0.001489
Primary	22.5 ± 2.32	65.8 ± 6.99	<0.0001
Secondary	22.2 ± 4.26	71.7 ± 9.44	0.00023
Antral	8.08 ± 1.52	39.6 ± 3.95	<0.0001
Total	119.1 ± 12.8	345.4 ± 32.8	<0.0001
Proportion of follicles (in %)			
Normal	82.1 ± 2.05	36.6 ± 1.73	<0.0001
Atretic	17.8 ± 2.05	63.4 ± 1.73	<0.0001
Number of total follicles			
Total	694.7 ± 54.5	551.6 ± 57.2	n.s.

¹ Welch's *t* test.n.s.: not significant (*P* > 0.05).

Conversely, no pathological lesions were found in the ovaries of female rats dosed with 40 or 60 mg/kg gossypol acetic acid for 30 days [29]. However, in both studies [29, 30] the ovarian follicles were not classified not counted. Thus, the classification and counting of ovarian follicles used in our study may be a useful tool for studying compounds that potentially affect female gametogenesis.

In female mammals, the number of ovarian primordial follicles is fixed at the time of birth. The primordial follicles grow into primary, secondary, and antral follicles in a continuous and nonreversible process. The damage to primary, secondary, and antral follicles may lead to temporary infertility when the primordial follicles are not affected. On the other hand, the injury to primordial follicles may result in permanent infertility because of the eventual depletion of the pool of these follicles [43]. Therefore, it is feasible to speculate that gossypol exposure may reduce the ovarian reserve of follicles, impairing female fertility. However, gossypol seems to not be a potential drug to promote female castration because of its toxicity, which in our study was evidenced by body weight loss.

It was observed that gossypol inhibited steroidogenic activity and redox status and stimulated the vascular endothelial growth factor production in an *in vitro* experiment with porcine granulosa cells [22]. Furthermore, gossypol showed cytotoxic and apoptotic activity in ovarian carcinoma cell lines [44, 45]. Due to increased follicular atresia, the folliculogenesis could be severely degraded by the action of this compound, dramatically reducing the conception rate of exposed females. In fact, female rats that received 20 mg/kg/day of gossypol acetic acid for 60 days presented delayed mating and a reduced rate of pregnancy and number of viable embryos when compared to controls [20]. Additionally, it is

likely that exposed females will experience early reproductive senescence.

An additional interesting observation made at necropsy was the occurrence of hydrometra in five rats from the gossypol treated group and one rat from the control group. High incidence of infertility and atrophy of the uterus was observed in women exposed to gossypol through the ingestion of cottonseed oil in China [8]. Thus, the increased frequency of hydrometra must be one of the effects of gossypol, which likely contributes to the infertility of females exposed through the ingestion of cotton seed.

In conclusion, treatment with gossypol was responsible for interference of the estrous cycle in the rats. This interference involved a reduction in the number of viable follicles as well as hormonal changes, which might negatively impact female reproduction. The overall results from the present study show the relevance of ovarian follicle classification and quantification in the determination of estrous cycling. This is pertinent for future studies that aim to determine the effects of toxic substances on ovarian metabolism.

Conflict of Interests

The authors declared no potential conflict of interests with respect to the research, authorship, and/or publication of this paper.

