

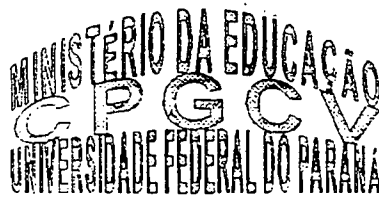
MARCELO ALVES DA SILVA

**GOSSIPOL EM RATAS GESTANTES:
TOXICIDADE MATERNA E AVALIAÇÃO
TESTICULAR DOS FILHOTES**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

CURITIBA
2000



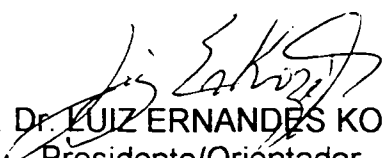
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **MARCELO ALVES DA SILVA** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“EFEITOS DO GOSSIPOL NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS NASCIDOS DE RATAS TRATADAS DURANTE A GESTAÇÃO”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito “ A ” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

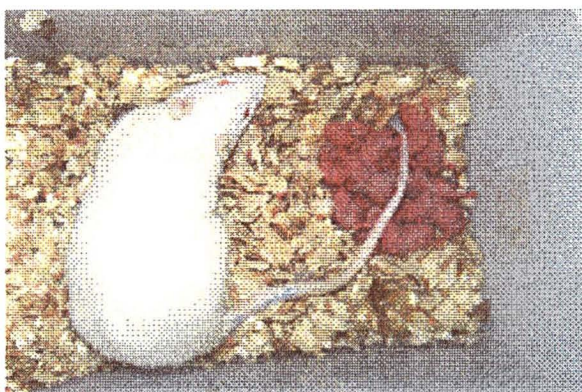
Curitiba, 28 de novembro de 2000.


Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Presidente/Orientador


Prof. Dr. PAULO ROBERTO DALSENTER
Membro


Prof. Dr. RUDIGER DANIEL OLLHOFF
Membro

DEDICATÓRIA



Dedico este trabalho a todos os animais que, com suas vidas, possibilitam ao homem fazer Ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se não fosse por Ele, nada seria possível;

Aos meus pais e meu irmão, que possibilitaram que eu continuasse a estudar, investindo cada vez mais em mim, e principalmente, pelo incessante apoio nas horas difíceis;

À Universidade Federal do Paraná, que me recebeu como um jovem em busca de futuro, e que hoje, deve orgulhar-se de ter formado um homem capaz de construir este futuro;

Ao CNPq, que através da concessão de bolsa, possibilitou que este trabalho fosse realizado;

Ao Laboratório Hebron, através do Dr. Luiz Pianovisk, pela colaboração na execução deste trabalho;

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Paraná, na pessoa de seus funcionários, diretores e alunos, pela capacitação profissional adquirida;

Ao Biotério Central e ao Departamento de Farmacologia da UFPR, na pessoa de seus funcionários e professores, pela ajuda na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki, que além de orientador e amigo, sempre foi um estimulador para a carreira do magistério;

Ao prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter, que além da amizade adquirida, é responsável pela execução deste trabalho;

Ao Laboratório de Patologia Veterinária, em especial Prof. Renato e Olair, pela ajuda na realização do trabalho;

À prof^a Lygia Maria de Almeida, pela grande colaboração na realização do trabalho;

Ao prof. Elsimar Coutinho, que desde o início do trabalho, sempre esteve presente e à disposição de ajudar;

À Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa do professor Dr. Antônio Carlos Santana Castro, que além da grande ajuda para a conclusão deste trabalho, mostrou-se uma pessoa sempre à disposição de ensinar;

Ao prof. Henrique Koehler pela ajuda nos cálculos estatísticos;

A prof^a. Dr^a. Clotilde de Lourdes Branco Germiniani, e ao prof. Dr. Metri Bacila, pela amizade e ajuda durante todo o mestrado;

A todos os professores e alunos do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, que sempre estiveram presentes na realização deste trabalho;

A todos os moradores da República "Os maridões da Platina", que durante 7 anos compartilharam comigo as alegrias da vida acadêmica;

À dona Diva, Luciana e Diego, pelo companheirismo e amizade durante a realização deste trabalho;

À minha namorada, Selma, que sempre esteve presente nas horas de desânimo, sendo uma fonte incansável de estímulo, e principalmente, uma companheira nas horas de alegria;

A todos cantores de música Country e Sertaneja, pela companhia durante as longas horas, em frente ao computador.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E METABOLISMO DO GOSSIPOL	3
2.2 EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO	4
2.2.1 EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO FEMININA	4
2.2.2 EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO MASCULINA	8
2.3 TOXICIDADE	10
2.4 ENDOCRINOLOGIA E FISILOGIA REPRODUTIVA DA RATA	13
2.5 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL ..	15
2.6 ENDOCRINOLOGIA E FISILOGIA REPRODUTIVA DO MACHO.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS	20
3.2 PLANO EXPERIMENTAL	20
3.2.1 ACOMPANHAMENTO DO CICLO ESTRAL, COBERTURA E GESTAÇÃO	20
3.2.2 PREPARO DA DROGA	23
3.2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS	24
3.3 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS	25
3.3.1 GESTAÇÃO	25
3.3.2 PARTO E LACTAÇÃO	25
3.4 AVALIAÇÃO DOS FILHOTES MACHOS	26
3.5 PREPARO DO MATERIAL PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	26
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS.....	27
3.6.1 PORCENTAGEM DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS LUMIDADOS	27
3.6.2 DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	27
3.6.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 GANHO DE PESO E TOXICIDADE NA GESTAÇÃO.....	30
4.2 PERÍODO DE GESTAÇÃO.....	33
4.3 FILHOTES NASCIDOS	33

4.4 LACTAÇÃO.....	34
4.5 AVALIAÇÃO TESTICULAR DOS FILHOTES.....	37
4.5.1 ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO.....	37
4.5.2 PORCENTAGEM DE TÚBULOS SEMINÍFEROS COM LÚMEN.....	38
4.5.3 DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	40
4.5.4 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS CELULARES.....	42
5 DISCUSSÃO.....	44
5.1 GANHO DE PESO E TOXICIDADE NA GESTAÇÃO.....	44
5.2 PERÍODO DE GESTAÇÃO.....	46
5.3 FILHOTES NASCIDOS.....	48
5.4 LACTAÇÃO.....	49
5.5 AVALIAÇÃO TESTICULAR DOS FILHOTES.....	51
6 CONCLUSÃO.....	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

Com o objetivo de estudar os efeitos do gossipol ($C_{30}H_{30}O_8$) na gestação de ratas (*Rattus norvegicus*) e os conseqüentes efeitos nos parâmetros morfométricos testiculares de seus filhotes, 40 ratas com idade média de 120 dias e peso variando entre 200 e 250 gramas, oriundas do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, foram utilizadas neste estudo. Os animais foram acompanhados diariamente até a confirmação da cobertura através de esfregaço de lavado vaginal (esfregaço positivo - presença de espermatozóides) e separados em quatro grupos contendo dez animais em cada (G I - controle, G II - gossipol 20 mg.kg⁻¹, G III - gossipol 40 mg.kg⁻¹, G IV - gossipol 80 mg.kg⁻¹) respectivamente de acordo com a concentração de gossipol presente na suspensão utilizada (somente o veículo, gossipol 20 mg.mL⁻¹, gossipol 40 mg.mL⁻¹ e gossipol 80 mg.mL⁻¹). O gossipol ácido acético (GAA 97,8 % de pureza) diluído em óleo vegetal de canola (veículo) foi administrado oralmente para todos os animais no volume de 1 mL de suspensão para cada quilo de peso vivo. A administração da droga iniciou-se no 5º dia de gestação e estendeu-se até o 20º. O peso das ratas foi aferido diariamente do dia da cobertura até o dia do parto a fim de se observar possíveis efeitos tóxicos durante a gestação. No desmame (21º dia pós-parto) todas as fêmeas foram sacrificadas para a observação dos pontos de implantação uterinos, comparando-se o número de fetos nascidos com o número de fetos gestados. Nos filhotes machos avaliou-se o peso individual no dia do desmame, índice gonadossomático e histologia testicular (porcentagem de túbulos luminados, diâmetro e proporção volumétrica dos túbulos seminíferos). Durante o experimento sete ratas do grupo G IV e uma do G III morreram, além de abortos e sinais de canibalismo na parturição. As proporções volumétricas tubulares não apresentaram diferença estatística entre os grupos (G I 90,38 % ± 0,81; G II 90,24 % ± 1,39; G III 90,70 % ± 1,46). Os demais resultados obtidos estão expostos na tabela abaixo.

Grupo	Peso ao Parto	Gestação (dias)	Nº de filhotes	Relação filhotes/implantes %	Índice gonadossomático %	Túbulos luminados %	Diâmetro tubular (µm)
G I	118,1 ± 5,25	22,75 ± 0,46	10,00 ± 2,51	94,00 ± 7,07	0,239 ± 0,022	84,0 ± 4,9	126,0 ± 7,8
G II	110,6 ± 3,78 ^x	22,50 ± 0,53	7,71 ± 3,15	91,29 ± 10,18	0,239 ± 0,018	69,8 ± 14,2 ^x	123,1 ± 8,3 ^{xx}
G III	97,0 ± 6,83 ^{xx}	22,43 ± 0,79	10,20 ± 4,97	91,8 ± 14,74	0,234 ± 0,021	56,7 ± 12,0 ^{xx}	112,9 ± 7,9 ^{xx}
G IV	86,0 ± 0,0 ^{xx}	22,00 ± 0,00 ²	-	-	-	-	-

¹ Porcentagem do peso materno no dia do parto em relação ao peso no dia da cobertura.

² Somente uma rata do grupo G IV conseguiu levar a gestação a termo e matou todos os filhotes no dia do parto.

^x (p ≤ 0,05)

^{xx} (p ≤ 0,01)

Em função desses resultados, observou-se que o gossipol (GAA) causou intoxicação grave nos animais que receberam maior dosagem, bem como de maneira dose-dependente interferiu no ganho de peso das ratas durante a gestação. Contudo não interferiu no processo de manutenção da gestação e no número de filhotes nascidos quando administrado entre o 5º e 20º dia de gestação.

Os filhotes machos filhos de ratas tratadas apresentaram dose-dependente, comparados aos controles, menor diâmetro tubular e menor quantidade de túbulos seminíferos com lúmen aos 21 dias de vida. Em virtude dos filhotes serem muito jovens, novos estudos deverão ser realizados para constatar se as alterações permanecem ao longo do tempo ou são reversíveis, bem como, para elucidar os mecanismos pelos quais estas alterações ocorrem.

1- INTRODUÇÃO

O gossipol é um pigmento amarelo de ocorrência natural em plantas da família *Malvaciae*, especialmente nas sementes das plantas do gênero *Gossypium*. O algodão (*G. hirsutum*) é a principal fonte de gossipol na natureza.

Na nutrição animal, a semente e a torta resultante da semente do algodão após a extração do óleo, representam a segunda fonte de proteína para a alimentação animal, ultrapassado somente pela soja. Os efeitos tóxicos do gossipol há muito tempo são conhecidos, principalmente em espécies monogástricas. Este fato limitou a utilização dos subprodutos desta lavoura na alimentação, principalmente, para aves e suínos (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

Os efeitos do gossipol sobre a reprodução passaram a ser estudados depois que LIU (1957) *apud* QIAN e WANG (1984), descreveu que num vilarejo da China, não houve nascimentos de crianças durante 10 anos, entre a década de 30 e 40. Neste período, as pessoas, que habitavam o vilarejo, passaram a utilizar óleo cru de algodão na alimentação, em substituição ao óleo de soja, por questões econômicas.

O gossipol por ser um inibidor enzimático inespecífico (HERVE *et al.*, 1996), alterando desta forma a divisão celular, passou a ser utilizado no tratamento da endometriose (ZHANG *et al.*, 1994) e no controle ao câncer, principalmente genital, apresentando bons resultados (LIANG *et al.*, 1995; HU *et al.*, 1994; BAND *et al.*, 1989).

Muitas pesquisas com o gossipol foram desenvolvidas nos últimos 20 anos, visando seus efeitos contraceptivos tanto em machos como fêmeas, bem como, os seus possíveis mecanismos de toxicidade.

Neste período o gossipol firmou-se como um potente agente antiespermático não hormonal, tornando-se droga promissora para obtenção de um anticoncepcional masculino.

Muito pouco se sabe até hoje, sobre os efeitos do gossipol na gestação, independentemente da espécie.

Desta forma esse trabalho tem como objetivo observar os efeitos do gossipol sobre a gestação de ratas (*Rattus norvegicus*) e os conseqüentes efeitos em parâmetros morfométricos testiculares de seus filhotes, visando a sua utilização como droga contraceptiva para uso animal em ambos os sexos. Os seguintes pontos foram abordados:

- avaliação da toxicidade do gossipol em ratas prenhes;
- capacidade do gossipol interferir na manutenção da gestação e no número de filhotes nascidos;
- avaliação do desenvolvimento dos filhotes durante a lactação;
- avaliação histológica dos testículos de ratos, filhos das ratas tratadas, no ato do desmame.

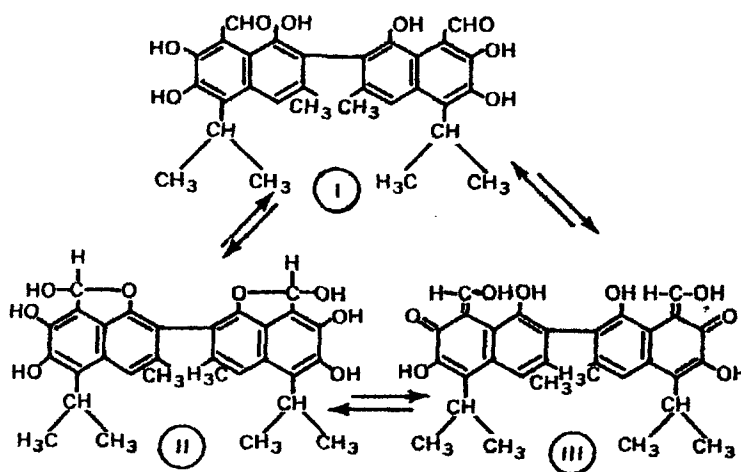
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E METABOLISMO DO GOSSIPOL

O gossipol é um composto fenólico gerado por glândulas que produzem pigmentos nas folhas, caule, raízes e sementes, sendo mais freqüente nestas duas últimas. A concentração média de gossipol na semente de algodão (*G. hirsutum*) é de 1,32% (0,59% a 2,35%). Desta forma a concentração de gossipol presente na planta não é constante, variando entre os cultivares plantados, condições climáticas (índice pluviométrico, temperatura, umidade), fertilizantes e solo (RANDEL *et al.*, 1992). Tem a função de defesa para a planta, principalmente contra o ataque de insetos (NEWSON e BRAZZEL, 1968).

O gossipol tem o peso molecular de 518,54 e a sua fórmula é $C_{30}H_{30}O_8$. Apresenta três formas tautoméricas: aldeído, cetônioide e hemiacetal, havendo dois isômeros óticos, dextrógero e levógero. Devido à presença dos grupos carbonila e fenol, o gossipol pode reagir com muitas outras moléculas (ABOU-DONIA, 1976).

FIGURA 1. FORMAS TAUTOMÉRICAS DO GOSSIPOL: I ALDEÍDO, II HEMIIACETAL e III CETONÓIDE.



Fonte: ABOU-DONIA (1976).

O gossipol, administrado por via oral ou parenteral, apresenta como principal via de excreção as fezes, pois a bile é o principal caminho de eliminação do gossipol do organismo. Em estudo realizado com gossipol radioativo, observou-se que 77% da droga era excretada pelas fezes, 12% como gás carbônico e 3% pela urina. A meia vida biológica da droga em ratos é de 48 horas, galinhas 30 e suínos 78 horas. Os tecidos que mais acumularam a droga foram: trato gastrointestinal, fígado, coração e rins. O acúmulo de gossipol nos tecidos também variou entre as espécies estudadas, sendo de 12,5% para ratos, 16,8% para galinhas e 32,9% para suínos (ABOU-DONIA, 1976).

Animais lactantes, recebendo gossipol na dieta, apresentam excreção da droga pelo leite. LIN *et al.* (1992), encontraram, 6 horas após a administração oral de gossipol para ratas lactantes, significativa quantidade de gossipol no leite coagulado nos estômagos de filhotes, bem como no sangue, fígado, pulmões, baço e outros órgãos destes filhotes. HU *et al.* (1994), observaram inibição do crescimento de células cancerígenas de mama de mulheres e células cancerígenas de esôfago de ratos, em cultura, utilizando como fonte de gossipol, o leite de vacas alimentadas com 450 ppm de gossipol na dieta.

Experimentalmente, três formas de gossipol tem sido utilizadas: o gossipol puro, o gossipol conjugado com ácido acético (GAA) e o gossipol conjugado com ácido fórmico, todas apresentando atividades biológicas muito semelhantes (QIAN e WANG, 1984).

2.2 EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO

2.2.1 Efeitos sobre a reprodução feminina

Investigações com ratas ciclando normalmente e tratadas na seqüência com GAA, apresentaram aumento de duração no ciclo estral após o tratamento, decorrente do aumento na fase de diestro (RANDEL *et al.*, 1992; LAGERLOF e TONE, 1985). BENDER *et al.* (1988b), observaram diminuição no número de ciclos estrais (sem apresentar alterações histopatológicas nos ovários, útero e vagina) em

ratas tratadas com 60 mg.kg^{-1} de GAA, bem como, ratas hemiovariectomizadas tratadas com GAA, não apresentaram aumento no peso do ovário remanescente como as ratas do grupo controle.

PAN *et al.* (1987), relataram alterações ultraestruturais em ovócitos e células da granulosa de ratas tratadas com GAA (20 mg.kg^{-1}) por 60 dias. Estas alterações incluíram aumento de lisossomos no ovócito e redução do retículo endoplasmático liso nas células da granulosa, sugerindo supressão da atividade secretora destas células.

