

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA**

**MECANISMOS DA INFERTILIDADE
CAUSADA POR GOSSIPOL EM RATOS E EFEITO
PROTETOR DA VITAMINA E**

Andréia Tieme de Santana

Bióloga

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA**

**MECANISMOS DA INFERTILIDADE
CAUSADA POR GOSSIPOL EM RATOS E EFEITO
PROTETOR DA VITAMINA E**

Andréia Tieme de Santana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada ao Câmpus Experimental de Dracena – Unesp, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela área de Biblioteca da UNESP - Dracena.

S232m

Santana, Andréia Tieme de.

Mecanismos da infertilidade causada por Gossipol em ratos e efeito protetor da vitamina E / Andréia Tieme de Santana. – Dracena : [s.n.], 2014.
66 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Dracena/Campus de Ilha Solteira. Dracena/Ilha Solteira, SP, 2014.
Bibliografia.

1. Bioenergética. 2. Vitamina E. 3. Fecundidade. 4. Stress oxidativo. 5. Algodão. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Mecanismos da infertilidade causada por gossipol em ratos e efeito protetor da vitamina E

AUTORA: ANDRÉIA TIEME DE SANTANA

ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIO ERMINIO MINGATTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FABIO ERMINIO MINGATTO
Coordenadoria Executiva / Unidade de Dracena


Prof. Dr. RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO
Coordenadoria de Curso de Zootecnia / Unidade de Dracena


Profa. Dra. ANDREA SANCHEZ
Campus de Três Lagoas / Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Data da realização: 11 de março de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andréia Tieme de Santana – nascida em 29 de julho de 1989, na cidade de Guaraçaí/SP - Brasil, filha de Lucy Youko Karasudani de Santana e Paulo Sérgio de Santana. Em dezembro de 2010, concluiu a graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Três Lagoas, UFMS - Brasil. Em julho de 2012 concluiu curso técnico em Química pela Fundec/CEP-UME - Dracena – SP. Em março de 2012, iniciou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa Interunidades do Câmpus Experimental de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica” sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, responsável pelas disciplinas de Bioquímica Animal e Química Geral e Orgânica nos cursos de graduação em Zootecnia e Engenharia Agrônoma da UNESP, Campus de Dracena, como bolsista FAPESP, submetendo-se a banca em 11 de maio de 2014.

“A qualidade nunca é um acidente, é sempre o resultado da intenção elevada, esforço sincero, direção inteligente e execução hábil. Ela representa a sábia escolha de muitas alternativas”.

Abigail Van Buren

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes em minha vida, aos meus pais Lucy e Paulo e ao meu Irmão André Luiz pelo apoio incondicional, paciência, por me incentivar quando foi preciso e por sempre acreditar em mim.

Com Amor, dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que eu alcance meus objetivos, por me guiar e dar forças nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha Família, em especial aos meus pais Lucy e Paulo e meu irmão André que são a razão por eu estar onde estou hoje, pelo apoio incondicional, confiança, carinho, amizade, amor, por nunca medirem esforços para proporcionar a mim uma ótima formação, aos quais eu dedico a minha vida.

Ao meu querido Prof. Fábio Erminio Mingatto pela incrível orientação, apoio, paciência, dedicação, compreensão, pela confiança depositada e, sobretudo por ter sempre acreditado em mim. Obrigada por contribuir para meu crescimento profissional e, especialmente pela atenção, carinho e amizade. A você professor, minha imensa e eterna gratidão.

Às minhas amigas e amigos de Guaraçaí pelo apoio, compreensão, amizade, carinho, paciência, confiança e, sobretudo pelo companheirismo.

A todos meus amigos da Pós - Graduação, em especial a equipe LaBMet, principalmente à Marieli, Hyllana, Marco Aurelio, Paulo e Marcos Antonio por toda ajuda e companheirismo durante nossas semanas dentro do laboratório e nossos fins de semana de tratamento. Além de todos esses quero agradecer especialmente a uma amiga que se fez essencial nestes dois anos pra mim Melina Rebonatti obrigada pelo carinho e pela amizade sincera.