Acknowledgments

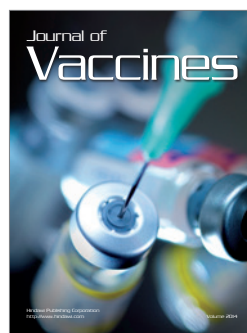
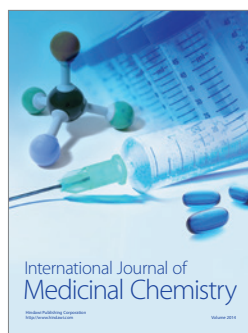
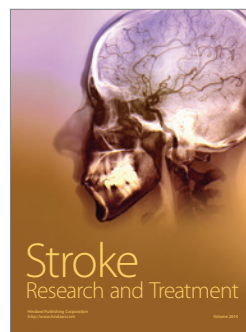
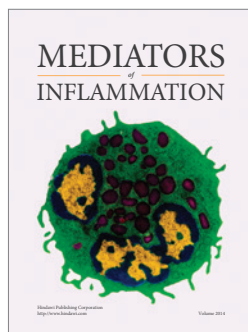
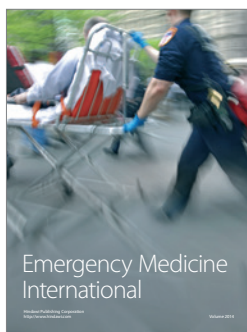
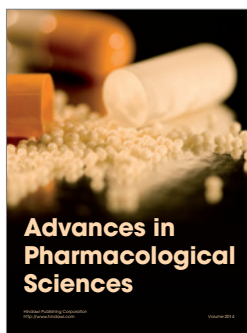
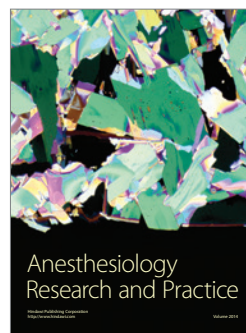
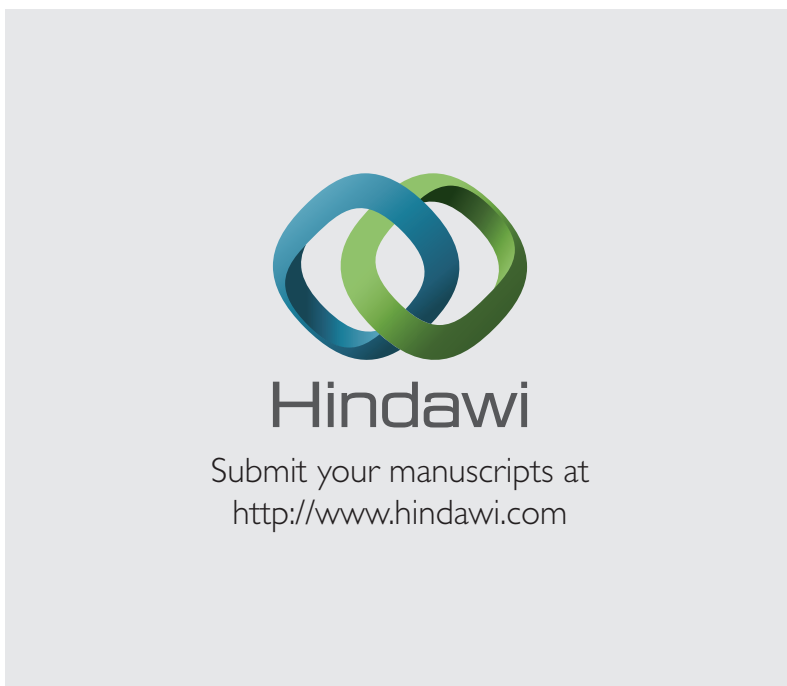
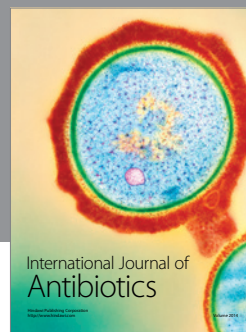
Michelly Fernandes de Macedo was supported by postdoctoral fellowship from CAPES-PNPD (project no. 23038.00-7325/2011-52). This research has been supported by the grant

of the CNPq (project no. 474432/2012-2) and support for language editing of the Pró-Reitoria de Pesquisa of the Universidade Federal de Minas Gerais (Edital PRP-UFMG 03/2013).