A administração de 0,05 a 5,0 mg de gossipol intrauterinamente em ratas, antes do coito, provocou, dose-dependente, redução de espermatozóides que alcançaram a ampola e redução do número de ovócitos fecundados (MOORE *et al.*, 1988). RATSULA *et al.* (1983), conseguiram inibição total da motilidade dos espermatozóides em 11 de 15 mulheres que utilizaram um gel vaginal com gossipol após a cópula e, os quatro casos remanescentes, apresentaram baixa motilidade e não progressiva.

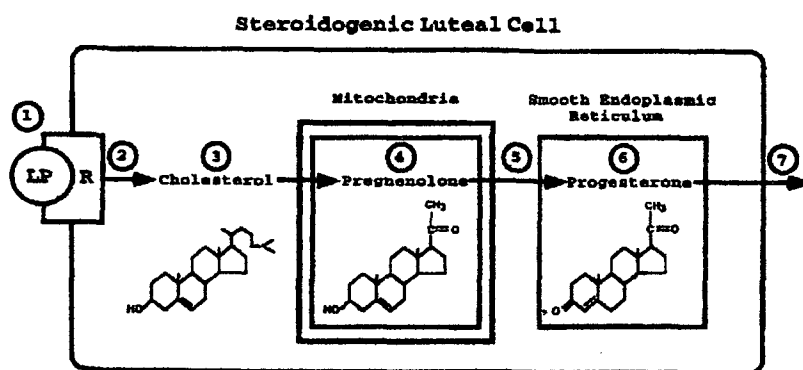
YANG e WU (1987), administrando GAA oralmente (30, 60, 90, 120 mg.kg^{-1}) para ratas do primeiro ao quinto dia de gestação e sacrificando-as no décimo, constataram que na dosagem de 60, 90 e 120 mg.kg^{-1} , respectivamente, inibiu-se a gestação em 50, 85 e 75% das ratas, e na dosagem de 30 mg.kg^{-1} não houve bloqueio da prenhez. Observaram também que as concentrações de progesterona (P_4) e 17β -estradiol no soro estavam bastante reduzidas, exceto nos animais que receberam a menor dosagem. As ratas tratadas com altas doses de gossipol e que receberam, durante a gestação, P_4 ou P_4 mais estrógeno exógeno, apresentavam maior taxa de gestação mas menor quantidade de implantes uterinos. Desta forma, esses autores concluíram que as causas de infertilidade nas fêmeas são provocadas por ação luteolítica e disfunções no desenvolvimento fetal pós-implantação.

LIN *et al.* (1985), trabalhando com doses de 12,5 e 25 mg.kg^{-1} , por via intramuscular (IM), do proestro ao oitavo dia de gestação, observaram menor média de implantes uterinos nas fêmeas tratadas com maior dosagem não levando a gestação a termo. Contudo, quando administraram GAA após a fase de implantação (a partir do 6º dia), não ocorreram abortos ou efeitos nocivos sobre os filhotes.

Comparando-se ratas tratadas com 25 mg.kg^{-1} (IM) por dia, a partir do segundo dia de gestação, com ratas controle, não se observou alterações histopatológicas no útero até ao quinto dia de prenhez, mas constatou-se, após o sexto dia de gestação, extensa hiperemia e hemorragia no estroma uterino ao redor do tecido decidual bem desenvolvido. Este fato revela que a degeneração autolítica do epitélio uterino, que normalmente ocorre no 6º dia de gestação, não ocorreu nesse dia, nos animais tratados, e isto pode ser decorrente dos efeitos luteolíticos do gossipol (RIKIHISA *et al.*, 1985).

Os mecanismos pelos quais o gossipol inibe a síntese e secreção de P_4 , tem sido estudado através de culturas de células foliculares e de corpo lúteo de diferentes espécies. VRANOVA *et al.* (1999), estudando células da granulosa de suínos cultivadas com gossipol (concentração 10^{-4} M), observaram inibição da conversão de pregnenolona em P_4 . GU *et al.* (1990b), constataram significativa inibição do gossipol sobre as enzimas envolvidas na esteroidogênese em cultura de células luteínicas de bovinos. ZHENG *et al.* (1991), trabalhando com células luteínicas de ratas, encontraram resultados similares aos dos autores acima mencionados. LIN *et al.* (1992), trabalhando com gossipol radioativo em cultura de células luteínicas de bovinos, demonstraram que a membrana plasmática apresenta maior capacidade de ligação para o gossipol que o citoplasma, sugerindo que a inibição da síntese de progesterona ocorre principalmente, por ação em enzimas localizadas na membrana celular.

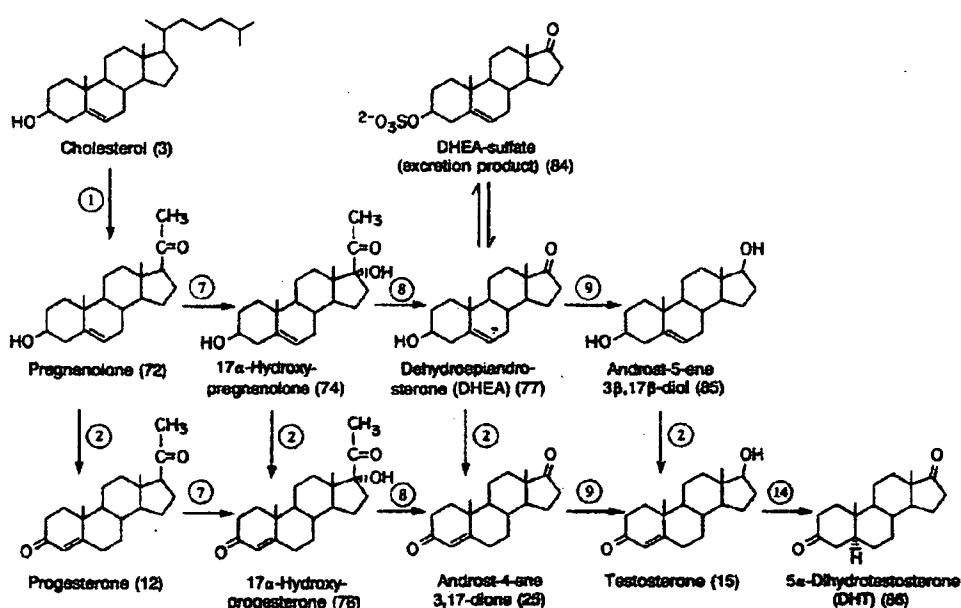
FIGURA 2. SÍNTESE DE PROGESTERONA NAS CÉLULAS LUTEÍNICAS.



Fonte: JUENGEL *et al.* (1999)

GU *et al.* (1990a), descreveram como mecanismo antiesteroidogênico do gossipol o efeito inibitório sobre a enzima adenilato ciclase reduzindo a formação de AMP-c intracelular. Em outro trabalho no mesmo ano, esses autores relataram a inibição pelo gossipol, do colesterol *side chain cleavage enzyme*, responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona, bem como a inibição do complexo 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase-isomerase (3 β HSD) responsável pela conversão da pregnenolona em progesterona (GU *et al.*, 1990b).

FIGURA 3. ROTA METABÓLICA DA SÍNTESE DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES.



Fonte: NORMAN e LITWACK (1997)

LEI e XU (1990), sugeriram, como mecanismo de ação para os efeitos de anti-implantação do gossipol, alterações no transporte e desenvolvimento inicial dos embriões nos ovidutos de ratas tratadas. Em outro trabalho, eles constataram aumento da contratilidade da musculatura lisa dos ovidutos de ratas tratadas com GAA. Segundo os autores, esses efeitos não eram decorrentes de estimulação de receptores α -adrenérgicos mas sim, da entrada de ions Ca^{++} no tecido muscular, devido ao aumento dos níveis de prostaglandinas (PGs), principalmente da PGE1 e

PGE2, apresentando a PGE1 maior potencial de contração (LEI e XU, 1993). Contudo, MEDEIROS *et al.* (1989) observaram que o gossipol inibe de forma direta e irreversível a contratilidade dos órgãos reprodutores em machos e fêmeas.

BENDER *et al.* (1988a), relataram junções intercelulares (desmosomos) irregulares e alterações no citoplasma de células endometriais em ratas tratadas com 60 mg.kg⁻¹, e que essas alterações poderiam levar a um ambiente uterino desfavorável para o desenvolvimento embrionário e fetal.

Trabalhos desenvolvidos com fertilização *in vitro* (FIV) e culturas de embriões têm demonstrado efeitos deletérios dose-dependente do gossipol diretamente sobre ovócitos (LIN *et al.*, 1994) e embriões (ZIRKLE *et al.*, 1988; BROCAS *et al.*, 1997), sendo os ovócitos mais resistentes que os embriões à ação tóxica do gossipol (ZIRKLE *et al.*, 1988).

2.2.2 Efeitos sobre a reprodução masculina

As pesquisas revelam uma pronunciada variação entre as espécies na sensibilidade ao GAA como agente anticoncepcional para machos. Entre as espécies de laboratório estudadas, o hamster aparece como o mais sensível, seguido pelo rato, macaco e cão, em ordem decrescente de sensibilidade. Os camundongos e coelhos são os que apresentam maior resistência aos efeitos antiespermáticos do GAA (QIAN e WANG, 1984).

Os resultados em ratos e hamsters indicam que a resposta anticoncepcional é dose e tempo dependente. A dose efetiva para ratos é de 10 a 30 mg.kg⁻¹ administrada por três a dez semanas e para hamsters é de 5 mg.kg⁻¹ por mais de 6 semanas. Em cães, doses tóxicas não provocaram alterações no espermograma (RANDEL *et al.*, 1992). Em ratos doses 5 a 9 vezes superior a dose efetiva não provocaram sinais de toxicidade (QIAN e WANG, 1984). Homens que tomaram 20 mg de GAA por 75 dias, seguido por doses semanais de 50 mg, tornaram-se em 99% dos casos, inférteis (DRIFE, 1987).

CHASE *et al.* (1989) observaram queda na concentração e motilidade dos espermatozóides em touros que recebiam doses diárias de 60 mg.kg⁻¹ de gossipol livre por mais de 56 dias, mas não observaram diferença na circunferência escrotal

entre os animais tratados e controle. Análises histopatológicas de testículos de touros alimentados com farelo ou caroço de algodão na ração, apresentaram aumento do lúmen dos túbulos seminíferos e queda no número de camadas de células germinativas dentro dos túbulos, mas sem alterações no diâmetro dos mesmos, quando comparados a testículos de touros controle (ARSHAMI e RUTTLE, 1988; CHASE *et al.*, 1990).

Os efeitos do gossipol nos níveis hormonais de homens, ratos, hamsters, coelhos e macacos, foram revisados, mas os resultados encontrados sobre as concentrações de FSH (Hormônio Folículo Estimulante), LH (Hormônio Luteinizante) e testosterona são inconsistentes (RANDEL *et al.*, 1992). QIAN e WANG (1984), relataram alterações celulares no hipotálamo e hipófise de ratos tratados com gossipol. Descreveram também queda na produção de testosterona *in vitro* em culturas de células de Leydig na presença de gossipol. Touros Brahman alimentados com dietas ricas em gossipol não apresentaram queda na produção endógena de testosterona (CHASE *et al.*, 1990).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais o gossipol desempenha sua função antiespermatogênica. O primeiro mecanismo de ação do gossipol descrito foi a sua ação inibidora sobre a enzima Lactato-desidrogenase-X nos espermátócitos e espermátides (LEE e HEINRICH, 1981).

A queda da motilidade nos espermatozóides de hamsters foi causada por alterações na membrana mitocondrial na cauda dos espermatozóides (HOFFER *et al.*, 1987). Alterações na cauda (peça intermediária) dos espermatozóides em touros foram descritas por CHENOWETH *et al.* (1994).

TENG (1997), constatou alterações na cauda e cabeça do espermatozóide. Alterações na cauda foram causadas por redução na quantidade de microtubulinas nas células espermatogênicas, devido à inibição enzimática do gossipol na transcrição e síntese das proteínas. Em outro trabalho, o autor descreveu deformidades na cauda do espermatozóide decorrente da queda dos teores de dineína e tubulina no flagelo, bem como alterações na conversão de espermátide arredondada para alongada (TENG, 1995). KENNEDY *et al.* (1983),

descreveram a inibição pelo gossipol, da conversão da proacrosina em acrosina no acrossomo de espermatozóides humanos.

CERELLI e JOHNSON (1999), descreveram significativa degeneração das células germinativas entre espermatogônias B e espermatócito primário em paquíteno nos testículos de touros que recebiam gossipol na dieta. MONSEES *et al.* (1998), trabalhando com cultura de células de Sertoli, observaram degeneração e morte deste tipo celular por alterações no metabolismo mitocondrial. Células de Sertoli cultivadas em meio contendo 5 μM de gossipol, após 10 minutos de cultura, apresentavam interrupção das comunicações intercelulares do tipo *tight* (HERVE *et al.*, 1996).

SWAN *et al.* (1990), administrando 20 mg.kg^{-1} de gossipol diariamente para ratos, observaram hipertrofia do epitélio da cauda do epidídimo, com aumento de quatro vezes no comprimento das células. Espermatozóides retirados desta região apresentavam anormalidades ou ausência de mitocôndrias, bem como ausência de membrana plasmática e componentes do axonema. Alterações nas enzimas responsáveis pela maturação final do espermatozóide no epidídimo foram descritas por KALLA *et al.* (1997).

2.3 TOXICIDADE

O caroço e o farelo de algodão representam importantes fontes de proteínas e energia para nutrição animal. Apesar dos subprodutos do algodão possuírem uma proteína de alta qualidade, esses apresentam o gossipol como princípio tóxico (ANDRIGETTO *et al.*, 1982; MORGAN *et al.*, 1988).

O gossipol é encontrado sob duas formas: livre e ligada. A forma livre é a que apresenta funções biológicas. A quantidade de gossipol livre presente no alimento é influenciada pelo processamento do caroço durante a obtenção do óleo. Comercialmente o óleo é extraído por três diferentes processos: extração direta por solventes, pressão seguida por extração com solvente e simples pressão. Esses três métodos utilizam diferentes temperaturas, pressões e tempo de cozimento. Altas temperaturas e pressão favorecem a formação de ligações estáveis entre o gossipol e outras moléculas, tornando o gossipol biologicamente inativo. Assim o método por

extração direta com solventes é o que apresenta maior quantidade de gossipol livre (RANDEL *et al.*, 1992 e GOETSCH e OWENS, 1985).

A intoxicação pelo gossipol é mais grave em espécies monogástricas e em animais pré-ruminantes, uma vez que, nos ruminantes, o gossipol livre liga-se rapidamente às proteínas solúveis do rúmen. Depois de ligado a estas proteínas, o gossipol não é liberado por enzimas proteolíticas e a microbiota ruminal, não participa diretamente neste processo de detoxificação (ALLISON, 1978). Doses diárias de gossipol livre acima de 24 gramas podem exceder a capacidade de detoxificação do rúmen e o fornecimento de farinha de algodão na forma peletizada diminui a toxicidade do gossipol (BARRAZA *et al.*, 1991).

A toxicidade do gossipol varia muito entre as espécies animais. ABOUDONIA (1976) relatou diferentes doses de DL_{50} (mg.kg^{-1}) entre as espécies por ele estudadas: de 2.400 a 3340 para ratos, 500 a 950 para camundongos, 350 a 600 para coelhos, 280 a 300 para cobaias e 550 para suínos.

QIAN e WANG (1984), comparando a tolerância para repetidas doses de gossipol, concluíram que entre camundongos, coelhos, cobaias, cães, suínos, ratos e macacos, os dois últimos são os mais tolerantes, e os cães e coelhos os mais sensíveis. Eles concluíram também que as fêmeas são mais sensíveis que os machos.

MORGAN *et al.* (1988), observaram que cordeiros, com oito semanas e peso médio de 16 kg, que receberam durante 30 dias doses totais diárias de gossipol (gossipol ácido acético) variando de 0, 45, 136 ou 409 mg, apresentaram graus diferentes de intoxicação. Os cordeiros que receberam a maior dose, morreram antes do término do experimento. Os sinais clínicos observados foram morte súbita, perda de peso, secreção nasal, apatia, anorexia, dispnéia e alterações no eletrocardiograma. À necrópsia observou-se cardiomegalia, congestão pulmonar e hepática e acúmulo de líquido nas cavidades corporais. Microscopicamente constatou-se necrose focal do miocárdio e degeneração das fibras cardíacas, edema e congestão pulmonar, necrose da região centrolobular hepática, retenção de bile e degeneração gordurosa. A severidade dos sinais observados foi dose dependente.

Em 1974, o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, estabeleceu 450 ppm como nível máximo de gossipol livre em produtos para

consumo humano (MOH *et al.*, 1992). Rações para cordeiros jovens com níveis inferiores a 450 ppm de gossipol livre podem causar intoxicação (MORGAN *et al.*, 1988).

Os sinais de intoxicação aguda em cães (PATTON *et al.*, 1985), suínos (HASCHEK *et al.*, 1989), cabras (EAST *et al.*, 1994), coelhos (SAKESENA *et al.*, 1981) e bezerras (HUDSON *et al.*, 1988) são similares, destacando-se a morte súbita, dificuldade respiratória, anorexia, insuficiência cardíaca, congestão e edema pulmonar e congestão hepática.

Em função da utilização freqüente do caroço de algodão na alimentação de ruminantes, principalmente bovinos em produção, muitos trabalhos foram feitos para avaliar os seus possíveis efeitos tóxicos.