Aos meus amigos de viagem, Patrícia, Mariana, José Antonio, João Paulo, Janaine, pelo companheirismo, diversão, amizade e ajuda financeira, pois sem vocês minhas idas e vindas não teriam graça.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro, número dos processos (2012/22684-6 e 2012/ 08668-8).

A todos os professores do programa pela oportunidade a mim oferecida para a realização do curso de mestrado, assim como pela contribuição para meu crescimento acadêmico.

Aos técnicos de Laboratório da Unesp - Câmpus Experimental de Dracena, Edison, Marcelo e Wanderson, pelo auxílio nas análises.

Aos membros da minha banca de qualificação e defesa, Flávia Thomaz Verechia Pereira, Ricardo Velludo Gomes de Soutello e Andréa Sanches, pelas considerações valiosas dadas durante a discussão dos meus dados.

Meu muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de abreviaturas	vi
Lista de Tabelas e Figuras	viii
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	04
2.1. Farelo de Algodão	04
2.2. Gossipol	04
2.2.1 Gossipol na reprodução	06
2.2.2 Gossipol e mitocôndrias	07
2.3. Estresse Oxidativo e a Infertilidade	09
2.4. Mecanismos de proteção antioxidantes	11
2.5. Vitamina E na terapia antioxidante	12
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivo específico	15
4. Material e métodos	16
4.1. Animais	16
4.2. Tratamento	16
4.3. Reagentes	17
4.4. Avaliação de ética	17
4.5. Testes de fertilidade	17
4.5.1. Contagem de espermatozoides	18
4.5.2. Número e peso dos filhotes	19
4.6. Experimentos em homogenato de testículo	21
4.6.1. Preparação do homogenato de testículo	21
4.6.2. Atividade da enzima glutathiona redutase (GR)	22
4.6.3. Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)	22
4.6.4. Concentração de glutathiona reduzida (GSH)	24
4.6.5. Concentração de glutathiona oxidada (GSSG)	25

4.6.6. Estado oxidativo de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	27
4.6.7. Oxidação de grupos tióis de proteínas	28
4.6.8. Peroxidação dos lipídeos de membrana	29
4.7. Análises realizadas em mitocôndrias isoladas de testículo.....	30
4.7.1. Isolamento mitocondrial.....	30
4.7.2. Respiração Mitocondrial.....	31
4.7.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial	32
4.7.4. Síntese de ATP	33
4.8. Forma de análise dos resultados	35
5. Resultados	36
5.1. Testes de fertilidade.....	36
5.1.1. Contagem de espermatozoides	36
5.1.2. Número e peso dos filhotes	37
5.2. Experimentos em homogenato de testículo	38
5.2.1. Atividade da enzima Glutathione Redutase (GR)	38
5.2.2. Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)	39
5.2.3. Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	40
5.2.4. Concentração de Glutathione Oxidada (GSSG)	41
5.2.5. Estado oxidativo de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	42
5.2.6. Oxidação de grupos tióis de proteínas	43
5.2.7. Peroxidação dos lipídeos de membrana	44
5.3. Análises realizadas em mitocôndrias isoladas de testículo.....	45
5.3.1. Respiração Mitocondrial.....	45
5.3.2. Determinação do potencial de membrana mitocondrial	46
5.3.3. Síntese de ATP	47
6. Discussão	48
7. Conclusão	54
8. Referências	55



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus Experimental de Dracena

Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA)

Certificado

Certificamos que o Projeto intitulado "**Mecanismos de infertilidade causada por gossipol em ratos**", protocolo nº 19/2012, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Curso de Zootecnia da UNESP de Dracena e foi aprovado pela referida Comissão. Este Certificado tem validade até 13/04/2013.

Dracena, 16 de abril de 2012.