References

- [1] I. C. N. Gadelha, A. H. N. Rangel, A. R. Silva, and B. Soto-Blanco, "Efeitos do gossypol na reprodução animal," *Acta Veterinaria Brasileira*, vol. 5, no. 2, pp. 129–135, 2011.
- [2] I. C. N. Gadelha, N. B. S. Fonseca, S. C. S. Oloris, and B. Soto-Blanco, "Gossypol toxicity from cottonseed products," *The Science World Journal*, vol. 2014, Article ID 231635, 11 pages, 2014.
- [3] D. P. Deoras, P. Young-Curtis, R. R. Dalvi, and F. E. Tippet, "Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats," *Veterinary Research Communications*, vol. 21, no. 5, pp. 317–323, 1997.
- [4] N. B. D. S. Fonseca, I. C. N. Gadelha, S. C. S. Oloris, and B. Soto-Blanco, "Effectiveness of albumin-conjugated gossypol as an immunogen to prevent gossypol-associated acute hepatotoxicity in rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 56, pp. 149–153, 2013.
- [5] W. Xu, L. Xu, H. Lu et al., "The immunosuppressive effect of gossypol in mice is mediated by inhibition of lymphocyte proliferation and by induction of cell apoptosis," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 30, no. 5, pp. 597–604, 2009.
- [6] A. P. Braga, M. V. Maclel, D. G. F. Guerra, I. S. A. S. Maia, S. C. S. Oloris, and B. Soto-Blanco, "Extruded-expelled cottonseed meal decreases lymphocyte counts in male sheep," *Revue de Medecine Veterinaire*, vol. 163, no. 3, pp. 147–152, 2012.
- [7] B. Song, G. Huang, C. Tong et al., "Gossypol suppresses mouse T lymphocytes via inhibition of NF κ B, NFAT and AP-1 pathways," *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 35, no. 5, pp. 615–621, 2013.
- [8] J. Alexander, D. Benford, A. Cockburn et al., "Gossypol as undesirable substance in animal feed," *EFSA Journal*, vol. 908, pp. 1–55, 2008.
- [9] O. B. Akinola, O. O. Dosunmu, L. Dini, and S. Ajayi, "Proteinaceous diet inhibits gossypol-induced spermatotoxicity," *European Journal of Histochemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 205–208, 2006.
- [10] T. A. Taha, W. F. Shaaban, A. R. El-Mahdy, F. D. El-Nouty, and M. H. Salem, "Reproductive toxicological effects of gossypol on male rabbits: semen characteristics and hormonal levels," *Animal Science*, vol. 82, no. 2, pp. 259–269, 2006.
- [11] S. Roychoudhury, P. Massanyi, J. Slamecka et al., "In vitro gossypol induced spermatozoa motility alterations in rabbits," *Journal of Environmental Science and Health B*, vol. 44, no. 7, pp. 730–741, 2009.
- [12] A. S. El-Sharak, A. A. Newairy, N. M. Elguindy, and A. A. Elwafa, "Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 12, pp. 3354–3361, 2010.
- [13] Y. Anna, A. G. Medentsev, and V. I. Krupyanko, "Gossypol inhibits electron transport and stimulates ROS generation in yarrowia lipolytica mitochondria," *Open Biochemistry Journal*, vol. 6, pp. 11–15, 2012.
- [14] H. Breitbart, S. Rubinstein, and L. Nass-Arden, "Effect of gossypol-acetic acid on calcium transport and ATPase activity in plasma membranes from ram and bull spermatozoa," *International Journal of Andrology*, vol. 7, no. 5, pp. 439–447, 1984.
- [15] P. J. Chenoweth, C. C. Chase Jr., C. A. Risco, and R. E. Larsen, "Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls," *Theriogenology*, vol. 53, no. 5, pp. 1193–1203, 2000.
- [16] G. S. Romualdo, G. R. Klinefelter, and W. De Grava Kempinas, "Postweaning exposure to gossypol results in epididymis-specific effects throughout puberty and adulthood in rats," *Journal of Andrology*, vol. 23, no. 2, pp. 220–228, 2002.
- [17] M. Zhang, H. Yuan, Z. He et al., "DNA damage and decrease of cellular oxidase activity in piglet sertoli cells exposed to gossypol," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 14, pp. 2797–2802, 2011.
- [18] N. Timurkaan, F. Yilmaz, and S. Timurkaan, "Effects of cottonseed flour on immunohistochemical localization of androgen receptors (AR) in rat testes," *Revue de Medecine Veterinaire*, vol. 162, no. 1, pp. 13–17, 2011.
- [19] M. E. Hassan, G. W. Smith, R. S. Ott et al., "Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls," *Theriogenology*, vol. 61, no. 6, pp. 1171–1179, 2004.
- [20] R. K. Lagerlof and J. N. Tone, "The effect of gossypol acetic acid on female reproduction," *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 8, no. 6, pp. 469–482, 1985.
- [21] Y. C. Lin, T. Fukaya, Y. Rikihisa, and A. Walton, "Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats," *Life Sciences*, vol. 37, no. 1, pp. 39–47, 1985.
- [22] G. Basini, S. Bussolati, L. Baioni, and F. Grasselli, "Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function," *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 37, no. 1, pp. 30–36, 2009.
- [23] Y. Gu, Y. C. Lin, and Y. Rikihisa, "Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic pathways in cultured bovine luteal cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 169, no. 2, pp. 455–461, 1990.
- [24] Y. C. Lin, S. Coskun, and A. Sanbuissho, "Effects of gossypol on in vitro bovine oocyte maturation and steroidogenesis in bovine granulosa cells," *Theriogenology*, vol. 41, no. 8, pp. 1601–1611, 1994.
- [25] F. K. Marcondes, F. J. Bianchi, and A. P. Tanno, "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 62, no. 4A, pp. 609–614, 2002.
- [26] T. Pedersen and H. Peters, "Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 17, no. 3, pp. 555–557, 1968.
- [27] T. Israely, H. Dafni, D. Granot, N. Nevo, A. Tsafiriri, and M. Neeman, "Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts," *Biology of Reproduction*, vol. 68, no. 6, pp. 2055–2064, 2003.
- [28] A. Camboni, B. Martinez-Madrid, M. Dolmans, G. Macchiarelli, J. Donnez, and S. A. Nottola, "Contribution of transmission electron microscopy to the study of human ovarian tissue integrity after enzymatic isolation, cryopreservation or xenografting," *Fertility and Sterility*, vol. 84, supplement 1, p. S104, 2005.
- [29] H. S. Bender, G. K. Saunders, and H. P. Misra, "A histopathologic study of the effects of gossypol on the female rat," *Contraception*, vol. 38, no. 5, pp. 585–592, 1988.
- [30] Y. Gu and N. O. Anderson, "Effects of gossypol on the estrous cycle and ovarian weight in the rat," *Contraception*, vol. 32, no. 5, pp. 491–496, 1985.