COLIN-NEGRETE *et al.* (1996), relataram que dietas com 30 % de caroço de algodão (0,2 % de gossipol total na dieta) por 430 dias, podem causar morte de novilhas holandesas, e a medida que se aumentava a quantidade de caroço de algodão na dieta (0, 15 ou 30 %), essas novilhas apresentavam maior fragilidade eritrocitária, maior concentração sérica de colesterol, triglicerídeos e bilirrubina. GRAY *et al.* (1993) trabalhando com novilhas e vacas de corte recebendo 10 e 20 mg.kg⁻¹ de peso vivo por dia de gossipol livre, obtiveram resultados similares relativamente à fragilidade eritrocitária. WILLARD *et al.* (1995) observaram que vacas da raça Brahman alimentadas com 4 gramas de gossipol livre por dia, nos últimos três meses de gestação, após 84 dias de tratamento, apresentavam menores níveis séricos de α -tocoferol e β -caroteno que as vacas do grupo controle.

Os chineses possuem anticoncepcional masculino com alta eficácia a base de gossipol, mas o uso clínico é limitado em função dos efeitos colaterais, como fadiga, hipocalcemia e alterações gastrointestinais (DRIFE, 1987).

2.4 ENDOCRINOLOGIA E FISILOGIA REPRODUTIVA DA RATA

Em ambos os sexos a puberdade de ratos ocorre entre os 50 e 60 dias de vida, e a idade em que os animais são colocados em reprodução varia de 90 a 120 dias. Nesta fase o peso dos machos está ao redor de 300 g e das fêmeas ao redor de 200 g (PEPLOW *et al.*, 1977).

O ciclo estral das ratas apresenta de 4 a 5 dias de duração, com o período de estro de 12 horas, aproximadamente. O comportamento de cio das fêmeas inclui tremores de orelha quando a cabeça e as costas são acariciadas, lordose e agitação (BIVIN, 1986).

Segundo CHAHOUD e KWASIGROCH (1977), o ciclo estral das ratas está dividido em quatro fases:

- 1) Proestro (estágio I) – Fase de preparação para o coito, caracterizada pela proliferação do epitélio vaginal. No esfregaço vaginal estão presentes células epiteliais ovais, com núcleo grande e central. Os leucócitos aparecem raramente. Tem a duração de 12 horas;
- 2) Estro (estágio II) - Fase de aceitação ao macho, caracterizada pela presença de células epiteliais queratinizadas e sem núcleo, que quando descamadas formam agregados celulares. Os leucócitos e muco estão ausentes. A duração é de 14 horas;
- 3) Metaestro (estágio III) – Fase que ocorre após as ovulações. Depois de passada a fase de aceitação ao macho, poucas células queratinizadas estão presentes e os leucócitos e muco aparecem no esfregaço. No início da fase células anucleadas estão presentes, ao passo que mais para o final desta fase aparecem células nucleadas e poligonais. A duração é de 21 horas.
- 4) Diestro (estágio IV) – A mucosa vaginal está delgada e no esfregaço vaginal é abundante os tipos de células epiteliais, muco e leucócitos. A duração é de 57 horas.

O período da gestação da rata é de 20 a 23 dias e a exata duração depende da raça dos animais utilizados, saúde e idade das mães e o tamanho da ninhada. As ninhadas possuem em média entre 9 e 10 filhotes (CHAHOUD e

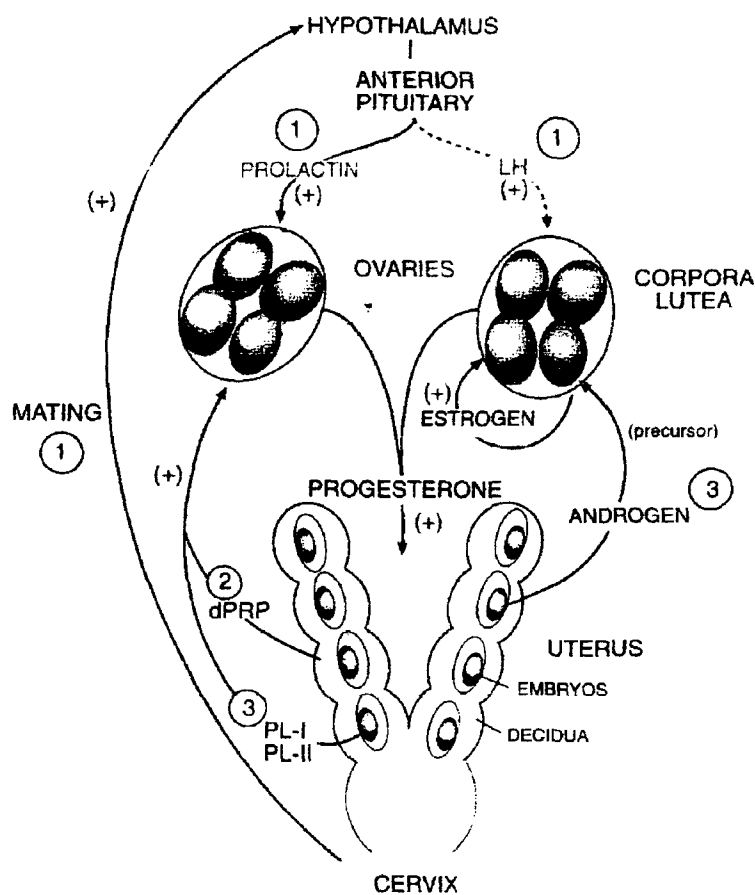
KWASIGROCH, 1977). O tipo placentário da rata é o hemocorial. Neste tipo placentário, as células do trofoblasto entram em contato direto com o sangue materno, tendo acesso direto aos nutrientes e gases, provocando invasão endometrial intensa (BUDAK e STRAUSS, 1999).

Os roedores apresentam ovulações espontâneas, e os corpos lúteos (CL) formados a partir destas ovulações, secretam progesterona por dois dias, e não se tornam CL completamente funcionais durante o ciclo. A vida dos CL dos roedores é propositalmente limitada para produzir curtos e repetitivos ciclos estrais, que proporcionam numerosas oportunidades para fêmeas tornarem-se prenhes. Os corpos lúteos das fêmeas não cobertas são denominados “não funcionais”, porque eles não secretam quantidades suficientes de progesterona (P_4) para permitir uma reação decidual uterina. Outra causa da luteólise é a conversão da P_4 pela 20α -hidroxisteroidesidrogenase no CL em 20α -hidroxiprogesterona, que é um metabólito inativo, sendo incapaz de manter a gestação (SPENCER, 1999).

A cobertura das ratas durante o cio resulta em gestação ou pseudogestação, com os CL secretando progesterona por 12-14 dias. A extensão do CL por mais de 12 dias depende da presença de conceptos viáveis no útero. O sucesso da gestação depende da secreção de progesterona pelo CL até o 17º ou 18º dia de prenhez. Desta forma, a gestação dos roedores está dividida em duas fases, separadas por eventos endócrinos distintos. O primeiro evento é a cobertura, que por arco reflexo neural, induz a ondas diurnas e noturnas de prolactina, que duram até o dia 12 da gestação ou pseudogestação. O aumento da prolactina é necessário para a conversão do CL não funcional do ciclo estral em CL funcional da gestação. O segundo evento é dependente da implantação, que acontece até o quinto dia pós-fecundação, e do desenvolvimento de conceptos normais. Na gestação, a placenta e a decídua produzem sete tipos de *Prolactin-like (PRL-like)* hormônios ou Lactogênios Placentários (PL) que exercem efeitos luteotróficos e induzem à produção de progesterona no meio e final da gestação. A partir do sexto dia da gestação, a prolactina hipofisária deixa de ser estritamente necessária, ficando a manutenção da gestação, também a cargo dos *PRL-like* hormônios. A prolactina e os lactogênios placentários parecem elevar o número de receptores

para LH e estrógeno, bem como suprimem a conversão de progesterona em 20α -hidroxiprogesterona no CL (BAZER, 1999).

FIGURA 4. MECANISMOS ENDÓCRINOS E NEUROENDÓCRINOS DA GESTAÇÃO DE RATAS.



Fonte: STOUFFER (1999)

2.5 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

A fecundação impõe ao embrião o sexo genético. Caso o genótipo seja masculino (XY), uma região de cromossomo Y (região da determinação do sexo) acarreta, na sexta semana na espécie humana, o início da secreção de um fator determinante de testículo, que tem função testículo organizadora, isto é, transformar

os cordões gonadais primários em túbulos seminíferos. Caso o genótipo seja feminino (XX), não haverá a secreção deste fator e ocorrerá a formação de ovário. Assim o sexo genético determina o sexo gonadal (CARLSON, 1996).

Se o sexo gonadal for o testículo, este produzirá através das células de Sertoli o hormônio antimülleriano (AMH), uma glicoproteína do grupo dos TGF- β (Fator de Crescimento Trofoplástico- β), cuja função é provocar a involução dos ductos de Müller. Enquanto isso, a ausência do tecido testicular, ou seja, na presença de ovários, os ductos paramesonéfricos diferenciam-se nas tubas uterinas, útero e vagina, enquanto os ductos de Wolff regridem, pois são dependentes da testosterona para desenvolverem-se. No início da regressão dos ductos de Müller as células de Leydig iniciam a secreção de testosterona (terceiro sinal). Este andrógeno estimula a diferenciação dos ductos de Wolff em ductos eferentes, ductos epididimários e ductos deferentes. O sexo gonadal induz ainda a produção do quarto sinal da determinação sexual, e assim a testosterona é reduzida a dihidrotestosterona que se liga a receptores específicos no seio urogenital, tubérculo e saliência genital onde estimula a diferenciação destas estruturas em próstata, uretra, pênis e escroto. (CARLSON, 1996).

2.6 ENDOCRINOLOGIA E FISILOGIA REPRODUTIVA DO MACHO

Espermatogênese é o processo biológico de gradual transformação das células germinativas em espermatozóides. Este processo envolve proliferação celular por repetitivas divisões mitóticas, duplicação do material genético, recombinação genética por *cross-over*, divisão reducional por meiose produzindo espermátides haplóides e diferenciação terminal das espermátides em espermatozóides. Desta forma a espermatogênese está dividida em três fases: proliferação, divisão reducional (meiose) e diferenciação (HESS, 1999).

Todo aspecto da fisiologia reprodutiva do macho está na dependência do controle endócrino das gonadotrofinas, LH e FSH. Após a puberdade, a secreção de LH ocorre em pulsos, com episódios irregulares de secreção a cada 2-4 horas. A ação do LH é primariamente sobre a célula de Leydig, localizada no interstício, onde

atua sobre a adenilato ciclase, promovendo a conversão do colesterol em precursores da testosterona. O pico circulatório da testosterona acontece 40 minutos após o pico de LH e o intervalo entre a queda na concentração de testosterona e um novo pico de LH é de 40-80 minutos. Dentro dos túbulos seminíferos a testosterona é convertida em 5-dihidrotestosterona, que não é capaz de sofrer aromatização e é mais potente que a testosterona. Estes andrógenos ficam na luz dos túbulos ligados a uma proteína secretada pelas células de Sertoli, a proteína ligadora de andrógeno (ABP). A função desta proteína é manter alta a concentração de andrógeno dentro da luz dos túbulos seminíferos e epidídimo. A secreção de gonadotrofinas é controlada pelos níveis circulantes de andrógenos, estrógenos e inibina (PINEDA, 1989).

O alvo do FSH é a célula de Sertoli, atuando sobre a adenilato ciclase, promovendo a síntese da ABP e aromatização da testosterona em estrógeno. O FSH também estimula a célula de Sertoli para manter o suporte da espermatogênese. A secreção de FSH é regulada pelos níveis sanguíneos de esteróides, inibina e ABP. Secretam ainda lactato e piruvato e o fluido tubular (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

As células de Sertoli são grandes, triangulares, fixas e expandem-se em direção ao lúmen do túbulo seminífero. No testículo adulto não sofrem divisão, mas são extremamente resistentes às radiações ionizantes, bem como aos diversos agentes tóxicos que exercem ação destrutiva sobre as células germinativas (PINEDA, 1989).

O testículo é dividido internamente em tecido avascularizado sendo 90 % constituído pelos túbulos seminíferos, e tecido vascularizado, onde se encontram as células de Leydig, vasos sanguíneos, linfáticos e macrófagos. Esta camada produz o líquido intersticial, que é utilizado como transportador de hormônios e nutrientes a partir dos vasos sanguíneos até ao epitélio seminífero. O controle da entrada dos nutrientes dentro do epitélio é feito pela barreira hemato-testicular. Há duas barreiras, uma camada de células mióides que circunda a lâmina basal, e as células de Sertoli. Estas células, através de suas junções *tight*, dividem o interior do epitélio seminífero em basal e adluminal, onde no basal encontram-se as espermatogônias em divisão mitótica, e no adluminal os espermatócitos em divisão meiótica e em

transformação celular. As junções *tight* restringem a passagem de muitos fatores (eletrólitos, hormônios, nutrientes, anticorpos) estabelecendo um ambiente favorável para as diferentes fases da espermatogênese. Elas proporcionam suporte mecânico, proteção e nutrição das células germinais em desenvolvimento, desempenham importante papel na liberação dos espermatozóides maduros no lúmen dos túbulos, intervêm na fagocitose de células germinais danificadas, absorvendo corpos residuais e excedentes citoplasmáticos (RUSSELL, 1999).

A multiplicação das células de Sertoli ocorre, quase que totalmente na vida intrauterina, sendo que entre a fase de diferenciação sexual e o nascimento, o número destas células aumenta em 300 ou 400 vezes nos testículos de carneiros e, após o nascimento, em 5 ou 10 vezes até a fase pós puberal. Em ratos a multiplicação das células de Sertoli permanece intensa até a pré puberdade. Nesta fase ela para e não se observa uma variação numérica com relação a idade entre estes animais (HOCHEREAU-DE REVIERS *et al.*, 1987).

No animal adulto, as espermatogônias estão divididas em tipo A, intermediárias e B. Existem várias gerações de espermatogônias A, dependendo da espécie. Estas dividem-se por mitose dando origem às espermatogônias intermediárias, que por mitose dividem-se originando as espermatogônias B. Nos ruminantes observam-se, A₀, A₁, A₂, A₃, intermediária, B₁ e B₂. Neste processo não se reduz o número de células que dão origem à divisão, conservando-se a permanência do processo. As espermatogônias B dividem-se por mitose originando os espermatócitos primários. Estes sofrem divisão meiótica (meiose-I) originando os espermatócitos secundários. Os espermatócitos secundários, pela meiose-II, dão origem às espermátides, finalizando o processo de espermatocitogênese (HESS, 1999).

Todas as espermatogônias permanecem em contato com a membrana basal, mas no final da divisão meiótica, o citoplasma das células de Sertoli começa a englobar os espermatócitos em formação, fazendo com que estes percam contato com a membrana basal. Logo após o término da meiose, as espermátides iniciam a síntese de RNA, e simultaneamente o conteúdo acrossomal é sintetizado no complexo de Golgi, com progressiva união das vesículas para a formação do próprio acrossomo. Em seguida vem a fase de síntese dos microtúbulos e formação do

flagelo. Durante este processo, excedentes de citoplasma vão sendo eliminados. Pouco após a expulsão dos corpos residuais, as cabeças dos espermatozóides liberam-se do citoplasma das células de Sertoli, permitindo a passagem dos espermatozóides para a luz dos túbulos (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

As vias pelas quais os espermatozóides passam são a rede testicular, os ductos eferentes, o epidídimo, o ducto deferente e a uretra. Sofrem mudanças físico-químicas entre a rede testicular e a cauda do epidídimo, que estão associadas com as mudanças fisiológicas das células. Estas mudanças são responsáveis pela maturação necessária para a fertilização. Ao atingir o epidídimo, o fluido que veicula os espermatozóides, até aí presente em grande quantidade, é abundantemente absorvido pelos ductos eferentes na cabeça do epidídimo, causando intensa concentração dos espermatozóides. Durante a migração através do epidídimo, os espermatozóides desenvolvem motilidade e fertilidade. Este trânsito leva de 8 a 14 dias para ocorrer (PINEDA, 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 40 ratas (*Rattus norvegicus*), com 120 dias de idade e peso variando entre 200 e 250 gramas, oriundas do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná.

Durante o experimento, os animais foram mantidos, neste biotério, em caixas apropriadas com cinco fêmeas por caixa, em regime de manejo normal, recebendo alimentação balanceada para ratos e água *ad libitum*. Todas as fêmeas estavam ciclando, conforme evidenciado pelos exames dos esfregaços vaginais.

Foram utilizados oito machos adultos para os cruzamentos.