- [31] D. W. Hahn, C. Rusticus, A. Probst, R. Homm, and A. N. Johnson, "Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents," *Contraception*, vol. 24, no. 1, pp. 97–105, 1981.
- [32] Y.-M. Wu, S. C. Chappel, and G. L. Flickinger, "Effects of gossypol on pituitary-ovarian endocrine function, ovulation and fertility in female hamsters," *Contraception*, vol. 24, no. 3, pp. 259–268, 1981.
- [33] Y. Q. Yang and X. Y. Wu, "Antifertility mechanisms of gossypol acetic acid in female rats," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 80, no. 2, pp. 425–429, 1987.
- [34] W. Nai-Gong, G. Mu-Zhen, and L. Hai-Peng, "Effects of gossypol acetic acid on rat luteal cells in vitro," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 20, no. 1, pp. 45–51, 1987.
- [35] J. Vranová, M. Ježová, S. Scsuková, and J. Kolena, "Inhibitory effect of gossypol on basal and luteinization factor-stimulated progesterone synthesis in porcine granulosa cells," *Physiological Research*, vol. 48, no. 2, pp. 119–128, 1999.
- [36] J. Kolena, S. Vršanská, E. Nagyová, and M. Ježová, "Gossypol inhibits follicle-stimulating hormone- and epidermal growth factor-stimulated expansion of oocyte-cumulus complexes from porcine preovulatory follicles," *Physiological Research*, vol. 50, no. 6, pp. 627–630, 2001.
- [37] Y. Gu, C. J. G. Chang, Y. Rikihisa, and Y. C. Lin, "Inhibitory effect of gossypol on human chorionic gonadotropin (hCG)-induced progesterone secretion in cultured bovine luteal cells," *Life Sciences*, vol. 47, no. 5, pp. 407–414, 1990.
- [38] Y. Rikihisa and Y. C. Lin, "Effect of gossypol on the thyroid in young rats," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 100, no. 4, pp. 411–417, 1989.
- [39] Y. C. Lin, M. Chitcharoenthum, and Y. Rikihisa, "Effect of gossypol on thyroid hormones in young female rats," *Contraception*, vol. 41, no. 4, pp. 431–440, 1990.
- [40] F. Tang and P. Y. D. Wong, "Serum potassium and aldosterone levels in gossypol-treated rats," *International Journal of Andrology*, vol. 7, no. 2, pp. 149–153, 1984.
- [41] M. Y. El-Mokadem, T. A. Taha, M. A. Samak, and A. M. Yassen, "Alleviation of reproductive toxicity of gossypol using selenium supplementation in rams," *Journal of Animal Science*, vol. 90, no. 9, pp. 3274–3285, 2012.
- [42] P. Udoh, D. R. Patil, and M. K. Deshpande, "Histopathological and biochemical effects of gossypol acetate on pituitary-gonadal axis of male albino rats," *Contraception*, vol. 45, no. 5, pp. 493–509, 1992.
- [43] A. N. Hirshfield, "Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 29, no. 1, pp. 10–15, 1997.
- [44] H. Atmaca, G. Gorumlu, B. Karaca et al., "Combined gossypol and zoledronic acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates angiogenic molecules in ovarian cancer cells," *European Cytokine Network*, vol. 20, no. 3, pp. 121–130, 2009.
- [45] J. Wang, L. Jin, X. Li et al., "Gossypol induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress," *Molecular BioSystems*, vol. 9, no. 6, pp. 1489–1497, 2013.



ANEXO III – “GOSSYPOL PROMOTES THE DEGENERATION OF CHICKEN
OVARIAN FOLLICLES IN VITRO”

Gossypol promotes the degeneration of chicken ovarian follicles *in vitro*

Ivana Cristina N. Gadelha¹, Mickael A. Lima¹, Marília M. Melo² and Benito Soto-Blanco^{2*}

¹Laboratory of Molecular Biology of Reproduction, Department of Animal Sciences, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil. E-mail: ivanacris@bol.com.br (ICNG), mikalima@live.com (MAL)

² Laboratory of Toxicology, Department of Veterinary Clinics and Surgery, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. Email: mariliamartinsmelovet@hotmail.com (MMM), benito.blanco@pq.cnpq.br (BSB)

* Corresponding author. Benito Soto-Blanco benito.blanco@pq.cnpq.br

Abstract

Background

Gossypol, a phenolic compound produced by the pigment glands of cotton, is known to affect male reproduction. In females, exposure to gossypol has been associated with interference with the estrous cycle and embryo development. In laying hens fed cottonseed, gossypol was found to reduce egg production and weight and to cause discoloration of the egg yolk and/or albumen. It is probable that gossypol would directly affect ovarian follicles, but this has not been confirmed experimentally. Thus, the aim of the present study was to determine whether gossypol affected cultivated ovarian follicles of the chicken.

Results

The ovarian follicles from adult female chickens were cultivated with different concentrations of gossypol (0, 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and classified according to the stage of development as primordial, transitional, primary, secondary or antral, and as viable or atretic. The percentages of viable and atretic follicles in ovaries that were cultivated for 24 hours in the presence of gossypol were significantly different from those of the controls for all of the types of follicles except secondary follicles, but in all types after cultivation for 7 days. The percentage of viable follicles was higher than that of atretic follicles in ovaries cultivated without gossypol. In contrast, ovaries cultivated with gossypol showed a predominance of atretic follicles.

Conclusions

Gossypol increases the proportion of atretic follicles at all stages of development in cultivated chicken ovaries. Thus, gossypol may affect ovarian follicular viability and maturation, which might interfere with female fertility.

Keywords: Cottonseed; Reproductive toxicology; Female reproduction; Ovaries

Background

Cottonseeds are used as a source of protein for animal feed, but their use is limited by the presence of gossypol, a toxic compound produced by the pigment glands of cotton [1, 2]. Gossypol (2,2-bi(8-formyl-1,6,7-trihydroxy-5-isopropyl-3-methylnaphthalene)) is a phenolic compound produced by the pigment glands in cotton stems, leaves, seeds and flower buds [3–6]. This compound is known to affect male reproduction. In fact, several studies reported that gossypol inhibited spermatogenesis, causing a decrease in the concentration of sperm and reducing spermatozoid motility and viability [7–20]. These effects were dose- and time-dependent but were reversed when gossypol were no longer ingested [14, 21].

In females, exposure to gossypol has been associated with interference with the estrous cycle of rodents [2, 22, 23] and with pregnancy, early embryonic development [14, 24, 25] and embryo implantation [26]. The ovaries of heifers fed cottonseed meal contained fewer large follicles (>5 mm) than those of heifers fed soybean meal [25]. Female rats dosed with gossypol (25 mg/kg/day subcutaneously) for 15 consecutive days showed smaller populations of viable ovarian follicles and larger populations of atretic follicles than did control rats. The number of all types of normal follicle cells was reduced by approximately one-third and the number of atretic follicle cells was increased approximately three times [27]. *In vitro* studies established that gossypol affected pig granulosa cellular functioning [28], bovine

ovarian steroidogenesis [29, 30] and bovine oocyte cumulus expansion and nuclear maturation [30].

In laying hens fed cottonseed, gossypol was found to reduce egg production [31–35] and weight [31, 32, 35] and to cause discoloration of the egg yolk and/or albumen [35–40]. The complete cessation of egg production may occur [31, 34]. It is probable that gossypol would directly affect ovarian follicles, but this has not been confirmed experimentally. Thus, the aim of the present study was to determine whether gossypol affected cultivated ovarian follicles of the chicken.

Methods

The ovaries were obtained from four adult female chickens of the Bantam breed. One ovary was fixed using Carnoy's solution (60% ethanol, 30% chloroform and 10% glacial acetic acid) for 12 hours (*in situ* control) for histological analysis. The other ovaries were cultivated in 24-well cell culture plates containing 1 ml of culture medium. The culture medium was alpha minimum essential medium (α -MEM) Eagle medium supplemented with 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/ml bovine serum albumin-BSA, 50 μ g/mL ascorbic acid (Sigma, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and antibiotics (100 μ g/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin, Gibco, Grand Island, NY, USA). Four concentrations of (+/-)-gossypol acetic acid (G4382, Fluka, Buchs, Switzerland) were tested: 0, 5, 10 and 20 μ g/mL. The plates were incubated at 39 °C in 5% CO₂ (Panasonic CO₂ Incubator MCO-18AC, Leicestershire, UK) for 24 hours or 7 days. The culture medium was replaced every 48 hours. After incubation, the ovaries were fixed and processed for histological analysis using hematoxylin and eosin staining.

At least 160 follicles per treatment were counted and classified. The follicles were classified according to the stage of development as primordial, transitional, primary, secondary or antral. The follicles were also classified as viable or atretic. The viable follicles presented a regular shape and well-organized granulosa cells, without signs of atresia. The atretic follicles were characterized by the presence of a retracted oocyte, a pyknotic nucleus, a discontinuous basement membrane, and disorganized granulosa cells.

The obtained data were statistically analyzed using R software (version 3.0.3) [41]. The frequencies of viable and atretic follicles were compared using Fisher's exact test. *P* values of < 0.05 were considered to indicate significance.

Results

The effect of the period of cultivation on the follicle populations of chicken ovaries is shown in Table 1. The follicle populations of freshly collected chicken ovaries and those cultivated for 24 hours or for 7 days were not significantly different.

The percentages of viable and atretic follicles in ovaries that were cultivated for 24 hours in the presence of gossypol were significantly different from those of the controls for all of the types of follicles except secondary follicles (Table 2). The percentage of viable follicles was higher than that of atretic follicles in ovaries cultivated without gossypol. In contrast, ovaries cultivated with gossypol showed a predominance of atretic follicles.

After cultivation for 7 days, the percentages of viable and atretic ovarian follicles of all types were significantly different (Table 2). A predominance of viable follicles in ovaries cultivated without gossypol and a predominance of atretic follicles in ovaries cultivated with gossypol was found.

Discussion

We found that chicken ovaries cultivated with gossypol at all of the tested concentrations showed an increased proportion of atretic follicles at all stages of development.

Several studies showed that laying hens fed cottonseed were adversely affected by gossypol. Several studies demonstrated reduced egg production after exposure to feed that contained various minimal levels of free gossypol, including 101.5 mg/kg [33], 126 mg/kg [34], 130 mg/kg [35], 200 mg/kg [31] and 400 mg/kg [32]. The complete cessation of egg production may occur in hens fed 1,008 mg/kg [34] and 1,500 mg/kg [31] of free gossypol in their feed. The egg weight was reduced by exposure to free gossypol in feed at 255 mg/kg [35] or 400 mg/kg [31, 32]. Other described adverse effects of gossypol exposure are discoloration the egg yolk and/or the albumen [35–40].

The reported effects of gossypol on egg production and egg quality may be due to its directly damaging the ovaries. However, no studies investigated this effect in an avian species. In rats, the ovarian weight was decreased after subcutaneous dosing with 5 or 10 mg gossypol/kg/day for 20 days [9]. Rats subcutaneously dosed with 25 mg gossypol /kg/day for 15 days exhibited a reduced number of normal ovarian follicles and an increased number of atretic follicles, both of these at all stages of development [27]. In cultivated porcine granulosa cells, gossypol inhibited steroidogenic activity and the redox status and stimulated the production of vascular endothelial growth factor [28]. Gossypol promoted cytotoxic and apoptotic activities in ovarian carcinoma cell lines [42, 43].