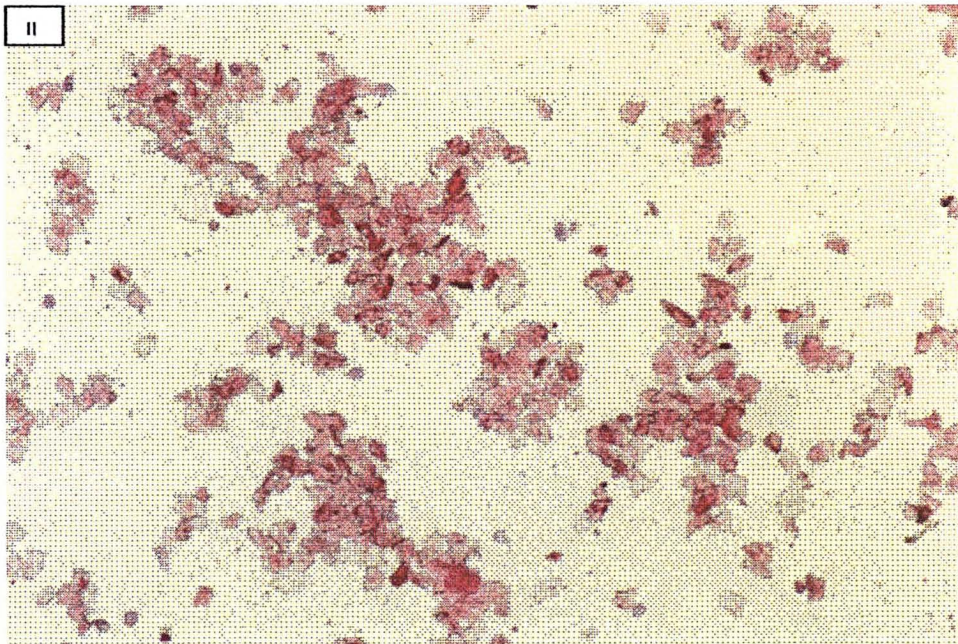
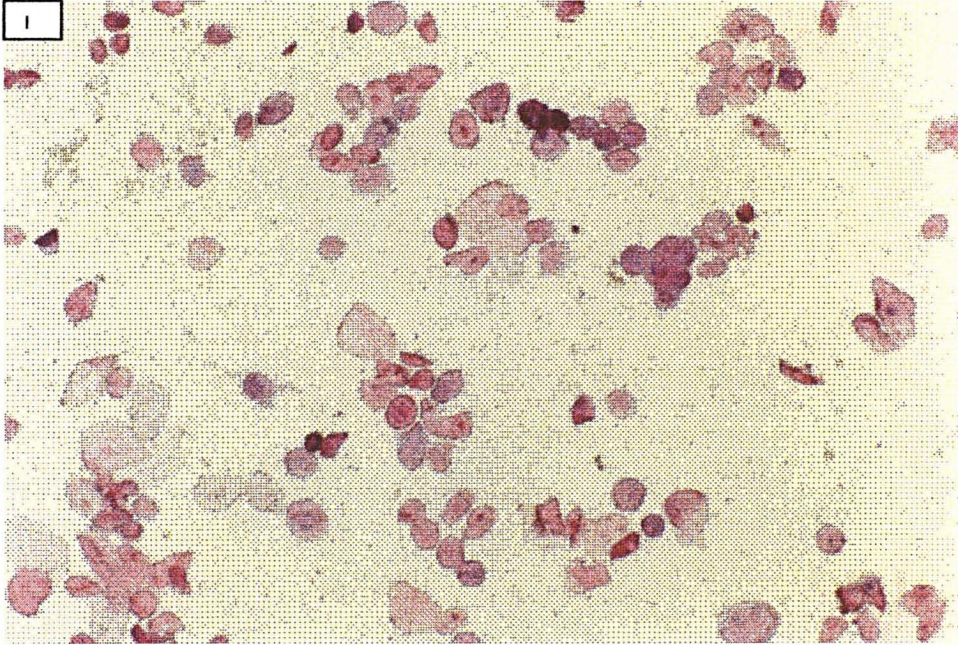
3.2 PLANO EXPERIMENTAL

3.2.1 Acompanhamento do Ciclo Estral, Cobertura e Gestação

O acompanhamento do ciclo estral e a confirmação da cobertura foram feitos por esfregaço vaginal, segundo a técnica descrita por CHAHOUND e KWASIGROCH (1977), sendo a presença de um espermatozóide no esfregaço confirmativo de cobertura.

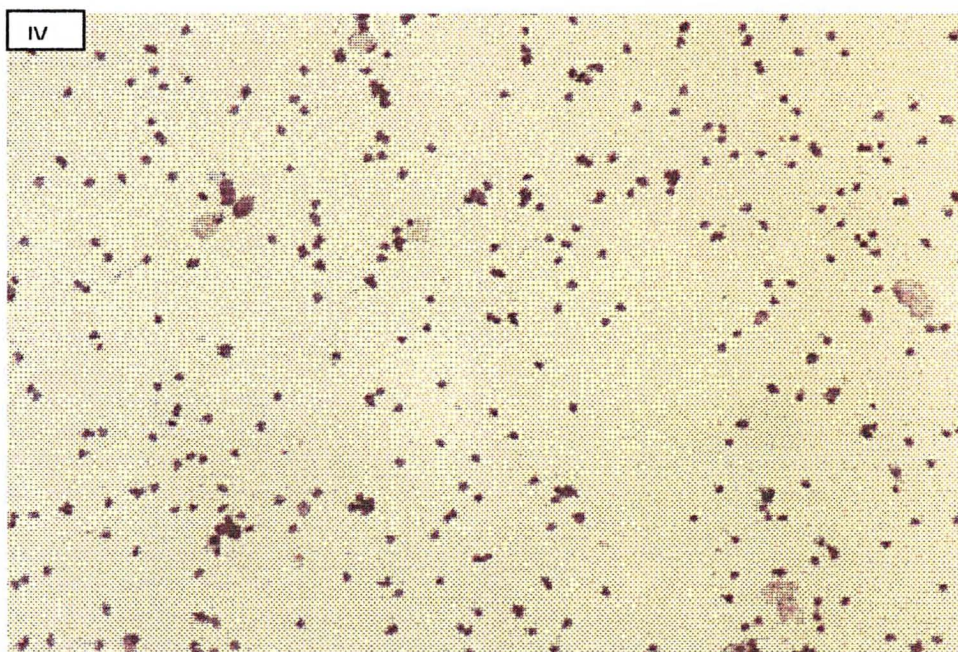
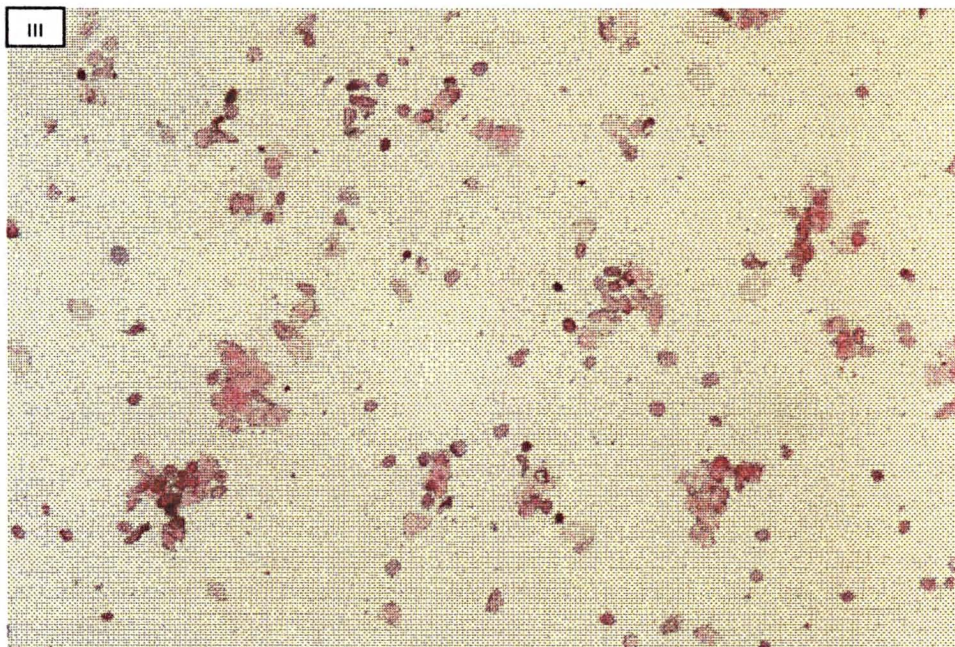
As coberturas foram sistematicamente realizadas no período de escuridão, entre 19 e 7 horas, sendo os machos colocados com as fêmeas às 18 h e retirados às 8h do dia seguinte. Cada dia um macho diferente era colocado por caixa. Após a passagem dos oito ratos pela mesma caixa reiniciava-se com o rato do primeiro dia.

FIGURA 5 – ESFREGAÇO VAGINAL CORADO COM HEMATOXILINA E EOSINA.



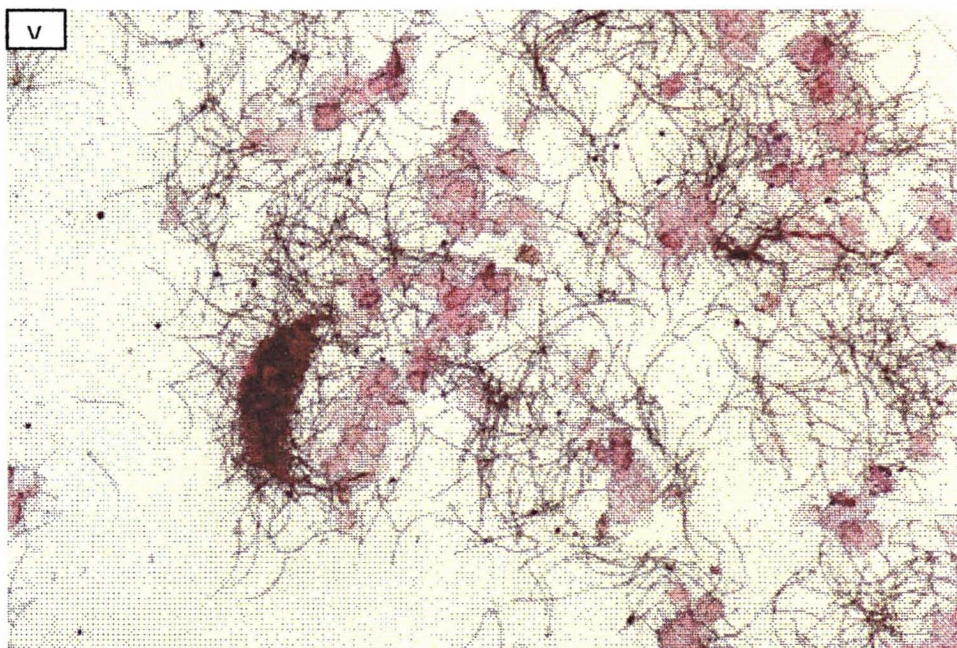
I – PROESTRO (1000 X); II – ESTRO (400 X).

FIGURA 6 – ESFREGAÇO VAGINAL CORADO COM HEMATOXILINA E EOSINA.



III – METAESTRO (400 X); IV – DIESTRO (400 X).

FIGURA 7 – ESFREGAÇÃO VAGINAL CORADO COM HEMATOXILINA E EOSINA.



V- ESFREGAÇÃO POSITIVO PARA COBERTURA (1000X).

As fêmeas cobertas eram separadas e permaneciam em caixas com cinco fêmeas até completarem 18 dias de gestação, quando eram separadas para caixas individuais, onde iriam parir e permanecer até o desmame.

3.2.2 Preparo da droga

O gossipol ácido acético¹, na forma pura (97,8%) e em pó, foi dissolvido em óleo de canola (Purilev[®]) em três diferentes concentrações, formando três diferentes suspensões da droga: 20 mg.mL⁻¹, 40 mg.mL⁻¹ e 80 mg.mL⁻¹.

¹ O gossipol ácido acético, fornecido pelo Laboratório Hebron- Caruaru/SE, apresentava relação molar de 1:1 entre gossipol e ácido acético.

Para melhor homogeneização da mistura, inicialmente, cada suspensão permaneceu em um homogeneizador por ultra-som durante uma hora. Durante a realização do experimento, as suspensões foram mantidas à temperatura de 4° Celsius. Todo dia, antes da administração da droga, cada suspensão era homogeneizada com auxílio de um homogeneizador magnético.

3.2.3 Delineamento Experimental e Tratamentos

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, onde foram testados quatro tratamentos com dez repetições em cada: Grupo I - Controle, Grupo II - Gossipol 20 mg.kg⁻¹, Grupo III - Gossipol 40 mg.kg⁻¹ e Grupo IV - Gossipol 80 mg.kg⁻¹.

A droga foi administrada do 5° até o 20° dia de gestação pela manhã. Cada animal recebeu o volume de 1 mL.kg⁻¹ de peso corporal por meio de sonda de gavagem e seringa de vidro de 1 mL, segundo o protocolo:

Grupo I (G I)- 1 mL.kg⁻¹ de peso corporal de óleo de canola;

Grupo II (G II)- 1 mL.kg⁻¹ de peso corporal da suspensão contendo 20 mg.mL⁻¹;

Grupo III (G III)- 1 mL.kg⁻¹ de peso corporal da suspensão contendo 40 mg.mL⁻¹;

Grupo IV (G IV)- 1 mL.kg⁻¹ de peso corporal da suspensão contendo 80 mg.mL⁻¹.

Os volumes administrados sofreram arredondamento pela segunda casa decimal. Exemplificando, a fêmea que pesou 218 g recebeu 0,22 mL de suspensão, bem como a que pesou 224 gramas. A fêmea que apresentou peso com final cinco, 255 gramas por exemplo, recebeu volume arredondado para cima, ou seja, 0,26 mL de suspensão.

FIGURA 8 – SUSPENSÕES CONTENDO GOSSIPOL ÁCIDO ÁCETICO.



3.3 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS

O acompanhamento dos animais para avaliação da toxicidade do gossipol procedeu-se segundo o *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment* (EPA/1996 – U.S. Environmental Protection Agency).

3.3.1 Gestação

As fêmeas foram pesadas diariamente do dia zero (dia do esfregaço vaginal positivo) até o dia do parto, acompanhando-se assim, o ganho de peso, a duração da gestação e os efeitos tóxicos sobre as ratas prenhes.

3.3.2 Parto e Lactação

No dia do parto, foi assinalado o peso da mãe, o número de filhotes nascidos (vivos e mortos) e o peso individual dos filhotes.

Durante a lactação, anotou-se o peso das mães e o peso das ninhadas, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 (dia do desmame). No dia do desmame avaliou-se a taxa de sexo (porcentagem de filhotes machos em relação ao total de filhotes) e o peso individual dos filhotes.

No desmame, todas as fêmeas foram sacrificadas para contagem do número de implantes uterinos, comparando desta forma, o número de fetos nascidos com o número de fetos gestados. As fêmeas que não pariram até o 25º dia pós-cobertura, foram também sacrificadas para a inspeção de pontos de implantação uterina.

3.4 AVALIAÇÃO DOS FILHOTES MACHOS

Na data do desmame, os filhotes machos foram pesados individualmente e sacrificados. Os testículos foram retirados e pesados individualmente e encaminhados para análise histológica. A partir do peso médio dos testículos avaliou-se a porcentagem da massa testicular em relação à massa corporal (índice gonadossomático).

3.5 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a retirada e pesagem dos testículos, esses foram colocados em líquido de Bouin por seis horas. Decorrida a primeira hora, os testículos foram retirados para serem seccionados ao meio, voltando em seguida, para o Bouin onde permaneceram até o término deste tempo.

Decorridas as seis horas, os testículos foram imersos diretamente em uma solução de álcool a 70%, onde permaneceram até o processamento do material.

O preparo do material seguiu a técnica de rotina, onde os testículos foram desidratados por passagens em soluções de concentrações crescentes de álcool e diafanizados em xilol. Depois de diafanizados, foram incluídos em parafina

e então cortados por microtomia em cortes de 4 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS

A análise histológica dos testículos incluiu os seguintes itens: caracterização dos tipos celulares que compõem o epitélio seminífero; porcentagem de túbulos luminados; medidas do diâmetro dos túbulos seminíferos; cálculo da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos. Utilizou-se um microscópio óptico Olympus[®], com ocular de aumento de 10 vezes e objetiva de 25 vezes para avaliação da porcentagem de túbulos luminados e, ocular de 10 vezes e objetiva de 40 vezes para as demais avaliações.

3.6.1 Porcentagem de Túbulos Seminíferos Luminados

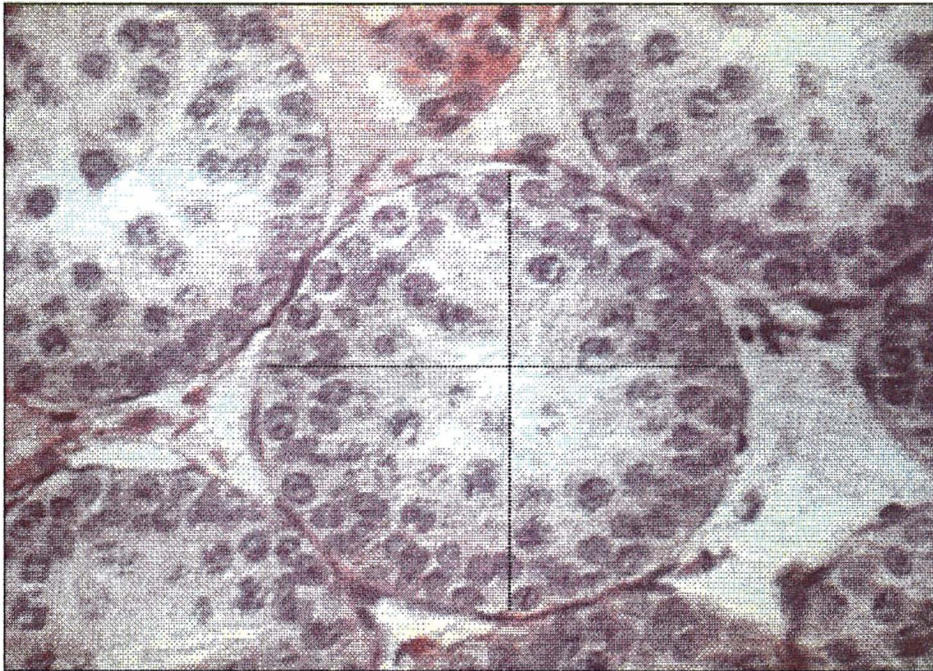
O cálculo da porcentagem de túbulos seminíferos que apresentavam lúmen obteve-se pela observação de 100 secções transversais de túbulos por testículo, constatando-se a presença ou não de luz tubular.

3.6.2 Diâmetro dos Túbulos Seminíferos

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido, segundo FRANÇA (1991), a partir das medidas do diâmetro de 10 secções transversais de túbulos seminíferos por animal (cada medida corresponde à média de duas medidas de diâmetro em sentidos opostos – vertical e horizontal - no mesmo túbulo). As secções transversais, escolhidas ao acaso mediante varredura horizontal, apresentavam contorno o mais circular possível. Para tanto se utilizou uma ocular micrométrica da marca Olympus[®] OSM-4 de 10X previamente calibrada para objetiva de 40X. Os valores médios encontrados na régua micrométrica (duas

aferições transversais de cada túbulo) foram multiplicados pela constante 0,26 de calibração, para aí se obter a medida do diâmetro tubular em μm .