In our study, gossypol was observed to directly affect ovarian follicle cells, increasing the proportion of atretic follicles at all stages of development in cultivated chicken ovaries. Damage to primordial ovarian follicles permanently disrupts female reproduction because these cells develop into primary, secondary, and antral follicles in a continuous and nonreversible process [44]. Thus, it is likely that females exposed to gossypol might experience early reproductive senescence due to the reduction of the ovarian reserve of follicles.

Conclusion

Gossypol at all of the tested concentrations (5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) increased the proportion of atretic follicles at all stages of development in cultivated chicken ovaries. Thus, gossypol may affect ovarian follicular viability and maturation, which might interfere with female fertility.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BSB and MMM designed the study. ICNG and MAL performed laboratorial analysis. BSB, ICNG and MMM reviewed the literature and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from CNPq (project no. 474432/2012-2), and the language editing was funded by the Pró-Reitoria de Pesquisa of the Universidade Federal de Minas Gerais (Edital PRP-UFMG 03/2013).

References

1. Nagalakshmi D, Rao SVR, Panda AK, Sastry VRB: **Cottonseed meal in poultry diets: a review.** *J Poult Sci* 2007, **44**:119–134.
2. Gadelha ICN, Fonseca NBS, Oloris SCS, Soto-Blanco B: **Gossypol toxicity from cottonseed products.** *Sci World J* 2014, **2014**.
3. Rogers GM, Poore MH, Paschal JC: **Feeding cotton products to cattle.** *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2002, **18**:267–94.
4. Kenar JA: **Reaction chemistry of gossypol and its derivatives.** *J Am Oil Chem Soc* 2006, **83**:269–302.
5. Soto-Blanco B: **Gossipol e fatores antinutricionais da soja.** In *Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Edited by Spinosa HS, Górnica SL, Palermo Neto J. Barueri: Manole; 2008:531–45.
6. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi J, Dogliotti E, Domenico A Di, Fernández-cruz ML, Fürst P, Fink-gremmels J, Galli CL, Grandjean P, Gzyl J, Heinemeyer G, Mutti A, Schlatter J, Leeuwen R Van, Peteghem C Van, Verger P: **Gossypol as undesirable substance in animal feed.** *EFSA J* 2008, **908**:1–55.
7. Hahn DW, Rusticus C, Probst A, Homm R, Johnson AN: **Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents.** *Contraception* 1981, **24**:97–105.
8. Gåfvels M, Wang J, Bergh A, Damber J-E, Selstam G: **Toxic effects of the antifertility agent gossypol in male rats.** *Toxicology* 1984, **32**:325–333.
9. Gu Y, Anderson NO: **Effects of gossypol on the estrous cycle and ovarian weight in the rat.** *Contraception* 1985, **32**:491–496.
10. Lagerlöf RK, Tone JN: **The effect of gossypol acetic acid on female reproduction.** *Drug Chem Toxicol* 1985, **8**:469–482.

- 198 11. Chongthammakun S, Ekavipat C, Sanitwongse B, Pavasuthipaisit K: **Effects of**
 199 **gossypol on human and monkey sperm motility in vitro.** *Contraception* 1986,
 200 **34:323–331.**
- 201 12. Heywood R, Lloyd GK, Majeed SK, Gopinath C: **The toxicity of gossypol to the**
 202 **male rat.** *Toxicology* 1986, **40:279–284.**
- 203 13. Hong CY, Huang JJ, Wu P: **The inhibitory effect of gossypol on human sperm**
 204 **motility: relationship with time, temperature and concentration.** *Hum Exp*
 205 *Toxicol* 1989, **8:49–51.**
- 206 14. Randel RD, Chase CC, Wyse SJ: **Effects of gossypol and cottonseed products**
 207 **on reproduction of mammals.** *J Anim Sci* 1992, **70:1628–38.**
- 208 15. Fornes MW, Barbieri AM, Burgos MH: **Sperm motility loss induced by**
 209 **gossypol: relation with OH. scavengers, motile stimulators and malondialdehyde**
 210 **production.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **195:1289–1293.**
- 211 16. Chenoweth PJ, Risco CA, Larsen RE, Velez J, Tran T, Jr. CCC: **Effects of**
 212 **dietary gossypol on aspects of semen quality, sperm morphology and sperm**
 213 **production in young Brahman bulls.** *Theriogenology* 1994, **42:1–13.**
- 214 17. Brocas C, Rivera RM, Paula-Lopes FF, McDowell LR, Calhoun MC, Staples CR,
 215 Wilkinson NS, Boning AJ, Chenoweth PJ, Hansen PJ: **Deleterious actions of**
 216 **gossypol on bovine spermatozoa, oocytes, and embryos.** *Biol Reprod* 1997,
 217 **57:901–907.**
- 218 18. Chenoweth PJ, Chase CC, Risco CA, Larsen RE: **Characterization of gossypol-**
 219 **induced sperm abnormalities in bulls.** *Theriogenology* 2000, **53:1193–1203.**
- 220 19. Yuan YY, Shi QX: **Inhibition of hamster sperm acrosomal enzyme by**
 221 **gossypol is closely associated with the decrease in fertilization capacity.**
 222 *Contraception* 2000, **62:203–209.**
- 223 20. El-Sharaky AS, Newairy AA, Elguindy NM, Elwafa AA: **Spermatotoxicity,**
 224 **biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular**
 225 **and hepatic tissues of male rats.** *Food Chem Toxicol* 2010, **48:3354–3361.**
- 226 21. Hassan ME, Smith GW, Ott RS, Faulkner DB, Firkins LD, Ehrhart EJ, Schaeffer
 227 DJ: **Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls.**
 228 *Theriogenology* 2004, **61:1171–1179.**
- 229 22. Lin YC, Fukaya T, Rikihisa Y, Walton A: **Gossypol in female fertility control:**
 230 **ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats.** *Life Sci* 1985, **37:39–47.**
- 231 23. Adeyemo GO, Longe OG, Adejumo DO: **The reproductive performance of**
 232 **breeder cocks fed cottonseed meal cake-based diets.** *Int J Poult Sci* 2007, **6:140–4.**
- 233 24. Gadelha ICN, Rangel AH do N, Silva AR, Soto-Blanco B: **Efeitos do gossipol na**
 234 **reprodução animal.** *Acta Vet Bras* 2011, **5:129–35.**