FIGURA 9 – AFERIÇÃO DO DIÂMETRO DO TÚBULO SEMINÍFERO



3.6.3 Proporções Volumétricas dos Túbulos Seminíferos

As proporções volumétricas dos componentes testiculares foram estimadas através do método de CHALKLEY (1943), utilizando-se ocular de aumento de 10 vezes dotada de grátícula com 441 pontos eqüidistantes. Cinco campos, escolhidos ao acaso, foram registrados por testículo. As proporções volumétricas, expressas em porcentagem, foram calculadas sobre um total de duzentos pontos por campo e mil pontos por testículo, totalizando 10 mil pontos por tratamento. Tem como objetivo estimar a proporção (%) de túbulo seminífero e de tecido intersticial. Os componentes testiculares foram: túbulo seminífero (túnica própria + epitélio seminífero + lúmen tubular) e tecido intersticial (células de Leydig, tecido conjuntivo e vasos sangüíneos, linfáticos e nervos).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a análise de variância. As variâncias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Bartlett quanto a homogeneidade, e as variáveis tiveram suas médias testadas pelo teste ANOVA 1. Quando os resultados revelaram existir diferenças entre as médias dos tratamentos, estes foram comparados pelo teste de Dunnet no nível de 5% e 1% de probabilidade, a fim de determinar se as diferenças eram estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 GANHO DE PESO E TOXICIDADE NA GESTAÇÃO

Os valores médios de ganho de peso das ratas de cada grupo nos dias 0, 5, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 de gestação estão na tabela 1. Conforme evidenciado, as ratas do grupo G I apresentaram maior média de ganho de peso, ao passo que quanto maior a dose recebida, menor a média de ganho por grupo, sendo que o grupo que recebeu 80 mg.kg^{-1} perdeu peso até o término da gestação. As fêmeas que morreram, tiveram seu último peso em vida repetido até o dia 21 da sua respectiva gestação.

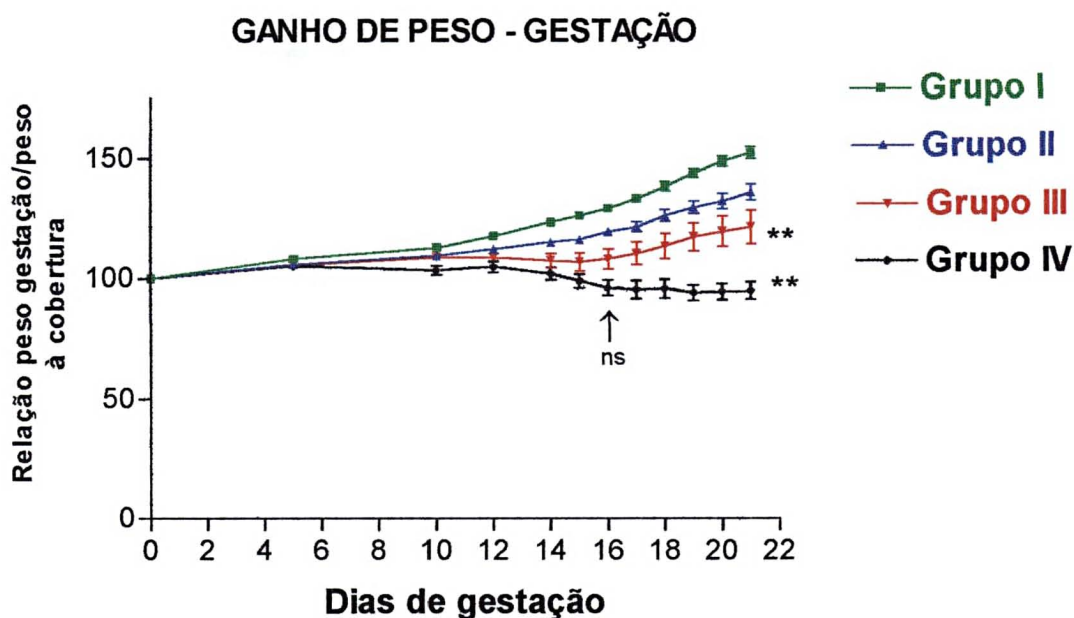
TABELA 1-GANHO DE PESO (% DO PESO À COBERTURA) DURANTE A GESTAÇÃO DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL. 2000

Dias de Gestação	G I (%) (n = 8)	G II (%) (n = 8)	G III (%) (n = 8)	G IV (%) (n = 8)
0	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
5	108,12 ± 2,70	105,75 ± 1,83	105,50 ± 2,51	105,00 ± 2,39
10	112,75 ± 2,82	109,37 ± 3,66	108,75 ± 3,37	103,25 ± 5,06
12	117,62 ± 2,45	112,00 ± 4,07	108,62 ± 4,78	104,87 ± 6,40
14	123,25 ± 3,15	115,00 ± 4,07	107,37 ± 8,10	102,00 ± 7,82
15	126,00 ± 2,39	116,12 ± 4,19	106,87 ± 10,36	99,00 ± 7,84
16	129,00 ± 2,67	119,37 ± 4,60	108,12 ± 11,75**	96,00 ± 9,07**
17	133,12 ± 3,48	121,37 ± 5,75	110,37 ± 12,95	95,25 ± 10,36
18	138,25 ± 5,47	126,00 ± 6,70	113,37 ± 14,40	95,75 ± 11,02
19	143,87 ± 5,36	129,37 ± 7,23	117,25 ± 16,16	94,00 ± 9,07
20	148,87 ± 5,96	132,00 ± 8,83	119,50 ± 17,58	94,37 ± 9,50
21	152,37 ± 6,67	135,87 ± 9,40	121,37 ± 19,59	94,87 ± 10,22

** $p \leq 0,01$ a partir do 16º dia de gestação.

Houve falha na cobertura em 2 ratas do grupo GI, 2 do GII, 1 do GIII e 2 do GIV. Morreram 7 ratas do grupo GIV e uma do grupo GIII. Uma rata do grupo GIII abortou.

GRÁFICO 1- CURVA DE GANHO DE PESO NA GESTAÇÃO PARA RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL.



** $p \leq 0,01$

ns – Até o 16º dia de gestação não houve diferença no ganho de peso entre os grupos

Na tabela 2 estão representadas as médias, por grupo, das porcentagens de peso no dia do parto em relação ao peso das ratas no dia da cobertura. Os grupos GI, GII, GIII e GIV apresentaram, respectivamente, peso ao parto de 118,1%; 110,6%; 97,0 % e 86,0% do peso à cobertura, com os valores entre o grupo G I e G II diferentes estatisticamente ao nível de 5% e, entre G I e G III e G I e G IV diferentes ao nível de 1%. O gráfico 1 demonstra a curva de ganho de peso durante a gestação para os quatro grupos estudados.

TABELA 2- PORCENTAGEM DO PESO AO PARTO E AO DESMAME, COMPARADO AO PESO À COBERTURA, DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Peso Parto(%) (x ± s)	Peso desmame (%) (x ± s)
G I	118,1 ± 5,25 (n = 8)	130,4 ± 4,83 (n = 7)
G II	110,6 ± 3,78* (n = 8)	119,9 ± 4,67* (n = 7)
G III	97,0 ± 6,83** (n = 7)	109,6 ± 11,67** (n = 5)
G IV	86,0 ± 0,00** (n = 1)	---

* (p≤0,05)

** (p≤0,01)

Houve falha na concepção em duas ratas do grupo G I, duas do G II, uma do G III e duas do G IV. A falha na concepção foi constatada pela não observação de pontos de implantação uterinos no dia 25 após a cobertura.

Durante a gestação, uma rata do grupo G III abortou, uma morreu no dia 17 e outras duas demonstraram sinais de canibalismo em todos os filhotes no dia do parto, ocorrendo o mesmo com uma rata do grupo G II. Das ratas do grupo G IV, somente uma rata prenhe sobreviveu ao período de gestação, sendo que uma morreu no dia 17, três no dia 18, duas no dia 20 e uma no dia 21 de gestação. O primeiro sinal clínico observado, em algumas ratas dois dias após o início da administração da droga, foi a presença de diarreia. As ratas, antes de morrerem, apresentavam sinais de emagrecimento, pelos eriçados, apatia e taquipnéia. Todos animais que morreram foram necropsiados e amostras de tecido cardíaco, hepático, pulmonar, renal e muscular encaminhados para análise histopatológica.

A rata do grupo G III que falhou na concepção manteve seu peso até o final do período de administração da droga, já as duas fêmeas do grupo G IV que falharam na concepção perderam peso, porém permaneceram vivas e dois dias após o término da administração do gossipol passaram a ganhar peso.

Durante as necrópsias, não se observou alterações macroscópicas significativas nos órgãos e o mesmo aconteceu com as avaliações histopatológicas.

As fêmeas sobreviventes começaram apresentar sinais de melhora dois dias após o término da administração da droga.

4.2 PERÍODO DE GESTAÇÃO

Como demonstrado na tabela 3, o período médio da gestação foi de 22,75; 22,50; 22,43 e 22,00 dias, respectivamente, para as ratas do grupo G I, G II, G III e G IV, não havendo diferença estatística entre eles.

TABELA 3-PERÍODO DE GESTAÇÃO DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Tempo de Gestação (dias) ($\bar{x} \pm s$)
G I (n=8)	22,75 \pm 0,46
G II (n=8)	22,50 \pm 0,53
G III (n=7)	22,43 \pm 0,79
G IV (n=1)	22,00 \pm 0,00

4.3 FILHOTES NASCIDOS

Na tabela 4 estão as médias dos números e dos pesos individuais ao nascimento de filhotes nascidos de ratas tratadas com gossipol durante a gestação. A média de filhotes nascidos para os grupos G I, G II e G III foram, respectivamente, 10,00; 7,71 e 10,20 filhotes. A única rata gestante do grupo G IV que sobreviveu matou todos os filhotes logo após o parto, o mesmo ocorrendo com uma rata do grupo G II e duas do grupo G III. As médias encontradas para o número de filhotes nascidos não diferiram estatisticamente. Uma rata do grupo G II apresentou um filhote natimorto, ao passo que no grupo G III três ratas tiveram natimortos (duas ratas um e uma dois natimortos). Nenhum natimorto foi observado no grupo G I.

Os animais do grupo G I apresentaram maior peso ao nascer ($6,29 \pm 0,74$), seguidos pelos do grupo G II ($6,05 \pm 0,78$) e com os do grupo G III ($5,14 \pm 0,65$) apresentando os menores pesos. Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,01$) entre as médias dos pesos dos filhotes do grupo G I e G III. Somente filhotes de ratas que pariram entre 7 e 12 filhotes foram avaliados para o peso ao nascimento, e somente filhotes de ratas que desmamaram entre 7 e 12 filhotes foram avaliados para o peso ao desmame.

TABELA 4- NÚMERO E PESO AO NASCIMENTO DE FILHOTES NASCIDOS DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

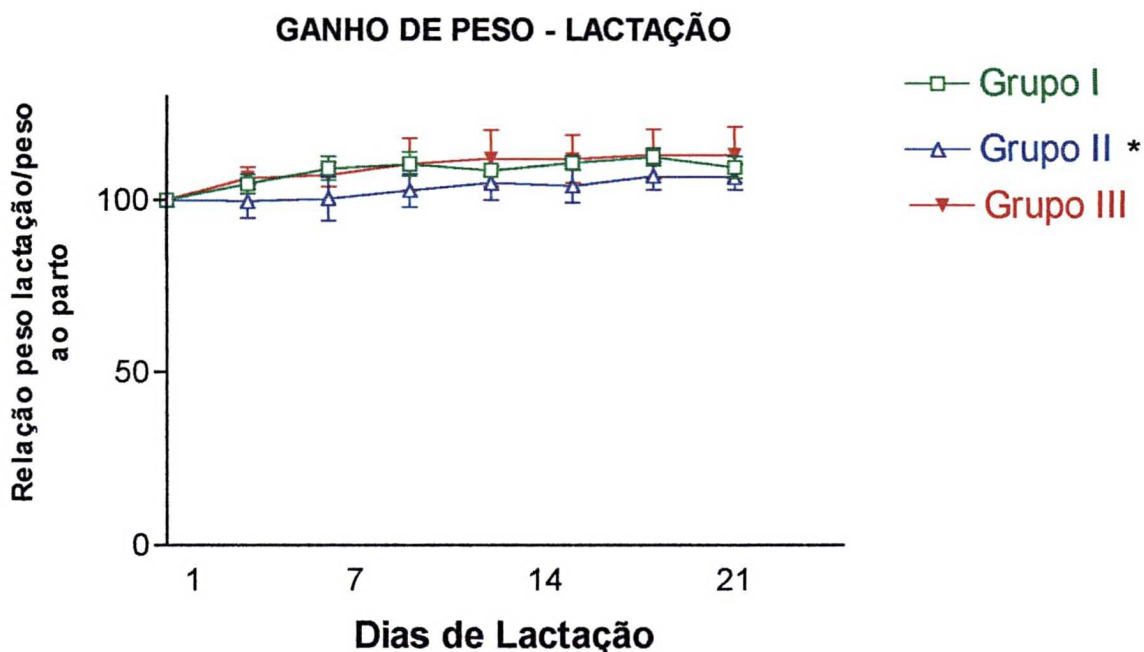
Grupos	Filhotes nascidos ($x \pm s$)	Peso individual (g) ($x \pm s$)
G I	$10,00 \pm 2,51$ (n = 8)	$6,29 \pm 0,74$ (n = 61)
G II	$7,71 \pm 3,15$ (n = 7)	$6,05 \pm 0,78$ (n = 40)
G III	$10,20 \pm 4,97$ (n = 5)	$5,14 \pm 0,65^{**}$ (n = 21)

** ($p \leq 0,01$)

4.4 LACTAÇÃO

Os valores médios de ganho de peso das ratas de cada grupo nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 da lactação estão representados no gráfico 2. Observou-se maior ganho de peso para as ratas do grupo G III, que não diferiu estatisticamente do grupo controle, ao passo que o ganho de peso para o grupo G II foi inferior e diferiu estatisticamente do grupo controle ($p \leq 0,05$). Quando se procedeu a avaliação do peso das ratas no dia do desmame em relação ao seu peso no dia da cobertura, observou-se que houve diferença estatística no ganho de peso entre os grupos (tabela 2), sendo que o ganho para o grupo G II diferiu do grupo controle ao nível de 5% e o grupo G III ao nível de 1%.

GRÁFICO 2- CURVA DE GANHO DE PESO NA LACTAÇÃO PARA RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO.



* $p \leq 0,05$

Os pesos médios dos filhotes no dia do desmame estão apresentados na tabela 5. Os filhotes das ratas do grupo G I apresentaram o maior peso médio (g) ($36,42 \pm 5,45$), seguidos pelos filhotes das ratas do grupo G II ($36,26 \pm 1,94$) e com os filhotes do grupo G III apresentando a menor média de peso ($28,98 \pm 3,49$). Diferença significativa foi observada entre os grupos G I e G III ($p \leq 0,01$).

TABELA 5- MÉDIA DE PESO NO DESMAME DOS FILHOTES DE RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Peso (g)	Desvio Padrão (g)
G I (n = 31)	36,42	5,45
G II (n = 30)	36,26	1,94
G III (n = 18)	28,98 **	3,49

** ($p \leq 0,01$)

Na data do desmame avaliou-se a porcentagem de filhotes machos e os valores obtidos estão na tabela 6. O grupo G II apresentou a menor porcentagem de machos, sendo a diferença significativa em relação ao grupo G I.

TABELA 6-FILHOTES MACHOS NASCIDOS DA RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Porcentagem (%)	Desvio Padrão (%)
G I	53,14	11,26
G II	32,14*	17,92
G III	49,67	14,0

* ($p \leq 0,05$)

Na tabela 7 encontram-se as médias das porcentagens de fetos nascidos em relação ao número de implantes uterinos para os grupos estudados. Os valores foram muito parecidos entre os grupos, 94,00%; 91,29% e 91,80 respectivamente para os grupos G I, G II e GIII, não havendo diferença entre eles.

TABELA 7- FILHOTES NASCIDOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE IMPLANTES UTERINOS EM RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Porcentagem (%)	Desvio Padrão (%)
G I (n = 8)	94,00	7,07
G II (n = 7)	91,29	10,18
G III (n = 5)	91,80	14,74

A morte de filhotes durante a lactação ocorreu em função de canibalismo em duas ninhadas, sendo uma no grupo controle em que a mãe matou todos os filhotes (12 filhotes) no dia 7 da lactação e outra no grupo G III, em que a fêmea, no transcorrer da lactação, matou 4 filhotes (total de 9) de sua ninhada.

FIGURA 10 – PONTOS DE IMPLANTAÇÃO UTERINOS.



4.5 AVALIAÇÃO TESTICULAR DOS FILHOTES

4.5.1 Índice Gonadossomático

Na tabela 8, são apresentados os tamanhos médios dos testículos através do índice gonadossomático (porcentagem do peso corporal representada pelo testículo). Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

TABELA 8- ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO DE RATOS FILHOS DE RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Porcentagem (%)	Desvio Padrão (%)
G I (n = 21)	0,239	0,022
G II (n = 15)	0,239	0,018
G III (n = 18)	0,234	0,021

4.5.2 Porcentagem de Túbulos Seminíferos com Lúmen

Pela quantificação de túbulos que possuíam luz no dia do desmame, observou-se que há diferença significativa entre os grupos estudados (tabela 9). Observou-se uma uniformidade na porcentagem de túbulos com luz nos animais do grupo controle, ao passo que para os animais filhos de ratas tratadas houve uma variação grande dentro de cada grupo (gráfico 3).

Respectivamente, as médias e os desvios padrões das porcentagens de túbulos luminados para os animais dos grupos G I, G II e G III foram $84,0 \pm 4,9$; $69,8 \pm 14,2$ ($p \leq 0,05$) e $56,7 \pm 12,0$ ($p \leq 0,01$).

TABELA 9- PORCENTAGEM DE TÚBULOS SEMINÍFEROS COM LÚMEN EM TESTÍCULOS DE RATOS (COM 21 DIAS DE VIDA), FILHOS DE RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Túbulos com luz (%)	Desvio Padrão (%)
G I (n = 10)	84,0	4,9
G II (n = 10)	69,8*	14,2
G III (n = 10)	56,7**	12,0

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

Foram avaliados 100 cortes transversais por testículo

FIGURA 11-CORTE TRANSVERSAL DE TESTÍCULO DE RATOS PARA CONSTATAÇÃO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS LUMINADOS. I GRUPO G I; II GRUPO G III.

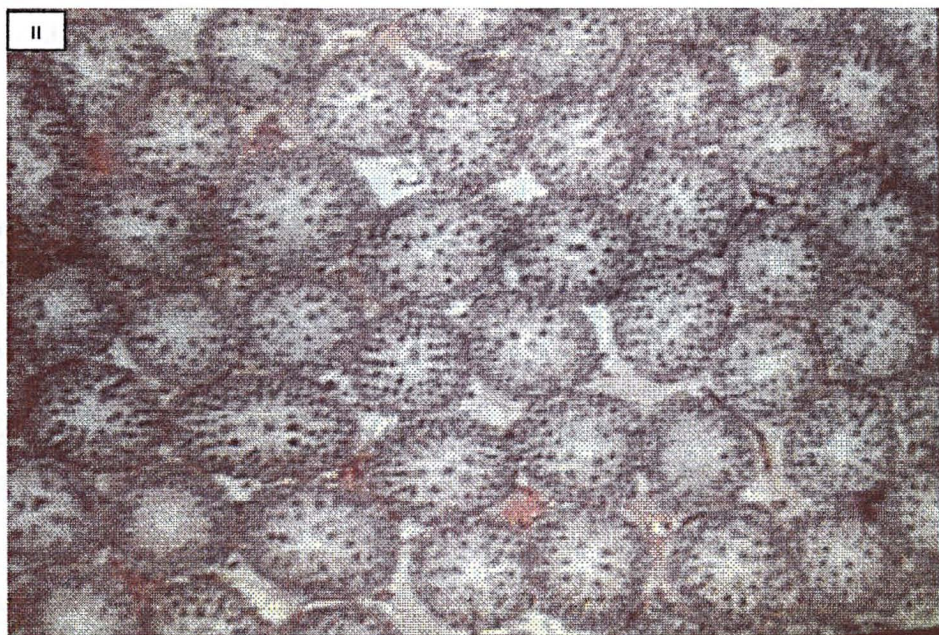
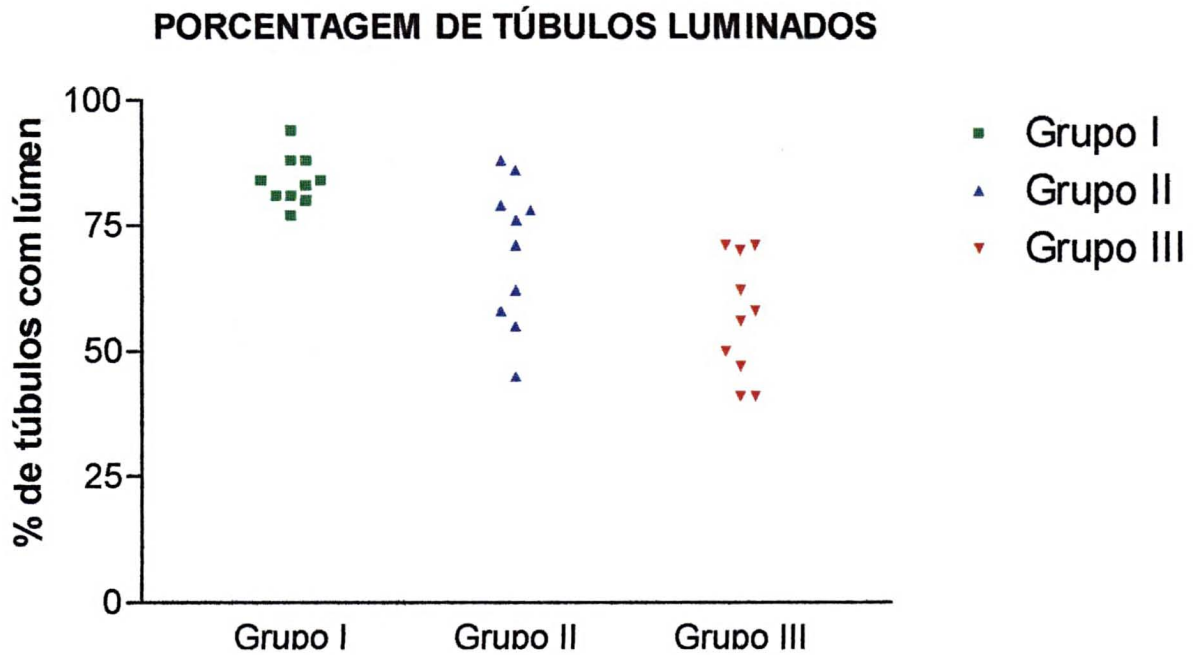


GRÁFICO 3- DISTRIBUIÇÃO DA PORCENTAGEM DE TÚBULOS SEMINÍFEROS COM LUZ EM RATOS FILHOS DE RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO.



4.5.3 Diâmetro dos Túbulos Seminíferos

Na tabela 10 estão contidos os resultados para as médias do diâmetro dos túbulos seminíferos e proporção volumétrica tubular. Com relação à proporção tubular não houve diferença entre os grupos, sendo os túbulos seminíferos responsáveis por, praticamente, 90 % do volume testicular em todos os tratamentos.

As médias para os diâmetros tubulares foram $126,00 \pm 7,8 \mu\text{m}$, $123,10 \pm 8,3 \mu\text{m}$ e $112,90 \pm 7,9 \mu\text{m}$, respectivamente para os grupos G I, G II e G III, sendo G I diferente estatisticamente de G II e GIII ($p \leq 0,01$).

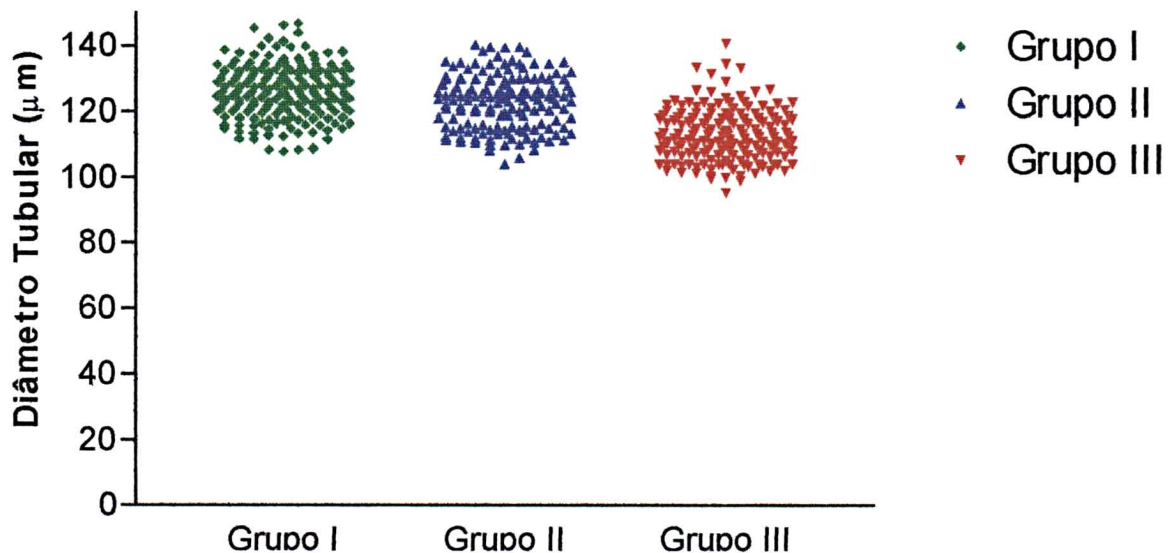
TABELA 10- MEDIDAS DO DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS E PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA TUBULAR DOS TESTÍCULOS DE RATOS FILHOS DE RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000

Grupos	Diâmetro tubular (μm) ($\bar{x} \pm s$)	Proporção volumétrica tubular (%) ($\bar{x} \pm s$)
G I (n = 20)	126,0 \pm 7,8	90,38 \pm 0,81
G II (n = 15)	123,1 \pm 8,3**	90,24 \pm 1,39
G III (n = 17)	112,9 \pm 7,9**	90,70 \pm 1,46

** $p \leq 0,01$

GRÁFICO 4- DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DE DIÂMETRO TUBULAR EM RATOS FILHOS DE RATAS TRATADAS COM GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO.

DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS



4.5.4 Determinação do Tipos Celulares

Na avaliação histológica, os achados foram compatíveis com o esperado para animais antes da puberdade, encontrando-se grande quantidade de células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos primários em leptóteno e paquíteno .

FIGURA 12- POSIÇÃO ADLUMINAL DAS CÉLULAS DE SERTOLI E FORMAÇÃO DA BARREIRA HEMATOTESTICULAR NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS COM 21 DIAS DE VIDA. SE – CÉLULAS DE SERTOLI

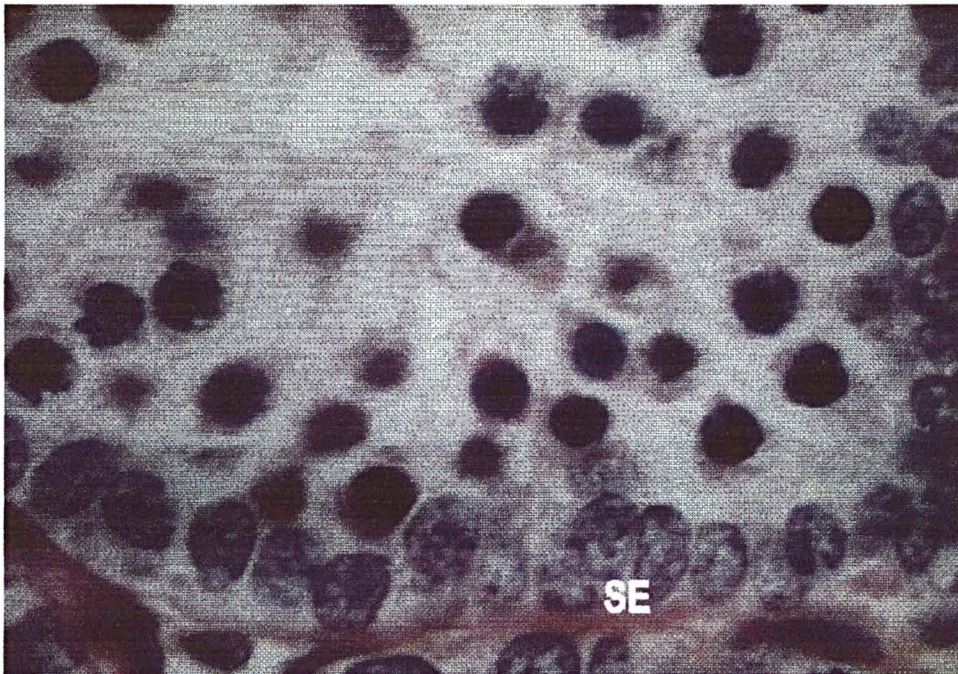
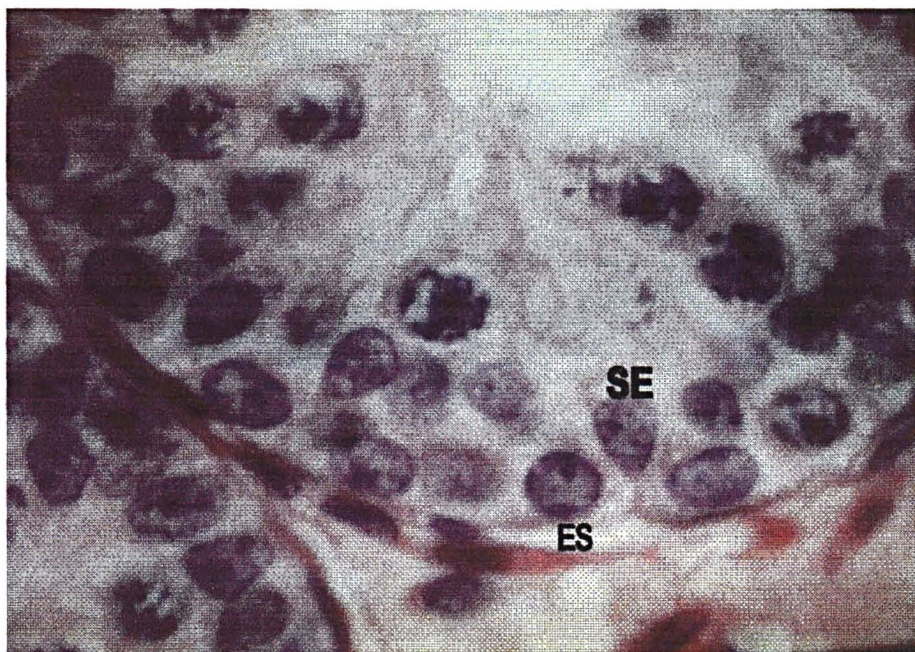
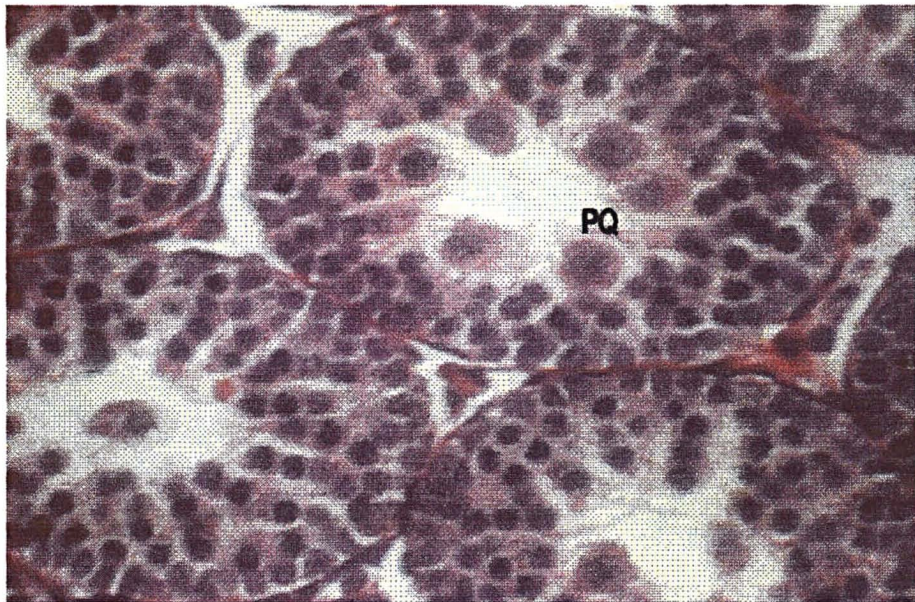


FIGURA 13 - TIPOS CELULARES PRESENTES NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS COM 21 DIAS DE VIDA. **PQ**- ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO; **SE**- CÉLULA DE SERTOLI; **ES**- ESPERMATOGÔNIA.



5 DISCUSSÃO

Devido à escassez de trabalhos na literatura relacionando os efeitos do gossipol administrado durante a gestação sobre própria gestação, lactação, desenvolvimento pós-natal e desenvolvimento testicular dos filhotes de ratas, esse trabalho tem caráter inédito.

5.1 GANHO DE PESO E TOXICIDADE NA GESTAÇÃO

Os valores médios de ganho de peso durante a gestação para os animais dos grupos controle e tratados estão expostos na tabela 1. Optou-se por trabalhar com dados percentuais dos pesos nos dias observados durante a gestação, em relação ao peso no dia da cobertura, eliminando as variações de peso absoluto entre os animais. Observa-se que o ganho de peso médio entre os grupos apresenta uma relação de dose e tempo dependência, onde, quanto maior a dose administrada de gossipol, menor o ganho de peso apresentado. Os dados do gráfico 1 representam os resultados da tabela 1, acusando a inexistência de diferença significativa no ganho médio de peso entre os grupos testados até o 16º dia de gestação. O ganhos de pesos médios para as fêmeas dos grupos G IV e G III passaram a apresentar diferença significativa em relação ao grupo G I, respectivamente, a partir do dia 16 (dia 16 $p \leq 0,05$ e dia 17 $p \leq 0,01$) e dia 18 (dia 18 $p \leq 0,05$ e dia 20 $p \leq 0,01$) de gestação. O ganho de peso entre as fêmeas do grupo G I e G II não diferiu estatisticamente até o 21º dia de gestação.

Devido às diferenças de tamanho nas ninhadas, espera-se diferenças no ganho de peso durante a gestação entre os animais, assim, como parâmetro de toxicidade materna, avaliou-se também a porcentagem do peso materno ao parto em relação ao peso à cobertura. Como demonstrado na tabela 2 houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com gossipol, onde as ratas do grupo G II aumentaram o peso real até o parto, em média, 10,6% ($p \leq 0,05$) ao passo que as ratas do grupo G I aumentaram 18,1%. As médias de ganho de peso real para as ratas dos grupos G III e G IV foram negativas, tendo as fêmeas do

grupo G III perdido 3% ($p \leq 0,01$) e a do grupo G IV 14% de seu peso entre a cobertura e o parto ($p \leq 0,01$).

Os sinais de toxicidade materna foram observados a partir do 12º dia de gestação (8º dia de administração da droga) nas ratas do grupo G III e G IV, estando elas apáticas, com pelos eriçados, secreção nasal, taquipnéia e, algumas apresentaram diarreia a partir do 2º dia de administração da droga. Os óbitos ocorreram a partir do dia 17 da gestação (12º dia de administração da droga), totalizando, até o dia 21 de gestação, 7 óbitos no grupo G IV e um no grupo G III. Problemas de canibalismo, no dia do parto, foi constatado em uma rata do grupo G II, duas do grupo G III e na única rata gestante sobrevivente do grupo G IV. Houve ainda um aborto no grupo G III. Duas ratas do grupo G II apresentaram diarreia, mas se recuperaram antes do final da gestação. Nenhuma rata do grupo G I e G II demonstrou sinais de apatia e alterações respiratórias na inspeção diária até o final da gestação.