- 235 25. Randel RD, Willard ST, Wyse SJ, French LN: **Effects of diets containing free**
 236 **gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function**
 237 **in Brangus heifers treated with bFSH.** *Theriogenology* 1996, **45**:911–22.
- 238 26. Lin YC, Rajamahendran P, Rikihisa Y: **Inhibition of rat embryo implantation**
 239 **in the gossypol-treated uterine horn.** *Theriogenology* 1991, **35**:769–777.
- 240 27. Gadelha ICN, Macedo MF de, Oloris SCS, Melo MM, Soto-Blanco B: **Gossypol**
 241 **promotes degeneration of ovarian follicles in rats.** *Sci World J* 2014, **2014**.
- 242 28. Basini G, Bussolati S, Baioni L, Grasselli F: **Gossypol, a polyphenolic aldehyde**
 243 **from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function.** *Domest Anim*
 244 *Endocrinol* 2009, **37**:30–6.
- 245 29. Gu Y, Lin YC, Rikihisa Y: **Inhibitory effect of gossypol on steroidogenic**
 246 **pathways in cultured bovine luteal cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1990,
 247 **169**:455–461.
- 248 30. Lin YC, Coskun S, Sanbuissho A: **Effects of gossypol on in vitro bovine oocyte**
 249 **maturation and steroidogenesis in bovine granulosa cells.** *Theriogenology* 1994,
 250 **41**:1601–1611.
- 251 31. Narain R, Lyman CM, Couch JR: **High levels of free gossypol in hen diets:**
 252 **effects on body weight, feed consumption, and egg production.** *Poult Sci* 1957,
 253 **36**:1351–1354.
- 254 32. Waldeoup PW, Goodner TO: **Tolerance levels of free gossypol in layer diets as**
 255 **influenced by iron: gossypol ratios.** *Poult Sci* 1973, **52**:20–28.
- 256 33. Reid BL, Galaviz-Moreno S, Maiorino PM: **Evaluation of isopropanol-**
 257 **extracted cottonseed meal for laying hens.** *Poult Sci* 1987, **66**:82–89.
- 258 34. Fitzsimmons RC, Newcombe M, Moul IE: **The long-term effects of feeding**
 259 **ground and whole cottonseed to laying hens.** *Can J Anim Sci* 1989, **69**:425–431.
- 260 35. Panigrahi S, Plumb VE, Machin DH: **Effects of dietary cottonseed meal, with**
 261 **and without iron treatment, on laying hens.** *Br Poult Sci* 1989, **30**:641–651.
- 262 36. Reid BL, Galaviz-Moreno S, Maiorino PM: **A comparison of glandless and**
 263 **regular cottonseed meals for laying hens.** *Poult Sci* 1984, **63**:1803–1809.
- 264 37. Panigrahi S, Hammonds TW: **Egg discolouration effects of including screw**
 265 **press cottonseed meal in laying hen diets and their prevention.** *Br Poult Sci* 1990,
 266 **31**:107–120.
- 267 38. Panigrahi S: **Effects of treating cottonseed meal with a solution of ferrous**
 268 **sulphate on laying hen performance and discolourations in eggs.** *Anim Feed Sci*
 269 *Technol* 1992, **38**:89–103.

- 270 39. Panigrahi S, Plumb VE: **Effects on dietary phosphorus of treating cottonseed**
271 **meal with crystalline ferrous sulphate for the prevention of brown yolk**
272 **discolouration.** *Br Poult Sci* 1996, **37**:403–411.
- 273 40. Lordelo MM, Calhoun MC, Dale NM, Dowd MK, Davis AJ: **Relative toxicity of**
274 **gossypol enantiomers in laying and broiler breeder hens.** *Poult Sci* 2007, **86**:582–
275 590.
- 276 41. R Development Core Team: **R: A language and environment for statistical**
277 **computing.** 2008.
- 278 42. Atmaca H, Gorumlu G, Karaca B, Degirmenci M, Tunali D, Cirak Y, Purcu DU,
279 Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R: **Combined gossypol and zoledronic**
280 **acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates**
281 **angiogenic molecules in ovarian cancer cells.** *Eur Cytokine Netw* 2009, **20**:121–30.
- 282 43. Wang J, Jin L, Li X, Deng H, Chen Y, Lian Q, Ge R, Deng H: **Gossypol induces**
283 **apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress.** *Mol Biosyst* 2013,
284 **9**:1489–97.
- 285 44. Hirshfield AN: **Overview of ovarian follicular development: considerations**
286 **for the toxicologist.** *Environ Mol Mutagen* 1997, **29**:10–15.
- 287
- 288

Table 1. Ovarian follicle populations (in %) of chicken ovaries that were cultivated for 0, 24 and 168 hours.

Follicles	Hours of cultivation			<i>P</i> ^a
	0	24	168	
Primordial				
normal	66.7 (60/90)	71.4 (40/56)	65.4 (51/78)	n.s.
atretic	33.3 (30/90)	28.6 (16/56)	34.6 (27/78)	
Transitional				
normal	69.6 (16/23)	53.3 (8/15)	51.9 (14/27)	n.s.
atretic	30.4 (7/23)	46.7 (7/15)	48.1 (13/27)	
Primary				
normal	83.3 (10/12)	70.0 (7/10)	56.3 (9/16)	n.s.
atretic	16.7 (2/12)	30.0 (3/10)	43.8 (7/16)	
Secondary				
normal	68.2 (15/22)	42.9 (3/7)	57.1 (8/14)	n.s.
atretic	31.8 (7/22)	57.1 (4/7)	42.9 (6/14)	
Antral				
normal	69.2 (9/13)	78.1 (57/73)	84.6 (22/26)	n.s.
atretic	30.8 (4/13)	21.9 (16/73)	15.4 (4/26)	
Total				
normal	68.8 (110/160)	71.4 (115/161)	64.6 (104/161)	n.s.
atretic	31.3 (50/160)	28.6 (46/161)	35.4 (57/161)	

^a Fisher's exact test; n.s.: non-significant ($P > 0.05$)

Table 2. Ovarian follicle populations (in %) of chicken ovaries that were cultivated with gossypol at different concentrations (0, 5, 10 or 20 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours.

Follicles		Gossypol (µg/ml)				P ^a
		0	5	10	20	
Primordial						
normal	71.4 (40/56)	52.7 (29/55)	48.7 (37/76)	37.0 (34/54)	0.0032	
atretic	28.6 (16/56)	47.3 (26/55)	51.3 (39/76)	63.0 (34/54)		
Transitional						
normal	53.3 (8/15)	36.7 (11/30)	21.1 (8/38)	5.1 (2/39)	0.0003	
atretic	46.7 (7/15)	63.3 (19/30)	78.9 (30/38)	94.9 (37/39)		
Primary						
normal	70.0 (7/10)	26.3 (5/19)	27.3 (6/22)	0	0.0460	
atretic	30.0 (3/10)	73.7 (14/19)	72.7 (16/22)	100 (4/4)		
Secondary						
normal	42.9 (3/7)	34.8 (8/23)	9.1 (1/11)	30.0 (6/20)	n.s.	
atretic	57.1 (4/7)	65.2 (15/23)	90.9 (10/11)	70.0 (14/20)		
Antral						
normal	78.1 (57/73)	48.5 (16/33)	40.0 (8/20)	40.4 (23/57)	<0.0001	
atretic	21.9 (16/73)	51.5 (17/33)	60.0 (12/20)	59.6 (34/57)		
Total						
normal	71.4	43.1 (69/160)	35.9 (60/167)	29.3 (51/174)	<0.0001	
atretic	(115/161)	56.9 (91/160)	64.1	70.7		
	28.6 (46/161)		(107/167)	(123/174)		

^a Fisher's exact test; n.s.: non-significant ($P>0.05$)

Table 3. Ovarian follicle populations (in %) of chicken ovaries that were cultivated with gossypol at different concentrations (0, 5, 10 or 20 µg/ml) for seven days.

Follicles		Gossypol (µg/ml)				<i>P</i> ^a
		0	5	10	20	
Primordial						
normal	65.4 (51/78)	44.6 (33/74)	33.3 (27/81)	29.8 (25/84)	<0.0001	
atretic	34.6 (27/78)	55.4 (41/74)	66.7 (54/81)	70.2 (59/84)		
Transitional						
normal	51.9 (14/27)	30.0 (6/20)	20.6 (7/34)	10.0 (2/20)	0.0106	
atretic	48.1 (13/27)	70.0 (14/20)	79.4 (27/34)	90.0 (18/20)		
Primary						
normal	56.3 (9/16)	23.1 (3/13)	31.3 (5/16)	0	0.0335	
atretic	43.8 (7/16)	76.9 (10/13)	68.8 (11/16)	100 (8/8)		
Secondary						
normal	57.1 (8/14)	10.5 (2/19)	0	7.4 (2/27)	0.0006	
atretic	42.9 (6/14)	89.5 (17/19)	100 (9/9)	92.6 (25/27)		
Antral						
normal	84.6 (22/26)	0	24.1 (7/29)	0	<0.0001	
atretic	15.4 (4/26)	100 (38/38)	75.9 (22/29)	100 (36/36)		
Total						
normal	64.6	26.8 (44/164)	27.2 (46/169)	16.6 (29/175)	<0.0001	
atretic	(104/161)	73.2	72.8	83.4		
	35.4 (57/161)	(120/164)	(123/169)	(146/175)		

^a Fisher's exact test; n.s.: non-significant ($P > 0.05$)