Deve-se salientar a não observação de alterações macroscópicas nas necrópsias dos animais que morreram, bem como nas análises histopatológicas de seus tecidos, sugerindo alterações de função celular sem haver tempo suficiente para alterações morfológicas. BENDER *et al.* (1988b), também não encontraram alterações significantes nas necrópsias e exames histopatológicos de ratas que morreram intoxicadas pelo gossipol. Esses autores descreveram como possível mecanismo do aparecimento da diarreia a inibição, pelo gossipol, do pepsinogênio e/ou de outras enzimas digestivas.

Pelos dados obtidos, torna-se evidente, a relação de dose e tempo dependência no aparecimento dos sinais de toxicidade, uma vez que quanto maior a dosagem fornecida mais precoce e mais grave foram os sinais observados. Isto vem concordar com os achados de QIAN e WANG (1984) e JOHANSEN e MISRA (1990).

O menor ganho médio de peso, observado nas ratas do grupo G II, no dia do parto em relação ao grupo controle, também foi observado por LANGERLOF e TONE (1985), trabalhando com ratas vazias que receberam 20 mg.kg^{-1} de gossipol, pelo período de 60 dias. Já BEAUDOIN (1985), não observou alterações em ratas que receberam 20 mg.kg^{-1} , em dose única, em diversos dias da gestação (entre 1º e 16º dia de gestação).

BENDER *et al.* (1988b) administrando gossipol para ratas adultas e vazias, durante 30 dias, na dosagem de 40 e 60 mg.kg⁻¹, observaram no término do estudo, menor ganho médio ($p \leq 0,01$) de peso para os grupos tratados (14,24% e 9,20% de ganho, respectivamente) em relação ao grupo controle (25,42%), bem como o óbito de quatro ratas que haviam recebido 60 mg.kg⁻¹. Comparando esses dados com os de LANGERLOF e TONE (1985), e com os achados obtidos pela administração de gossipol durante a gestação, no presente trabalho, observa-se que fêmeas gestantes podem ser mais sensíveis que as não gestantes aos efeitos tóxicos do gossipol, pois as ratas apresentaram os mesmos efeitos de intoxicação, se não mais graves, e em menor tempo de administração da droga.

Com relação ao fato de quatro ratas terem apresentado canibalismo no dia do parto, não se conseguiu avaliar se os filhotes haviam nascidos vivos ou não.

QIAN e WANG (1984) relataram que doses 5 a 9 vezes superior à dose efetiva anticoncepcional para ratos machos (10 a 30 mg.kg⁻¹) não produziram sinais de toxicidade, e que as fêmeas de hamsters foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do gossipol. Assim, dos resultados obtidos com a administração do gossipol durante a gestação de ratas, observou-se que as ratas prenhes também foram mais sensíveis que os machos, comparados com dados de literatura, aos efeitos tóxicos do gossipol.

Outro ponto a ser considerado, é uma possível resistência individual aos efeitos tóxicos do gossipol, uma vez que há variação na resposta individual frente à administração da droga, pois dentro do grupo G III houve fêmeas que ganharam 3% de peso real e outras que perderam 13% durante o período de administração da droga.

5.2 PERÍODO DE GESTAÇÃO

Como observado na tabela 3, não houve diferença estatística no período de gestação entre os grupos testados. A média do tempo de gestação ficou em 22 dias para todos os grupos, estando em conformidade com a fisiologia reprodutiva da rata (CHAHOU e KWASIGROCH, 1977).

O principal ponto observado foi que o gossipol não foi capaz de interromper a gestação, mesmo em doses que provocaram intoxicação grave nas fêmeas tratadas (40 e 80 mg.kg⁻¹).

LIN *et al.* (1985), administraram gossipol às ratas prenhes, iniciando o tratamento em diferentes períodos da gestação. A administração de 12,5 ou 25 mg.kg⁻¹, por via intramuscular, entre o 7° e 14° ou 14° e 21° dia de gestação não induziu interrupção da gestação. Contudo, quando o tratamento iniciou-se no proestro e estendeu-se até o sétimo dia de gestação, observou-se, através de laparotomia no oitavo dia de gestação, menos implantes uterinos naquelas fêmeas que receberam a maior dosagem, comparado às fêmeas controle, embora nenhum filhote nascera desses animais. Paralelamente, observou-se nessas fêmeas, significativa diferença nas concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol, estando estes abaixo dos valores encontrados para os animais do grupo controle. YANG e WU (1987) observaram, administrando 90 e 120 mg.kg⁻¹ de gossipol, entre o primeiro e quinto dia de gestação em ratas, bloqueio na manutenção da gestação em 85 e 75% das fêmeas, respectivamente.

Os dados revelam que o gossipol não é capaz de interromper a gestação, quando administrado após a fase de implantação do embrião no útero, que ocorre até o sexto dia da prenhez. Porém a administração do gossipol anterior a essa fase é capaz de inibir a gestação dependendo da dosagem administrada (LIN *et al.*, 1985; YANG e WU, 1987). Esses autores concordam que esse fato é devido à baixa secreção de P₄ e estrógeno provocada pela administração do gossipol antes da fase de implantação dos fetos no útero, uma vez que a administração de hormônios exógenos (P₄ e estrógeno), durante essa fase (dia 0 ao 8 da gestação), foi capaz de manter a gestação até o final. Nesses trabalhos, o gossipol não interferiu no processo inicial da implantação, porém evitou a continuação da gestação.

TABELA 11- EFEITOS DO GOSSIPOL NA GESTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA EM RATAS NO DIA 10 PÓS-COBERTURA.

Dose (mg.kg ⁻¹ /dia)	n	Prenhez	Nº de CL	Nº de Implantes	Conc. de P ₄ Não gestante	gestante
30	8	8	11,9 ± 1,5	8,6 ± 1,5		219,7 ± 25,1
60	8	4 [*]	12,0 ± 0,7	12,8 ± 0,8	41,1 ± 5,4 ^{***}	130,8 ± 4,8
90	7	1 ^{**}	11,1 ± 0,9	13,0	71,3 ± 14,5 ^{***}	96,3
120	8	2 [*]	10,1 ± 0,8	4,5 ± 2,5 ^{**}	45,0 ± 4,0 ^{***}	75,9 [*]
Controle	9	9	11,6 ± 0,6	10,9 ± 0,7		215,3 ± 24,1

* p≤0,05

** p≤0,01

*** p≤0,001

Fonte : YANG e WU (1987)

Dessa forma, o gossipol pode interferir na transformação, mediada pela prolactina, do CL não funcional do ciclo estral em CL funcional da gestação, limitando assim a secreção de progesterona e estrógeno que são indispensáveis na manutenção inicial da gestação de ratas, fato este que ocorre pouco antes e durante a fase de implantação uterina.

Após a fase de implantação, quem mantém a gestação são os Lactogênios Placentários (PL), produzidos pela placenta, estimulando a produção de progesterona pelo CL (BAZER, 1999). Como a administração de gossipol, após a fase de implantação, não induziu interrupção da gestação, acredita-se que, nas dosagens de gossipol utilizadas, os PL sejam capazes de manter a secreção de progesterona em níveis suficientes para manutenção da gestação, apesar de haver trabalho relatando queda na produção de progesterona durante a gestação em ratas tratadas com gossipol neste período (YANG e WU, 1987).

5.3 FILHOTES NASCIDOS

As médias para os números de filhotes nascidos não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados (tabela 4). Porém as fêmeas do grupo G II apresentaram média de filhotes nascidos (7,71 ± 3,15) um pouco abaixo

da média esperada para espécie (9 a 10 filhotes) segundo CHAHOUD e KWASIGROCH (1977). Já as médias dos números de filhotes nascidos para os grupos G I e G III estiveram dentro do normal esperado.

A relação entre o número de filhotes nascidos e o número de implantes uterinos não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos avaliados (tabela 7). A contagem dos implantes uterinos é importante para se ter noção do número de fetos gestados em relação ao número de nascidos, fornecendo dados sobre possíveis perdas por canibalismo materno, absorção embrionária pós-implantação ou até mesmo aborto. Desta forma, não houve alterações quanto à manutenção da gestação e sobrevivência embrionária ou fetal durante a vida intrauterina, tendo os três grupos apresentado relação filhotes nascidos/implantes uterinos, acima de 90%.

O aborto que ocorreu em uma rata do grupo G III foi detectado pela presença de pontos de implantação uterinos depois de decorridos 25 dias da cobertura e sem o animal apresentar sinais de parição

Os resultados para o peso ao nascimento apresentados na tabela 4, mostram, mais uma vez, a relação de dose dependência para os efeitos do gossipol, onde, os filhotes do grupo G III, apresentaram média de peso inferior aos filhotes do grupo G I ($p \leq 0,01$), contudo a média de peso ao nascimento esteve dentro do esperado para a espécie, segundo BIVIN (1986). O peso médio ao nascimento para os filhotes do grupo G II, que receberam 20 mg.kg^{-1} , não diferiu estatisticamente do grupo controle, resultado que também foi obtido por BEAUDOIN (1985), administrando a mesma dose para ratas entre o 6° e o 15° da gestação.

Apesar de haver poucos natimortos (5 filhotes), o grupo G III deteve 80% deste parâmetro, apresentando três filhotes mortos, em ninhadas distintas, no dia do parto. Este fato, bem como o aborto de outra rata desse grupo, devem ser decorrentes da intoxicação materna.

5.4 LACTAÇÃO

Ao se comparar os resultados para o ganho de peso durante a lactação, em relação ao peso ao parto (gráfico 2), observa-se maior ganho de peso para os

animais do grupo G III, devido ao fato de ser o grupo que mais sofreu os efeitos tóxicos do gossipol durante a gestação. Assim com o término do tratamento, esses animais apresentaram maior ganho, porém sem diferir estatisticamente do grupo controle. Por outro lado, o ganho médio de peso para as fêmeas do grupo G II continuou sendo inferior aos das fêmeas do grupo controle ($p \leq 0,05$).

Observando a tabela 2, verifica-se que o período de lactação não foi suficiente para que as fêmeas dos grupos G II e G III ganhassem peso a ponto de alcançarem o peso das fêmeas do grupo G I, sendo que as fêmeas do grupo G I foram sacrificadas no dia do desmame pesando, em média, 30,4% a mais que no dia da cobertura, as fêmeas do grupo G II 19,9% ($p \leq 0,05$) e as do grupo G III 9,5% ($p \leq 0,01$).

Durante o experimento não foi controlada a ingestão diária de alimento e água, mas o menor ganho de peso observado nos grupos G II e G III pode ser decorrente da menor ingestão de alimento provocado pelos efeitos tóxicos do gossipol (JOHANSEN e MISRA, 1990).

As médias para os pesos ao desmame dos filhotes de ratas tratadas com gossipol durante a gestação estão expressos na tabela 5. Nela observa-se que a média de peso para os filhotes do grupo G III ($28,98 \pm 3,49$ g) diferiu estatisticamente ($p \leq 0,01$) do grupo controle ($36,42 \pm 5,45$ g). Esse achado indica mais uma vez a relação de dose dependência para toxicidade do gossipol. LANGERLOF e TONE (1985) similarmente observaram menor peso ao desmame em filhotes de ratas tratadas com gossipol utilizando a dose de 20 mg.kg^{-1} . O menor crescimento desses filhotes pode ter sido provocado pela menor produção de leite pelas mães, bem como, resquícios da ação tóxica do gossipol na vida intrauterina, uma vez que também apresentaram menor peso ao nascimento.

Na data do desmame, como demonstrado na tabela 6, observou-se que a taxa de machos foi inferior ($p \leq 0,05$) para o grupo G II (32,14% de filhotes machos) em relação ao grupo controle (53,14%). Devido à administração da droga iniciar-se no quinto dia de gestação, não interferindo no processo de fecundação, e os filhotes machos e fêmeas não apresentarem alterações macroscópicas com relação à diferenciação sexual, essa inferior porcentagem de machos presente no grupo G II

deveu-se ao acaso. Possivelmente não existiria se fosse utilizado número superior de ninhadas.

5.5 AVALIAÇÃO TESTICULAR DOS FILHOTES

Na tabela 8 estão apresentados os índices gonadossomáticos para os grupos G I, G II e G III, não havendo diferenças significativas entre eles. A porcentagem do peso corporal representada pelo testículo, nos três grupos, ficou em 0,23%. Em ratos o índice gonadossomático varia conforme a idade, ficando em 1.1% aos 60 dias, 0,67% aos 150 dias e 0,66% aos 240 dias de vida (BERNDTSON e THOMPSON, 1990). Essa variação se deve às mudanças fisiológicas no ganho de peso, tanto corporal como gonadal, que ocorrem nas diferentes fases do crescimento. Os valores obtidos para os filhotes dos grupos G I, G II e G III foram inferiores aos apresentados pelos animais na fase de início de puberdade e vida adulta, em função da avaliação ter sido feita na época do desmame.

Pelo fato dos índices gonadossomáticos serem muito próximos entre os grupos, acredita-se que o gossipol não afetou o crescimento testicular na vida intrauterina ou durante o período de amamentação. Optou-se por trabalhar com os índices gonadossomáticos ao invés do peso bruto testicular, pelo fato dos filhotes apresentarem grande variação de peso corporal, acarretando variação de peso testicular proporcional ao peso corporal.

Na tabela 9 pode-se verificar a diferença que houve entre os grupos, com relação à porcentagem de túbulos seminíferos que apresentavam luz no dia do desmame. A formação de lúmen está relacionada com o início da secreção do fluido tubular e a formação do citoesqueleto das células mióides, bem como a formação da barreira hematotesticular e desenvolvimento do citoesqueleto de actina nas células de Sertoli (RUSSEL *et al.*, 1989, TINDALL *et al.*, 1975). RUSSEL *et al.* (1989), observaram que a barreira hematotesticular de ratos começa a se formar em torno do 15º dia de vida e está completamente presente em todos os túbulos até o 18º dia. O surgimento do citoesqueleto de actina, responsável pela formação das junções intercelulares do tipo *tight*, inicia-se no 16º dia e atinge seu desenvolvimento completo aos 22 dias de vida, ao passo que o citoesqueleto das células mióides

começa a se formar no dia 14 e está completamente formado até o dia 22. Assim no 10º dia pós-nascimento, 95,5 % dos túbulos seminíferos não apresentavam lúmen, mas progressivamente a partir do 12º dia um número maior de túbulos passaram a apresentar lúmen, sendo que no 18º dia 84,5% dos túbulos estavam luminados e até o 30º dia de vida todos os túbulos estavam abertos.

A presença de túbulos com lúmen pequenos no 10º dia pós-nascimento deve-se ao fato das células de Sertoli iniciarem a secreção do fluido tubular, porém o aparecimento do fluxo tubular é dependente da formação da barreira pelas células mióides, pressão de fluxo e contração da cápsula testicular, que aparecem a partir do 20º dia de vida. Um gradual aumento no diâmetro tubular ocorre antes e simultaneamente à formação da barreira hematotesticular, mas 90% de seu aumento ocorre após a sua formação. O aumento mais rápido se dá entre os 30 e 50 dias de vida, devido à maturação das junções intercelulares das células de Sertoli, tornando-se mais permeáveis e/ou aumento de secreção e/ou contínua estruturação tubular, resultando em um lúmen maior (RUSSELL, 1989). O menor índice gonadossomático observado nos três grupos testados nesse experimento, em relação ao observado por BERNDTSON e THOMPSON (1990), deve-se ao fato que esses autores trabalharam com animais aos 60 dias de vida, ou seja, após o rápido crescimento testicular que ocorre entre os 30 e 50 dias, fato esse que faz com que o peso testicular aumente mais do que o peso corporal proporcionalmente.

O resultado obtido no grupo G I ($84,0\% \pm 4,9$) para a porcentagem de túbulos luminados aos 21 dias de vida, está muito próximo ao obtido por RUSSELL *et al.* (1989) aos 18 dias (84,5%), demonstrando que nesse grupo o processo de desenvolvimento da barreira hematotesticular está dentro do normal esperado para a espécie. Já os grupos G II ($69,8\% \pm 14,2$) e G III ($56,7\% \pm 12,0$), que diferiram estatisticamente do grupo G I, estão com valores abaixo do esperado, revelando um possível atraso no desenvolvimento e maturação da barreira hematotesticular, bem como, na secreção e no fluxo do fluido tubular, principalmente no grupo G III.

As diferenças nas médias do diâmetro dos túbulos seminíferos, apresentados na tabela 10, possivelmente são decorrentes do atraso no desenvolvimento dos túbulos observados entre os grupos, onde se verifica que o grupo controle apresentou 126,0 μm em média de diâmetro, diferindo

estatisticamente ($p \leq 0,01$), dos grupos G II com média de 123,1 μm e G III com 112,9 μm de média.

O fato da proporção volumétrica tubular não apresentar diferença significativa entre os grupos, todos próximos de 90%, indica que a relação túbulo-interstício é muito similar entre os tratamentos, demonstrando que a variação dos resultados acima mencionados são decorrentes, possivelmente, de um atraso no desenvolvimento dos túbulos.

Ficam as dúvidas, se os efeitos da administração do gossipol durante a gestação podem interferir no processo de formação da barreira hematotesticular e na produção e/ou fluxo do fluido tubular diretamente sobre as enzimas envolvidas no processo, principalmente nas células de Sertoli, ou essa resposta é decorrente de um atraso no desenvolvimento corporal, de uma forma geral, provocado pelos efeitos tóxicos tanto na mãe como nos filhotes. MONSEES *et al.* (1998) e HERVE *et al.* (1996) descreveram alterações no metabolismo e na comunicação intercelular, quando células de Sertoli foram cultivadas em meio contendo gossipol.

Observou-se também uma variância, dentro dos grupos tratados, com relação aos túbulos seminíferos luminados (gráfico 3), indicando mais uma vez a possibilidade de haver, dentro da mesma espécie, animais mais sensíveis aos efeitos do gossipol, tanto tóxico como sobre a reprodução. Contudo, isso não foi observado para os diâmetros dos túbulos onde se observou uniformidade dentro dos tratamentos em relação à distribuição dos resultados (gráfico 4), revelando que a droga, na dosagem utilizada, afetou de maneira similar a maioria dos animais de cada grupo.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados da administração do gossipol para ratas durante a gestação, e do caráter inédito de se avaliar parâmetros morfométricos testiculares em filhotes que tiveram contato com o gossipol durante a vida intrauterina, desse trabalho pode-se concluir que:

- fêmeas durante a gestação são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do gossipol que os machos;
- o gossipol não interferiu na manutenção da gestação e no número de filhotes nascidos quando administrado entre o 5º e o 20º dia de gestação;
- filhotes machos de ratas tratadas com gossipol durante a gestação apresentaram, comparados ao controle, menor diâmetro tubular e menor quantidade de túbulos seminíferos com lúmen aos 21 dias de vida;
- o gossipol é um fármaco que apresenta um elevado potencial a ser pesquisado em função de suas características biológicas, principalmente sobre a reprodução em ambos os sexos. É um campo aberto e promissor às pesquisas futuras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DONIA, M. B. Physiological Effects and Metabolism of Gossypol. **Residue Reviews**, v. 61, p. 125-160, 1976;
- ALLISON, J.M. The role of ruminal microbes in the metabolism of toxic constituents from plants. In: KEELER, R.F.; KENT, R.; VAN KAMPER, R.; LYNN, F.J. **Effects of Poisonous Plants on Livestock**. New York : Academic Press, 1978. p. 101-118;
- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMING, J.S.; SOUZA, G.A.; BONA, A. **Nutrição Animal**. Curitiba : Nobel, 1982;
- ARSHAMI, J. e RUTTLE, J.L. Effects of containing gossypol on spermatogenic tissues of young bulls. **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p. 507-516, 1988;
- BAND, V.; HOFFER, A.P.; BAND, H.; RHINEHARDT, A.E.; KNAPP, R.C.; MATLIN, S.A.; ANDERSON, D.J. Antiproliferative effect of gossypol and its isomers on human reproductive cancer cell lines. **Gynecologic Oncology**, v. 32, n. 3, p. 273-277, 1989;
- BARRAZA, M.L.; COPPOCK, C.E.; BROOKS, K.N.; WILKS, D.L.; SAUNDERS, R.G.; LATIMER, G.W. Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3457-3467, 1991;
- BAZER, F.W. Maintenance of Pregnancy. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D.; **Encyclopedia of Reproduction vol 3**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 1002-1006;
- BEAUDOIN, A.R. The embryotoxicity of gossypol. **Teratology**, v. 32, n. 2, p.251-257, 1985;
- BENDER, H.S.; CACECI, T.; MISRA, H.P. An ultrastructural study of the effects of gossypol on the endometrium of the female rat. **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, v.101, n. 2-3, p 137-144, 1988a;
- BENDER, H.S.; SAUNDERS, G.K.; MISRA, H.P. A histopathologic study of the effects of gossypol on the female rat. **Contraception**, v. 38, n. 5, p 585-592, 1988b;

- BERNDTSON, W.E. e THOMPSON, T.L. Changing relationships between testis size, sertoli cell number and spermatogenesis in sprague-dawley rats. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 5, p. 429-435, 1990;
- BIVIN, W.S. The Rat. In: MORROW, D.A.; **Current Therapy in Theriogenology 2**. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1986. 1015-1022;
- BROCAS, C.; RIVERA, R.M.; PAULA-LOPES, F.F.; McDOWELL, L.R.; CALHOUN, M.C.; STAPLES, C.R.; WILKINSON, N.S.; BONING, A.J.; CHENOWETH, P.J.; HANSEN, P.J. Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes, and embryos. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 4, p. 901-907, 1997;
- BUDAK, E. e STRAUSS, J.F. Hemochorial Placentation. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D.; **Encyclopedia of Reproduction vol 2**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 603-606;
- CARLSON, B. M., **Patten's Foundations of Embryology**. 6 ed. New York : McGraw-Hill, 1996;
- CERELLI, J.S. e JOHNSON, L. Potential daily sperm production, sertoli cell number, and seminiferous tubule characteristics in beef bulls fed coventinal or gossypol enriched diets. **Journal of Andrologia**, v. 20, n. 4, p. 519-528, 1999;
- CHASE, C.C.; ARSHAMI, J.; RUTTLE, J.L.; RANDEL, R.D.; BASTIDAS, P.; LONG, C.R. Histological characteristics of tests from brahman bulls fed diets containing gossypol. **Journal of Animal Science**, v. 68, Suppl 1, p. 14, 1990;
- CHASE, C.C.; BASTIDAS, P.; RUTTLE, J.L.; LONG, C.R.; RANDEL, R.D. Serum concentrations of testosterone in brahman bulls fed diets containing gossypol: growth and semen parameters near puberty. **Journal of Animal Science**, v. 68, Suppl 1, p. 15, 1990;
- CHASE, C.C.; BASTIDAS, P.; RUTTLE, J.L.; LONG, C.R.; RANDEL, R.D. Reproductive development and function of brahman bulls fed diets containing gossypol: growth and semen parameters near puberty. **Journal of Animal Science**, v. 67, Suppl 1, p. 368, 1989;
- CHAHOUD, I. e KWASIGROCH, T.E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D. **Methods in Prenatal Toxicology**. Stuttgart : G. Thieme Publishers, 1977. p. 78-91;

- CHALKLEY, H.W. Method quantitative morphologic analysis of tissues. **Journal of the National Cancer Institute**, p. 447-453, 1943;
- CHENOWETH, P.J.; RISCO, C.A.; LARSEN, R.E.; VELEZ, J.; CHASE, C.C.; TRAN, T.; TRENTI, F. Effects of dietary gossypol in cottonseed meal on aspects of semen quality and sperm production in young brahman bulls. **Proceedings 18th World Buiatrics Congress**, v. 2, p. 1071-1074, 1994;
- COLIN-NEGRETE, J.; KIESLING, H.E.; ROSS, T.T.; SMITH, J.F. Effects of whole cottonseed on serum constituents, fragility of erythrocyte cells, and reproduction of growing holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 11, p. 2016-2023, 1996;
- DRIFE, J.O. The effects of drugs on sperm. **Drugs**, v. 33, n. 6, p. 610-622, 1987;
- EAST, N.E.; ANDERSON M.; LOWENSTINE, L.J. Apparent gossypol induced toxicosis in adult dairy goats. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, v. 204, n. 4, p. 642-643, 1994;
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte, 1991. 185 p. Tese (Doutorado em Morfologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais;
- GOETSCH, A.L. e OWENS, F.N. The effect of commercial processing method of cottonseed meal on site and extent of digestion in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 3, p. 803-813, 1985;
- GRAY, M.L.; GREENE, L.W.; WILLIAMS, G.L. Effects of dietary gossypol consumption on metabolic homeostasis and reproduction endocrine function in beef heifers and cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 11, p. 3052-3059, 1993;
- GU, Y.; CHANG, C.J.; RIKIHISA, Y.; LIN, Y.C. Inhibitory effect of gossypol on human chorionic gonadotropin (hCG)- induced progesterone secretion in cultured bovine luteal cells. **Life Sciences**, v. 47, n. 5, p. 407-414, 1990a;
- 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, 1990b;

- 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;
- HERVE, J.C.; PLUCIENNIK, F.; BASTIDE, B.; CRONIER, L.; VERRECCHIA, F.; MALASSINE, A.; JOFFRE, M.; DELEZE, 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;
- HESS, R.A. Spermatogenesis, Overview. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D.; **Encyclopedia of Reproduction vol 4**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 539-545;
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T., MONET-KUNTZ, C., COUROT, M. Spermatogenesis an sertoli cell numbers and fuction in rams and bulls. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 34, p. 101-114, 1987;
- HOFFER,A.P.; AGARWAL, A.; MELTZER, P.; HERLIHY, P.; NAQVI, R.H.; LINDBERG, M.C.; MATLIN, S.A. Ultrastructural, fertility, and spermicidal studies with isomers and derivatives of gossypol in male hamsters. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 4, p. 909-924,1987;
- HU, Y.F.; CHANG C.J.; BRUEGGEMEIER, R.W.; LIN, Y.C. Presence of antitumor activities in the milk collected from gossypol treated dairy cows. **Cancer Letters**, v. 87, n. 1, p. 17-23, 1994;
- HUDSON, L.M.; KERR, L.A.; MASLIN, W.R. Gossypol toxicosis in a herd of beef calves. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, v. 192, n. 9, p. 1303-1305, 1988;
- JOHANSEN, R.L. e MISRA, H.P. Effects of gossypol on the drug metabolizing system in rats. **Contraception**, v. 42, n. 6, p. 683-690, 1990;
- JUENGEL, J.L.; McINTUSH, E.W.; NISWENDER, G.D. Corpus Luteum. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D.; **Encyclopedia of Reproduction vol 1**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 703-709;
- KALLA, N.R.; KAUR, S.; UJWAL, N.; MEHTA, U.; JOOS, H.; FRICK, J. Alpha-Glucosidase activity in the rat epididymis under different physiological conditions. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 92-95, 1997;

- KENNEDY, W.P.; VAN DER VEN, H.H.; STRAUS, J.W.; BHATTACHARYYA, A.K.; WALLER, D.P.; ZANEVELD, L.J.; POLAKOSKI, K.L. Gossypol inhibition of acrosin and proacrosin, and oocyte penetration by human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 4, p. 999-1009, 1983;
- LANGERLOF, R.F. e TONE, J.N. The effect of gossypol acetic acid on female reproduction. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 469-482, 1985;
- LEE, C. e HEINRICH, V.M. Selective inhibition of sperm-specific lactate dehydrogenase-X by an anti-fertility agent, gossypol. **Biochemical Pharmacology II**, v. 40, p. 718, 1981;
- LEI, H.Q. e XU, Y.X. Effects of gossypol acetic acid on the motility of rat oviduct smooth muscle. **Yao Hsueh Hsueh Pao**, v. 28, n. 1, p. 6-10, 1993;
- LEI, H.Q. e XU, Y.X.. Effects of gossypol acetic acid on transport and development of fertilized eggs in rats. **Yao Hsueh Hsueh Pao**, v. 25, n. 8, p. 561-565, 1990;
- LIANG, X.S.; ROGERS, A.J.; WEBBER, C.L.; ORMSBY, T.J.; TIRITAN, M.E.; MATLIN, S.A.; BENZ, C.C. Developing gossypol derivatives with enhanced antitumor activity. **Investigational New Drugs**, v. 13, n. 3, p. 181-186, 1995;
- LIN, Y.C.; SANBUISHO, A.; COSKUN, A.; RIKIHISA, Y. Inhibition in vitro fertilization and early embryonic development in hamsters by gossypol. **Life Sciences**, v.55, n. 14, p. 1139-1145, 1994;
- LIN, Y.C.; HU, Y.F.; CHANG, C.J.; MOH, P.P.; KULP, S.K. Transfer of 3H-gossypol to neonatal rats via milk of nursing dams. . **Life Sciences**, v. 51, n. 21, p. 1657-1665, 1992;
- LIN, Y.C.; GU, Y.; BRUEGGEMEIER, R.W.; RIKIHISA, Y. Binding of 3H-gossypol in organelles of cultured bovine luteal cells. **Life Sciences**, v. 50, n. 6, p. 443-447, 1992;
- 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;
- MANN, T. e LUTWAK-MANN, C.L. **Male Reproductive Function and Semen**. New York : Springer-verlag, 1981.

- MEDEIROS, Y.S.; COELHO, L.; CALIXTO, J.B. Gossypol affects the responsiveness of isolated rat myometrium and vas deferens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n.10, p. 1287-1290, 1989;
- MOH, P.P.; LI, P.K.; DARBY, M.V.; BRUEGGEMEIER, R.W.; LIN, Y.C. Characteristics of covalent gossypol binding to microsomal proteins. **Research Communications in Chemical Pathology Pharmacology**, v. 76, n. 3, p. 305-322, 1992;
- MONSEES, T.K.; WINTERSTEIN, U.; SCHILL, W.B.; MISKA, W. Influence of gossypol on the secretory function of cultured rat sertoli cells. **Toxicol**, v. 36, n. 5, p. 813-816, 1998;
- MOORE, G.D.; SALAZAR, A.; CARDENAS, H.; CROXATTO, H.B. Inhibition of sperm migration, fertilization and implantation in rats by precoital intrauterine administration of gossypol or nonoxynol-9. **Contraception**, v. 37, n.1, p 85-98, 1988;
- MORGAN, S.; STAIR, E.L.; MARTIN, T.; EDWARDS, W.C.; MORGAN, G.L. Clinical, clinicopathologic, pathologic, and toxicologic alterations associated with gossypol toxicosis in feeder lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 4, p. 493-499, 1988;
- NEWSON, L.D.; BRAZZEL, J.R.. Pests and their Control. In: ELLIOT, F.C. **Advances in Production and Utilization of Quality Cotton: Principles and Practices**. Iowa : Iowa State University, 1968. p.367-401;
- NORMAN, A.W. e LITWACK, G. **Hormones**. San Diego : Academic Press, 1997. p. 71;
- PAN, L.C.; NADAKAVUKAREN, M.L.; JENSEN, D.R. Effects of ingested gossypol on the ultrastructural of rat ovarian follicles. **Cell Tissue Research**, v. 250, n. 1. p. 215-220, 1987;
- PATTON, C.S.; LEGENDRE, A.M.; GOMPF, R.E.; WALKER, M.A. Heart failure caused by gossypol poisoning in two dogs. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, v. 187, n. 6, p. 625-627, 1985;
- PEPLOW Parameters of Reproduction. In: MELBY e ALTMAN. **Handbook of Laboratory Animal Science vol.1**. Cleveland : CRC Press, 1977. p. 105-116;

- PINEDA, M.H. The Biology of Sex. In: McDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1989. p. 231-260;
- PINEDA, M.H. Male Reproduction In: McDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1989. p. 261-302;
- QIAN, S.Z. e WANG, Z.G. Gossypol: a potencial antifertility agent for males. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 329-360, 1984;
- RANDEL, R. D.; CHASE, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1628-1638, 1992;
- RATSULA, K.; HAUKKAMAA, M.; WICHMANN, K.; LUUKKAINEN, T. Vaginal contraception with gossypol: a clinical study. **Contraception**, v. 27, n. 6, p. 571-576, 1983;
- RIKIHISA, Y.; LIN, Y.C.; WALTON, A. Histopathologic changes of uterus following gossypol treatment during early pregnancy in rats. **The Anatomical Record**, v. 213, n. 1, p. 72-76, 1985;
- RUSSELL, D.L. Sertoli Cells, Overview. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D. **Encyclopedia of Reproduction vol 4**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 381-386;
- RUSSELL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. **The American Journal of Anatomy**, v. 184, p. 179-189, 1989;
- SAKESENA, S.K.; SALMONSEN, R.; LAU, I.F.; CHANG, M.C. Gossypol: its toxicological and endocrinological effects in male rabbits. **Contraception**, v. 24, n. 2, p. 203-214, 1981;
- SPENCER T.E. Maternal recognition of pregnancy. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D. **Encyclopedia of Reproduction vol 3**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 1006-1015;
- STOUFFER, R.L. Corpus luteum of pregnancy. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D. **Encyclopedia of Reproduction vol 1**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 709-717;

- SWAN, M.A.; VISHWANATH, R.; WHITE, I.G.; BROWN-WOODMAN, P.D. Electron microscopic observations on the effect of gossypol on rat cauda epididymis. **Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung**, v. 104, n. 2, p. 273-286, 1990;
- TENG, C.S. Reversible changes in the content of cellular and microtubular tubulin in spermatogenic cells after gossypol treatment. **Contraception**, v. 55, p. 41-46, 1997;
- TENG, C.S. Biological activity in the repopulating rat spermatocyte after the withdrawal of gossypol treatment. V. Inhibition and recovery of microtubular dynein. **Contraception**, v. 51, p. 313-318, 1995;
- TINDALL, D.J., VITALE, R., MEANS, A.R. Androgen binding protein as a biochemical marker of formation of the blood-testis barrier. **Endocrinology**, v. 97, n. 3, p. 636-648, 1975;
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**, EPA/630/R-96/009. Washington, 1996;
- VRANOVA, J.; JEZOVA, M.; SCSUKOSA, S.; KOLENA, J. Inhibitory effect of gossypol on basal and luteinization factor-stimulated progesterone synthesis in porcine granulosa cells. **Physiological Research**, v. 48, n. 2, p. 199-228, 1999;
- 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 Animal Science**, v. 73, n. 2, p. 496-507, 1995;
- YANG, Y.Q. e WU, X.Y. Antifertility mechanisms of gossypol acetic acid in female rats. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 80, n. 2, p. 425-429, 1987;
- ZIRKLE, S.M.; LIN, Y.C.; GWAZDAUSKAS, F.C.; CANSECO, R.S. Effect of gossypol on bovine embryo development during the preimplantation period. **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p. 575-582, 1988;
- ZHANG, Y.W.; HAN, M.L.; WANG, Y.F. Estrogen and progesterone cytosol receptor concentrations in patients with endometriosis and their changes after gossypol therapy. **Chung Hua Fu Chang Ko Tsa Chih**, v. 29, n. 4, p. 220-223, 1994;

ZHENG, Y.H.; WU, Z.H.; FANG, L. Effect of gossypol acetic acid on HCG-stimulated progesterone production of dissociated rat luteal cells. **Yao Hsueh Hsueh Pao**, v. 26, n. 11, p. 805-808, 1991;