Prof.ª Dra. Sirlei Aparecida Maestá
Presidente da CEUA - UNESP Dracena

Seção Técnica de Apoio Acadêmico
Rod. Cmta. João Ribeiro de Barros, km 651 Bairro das Antas CEP 17900-000 Dracena São Paulo Brasil
Tel. (18) 3821-8200 Fax, (18) 3821-6206 - academico@dracena.unesp.br

MECANISMOS DA INFERTILIDADE CAUSADA POR GOSSIPOL EM RATOS E EFEITO PROTETOR DA VITAMINA E

RESUMO - O gossipol é uma substância tóxica presente na semente de algodão (*Gossypium* sp). Para a análise dos mecanismos envolvidos na infertilidade causada em ratos pelo gossipol foram avaliados os seus efeitos sobre o sistema antioxidante e a bioenergética mitocondrial de testículos, além da atividade protetora da vitamina E. Testes de fertilidade foram realizados, analisando a produção de espermatozoides epididimais e o número e peso de filhotes após cruzamentos. No homogenato de testículos foram avaliadas a atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), concentração de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) e grupos tióis de proteínas, além da peroxidação dos lipídios de membrana. Nas mitocôndrias isoladas dos testículos foram realizadas as análises de respiração mitocondrial, potencial de membrana e síntese de ATP. O tratamento com gossipol diminuiu significativamente o número de espermatozoides e o número de fetos e a vitamina E apresentou efeito protetor sobre estes parâmetros. O gossipol provocou um aumento significativo na atividade das enzimas GPx e GR, porém a vitamina E não reduziu a atividade enzimática. A concentração de GSH e o estado oxidativo do NAD(P)H no homogenato de testículo foram significativamente reduzidos pelo gossipol e essa redução foi acompanhada pelo aumento da concentração de GSSG. A vitamina E apresentou efeito protetor sobre as alterações destas substâncias. Não foi observado efeito do gossipol sobre os grupos tióis de proteína. O gossipol aumentou significativamente a concentração de malondialdeído, indicador de lipoperoxidação, enquanto que o tratamento com a vitamina E inibiu a ação do gossipol. O gossipol atuou como desacoplador da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, dissipou o potencial de membrana e diminuiu os níveis de ATP. Os resultados sugerem que a infertilidade causada pelo gossipol em ratos pode estar relacionada ao estresse oxidativo e aos danos na bioenergética mitocondrial e que o tratamento com a vitamina E pode proteger os animais.

Palavras-chave: bioenergética, estresse oxidativo, fertilidade, gossipol, vitamina E

MECHANISMS OF INFERTILITY CAUSED BY GOSSYPOL IN RATS AND PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN E

ABSTRACT - Gossypol is a toxic substance present in cottonseed (*Gossypium* sp.) To analyze the mechanisms involved in infertility caused by gossypol in rats were evaluated its effects on the antioxidant system and mitochondrial bioenergetics of testicles, beyond the protective activity of vitamin E. Fertility tests were performed, analyzing the production of epididymal sperm and number and weight of the offspring after breeding. In the testis homogenate were evaluated the activity of the enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), the concentration of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, oxidative state of pyridine nucleotides (NAD(P)H) and thiol groups of proteins, and membrane lipid peroxidation. In mitochondria isolated from testes analyzes of mitochondrial respiration, membrane potential and ATP synthesis were performed. Treatment with gossypol significantly decreased sperm count and the number of offspring and vitamin E showed a protective effect on these parameters. Gossypol caused a significant increase in the activity of GPx and GR enzymes, but vitamin E did not reduced the enzyme activity. The concentration of GSH and oxidative state of NAD(P)H in the testis homogenate were significantly reduced by gossypol and this reduction was accompanied by an increase in the concentration of GSSG. Vitamin E showed a protective effect on the changes of these substances. No effect of gossypol was observed on the thiol groups of protein. Gossypol significantly increased the malondialdehyde, an indicator of lipid peroxidation, whereas treatment with vitamin E inhibited the action of the gossypol. Gossypol uncoupled the respiratory chain and oxidative phosphorylation, dissipated the membrane potential and decreased the mitochondrial ATP levels. The results suggest that infertility caused by gossypol in rats may be related to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics damage and that treatment with vitamin E can protect animals.

Keywords: bioenergetics, oxidative stress, fertility, gossypol, vitamin E

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial interna
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
EGTA	Acido etilenoglicol bis-(β -aminoetil éter) N,N,N',N' tetracético
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FADH_2	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
g	Força gravitacional
g	Grama
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H^+	Íon hidrogênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 2 [4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MDA	Malondialdeído
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
nM	Nanomolar
OPT	o-ftalaldeído
O_2	Oxigênio molecular

OH[•]	Radical hidroxila
O₂[•]	Radical superóxido
pH	Potencial hidrogênionico
s	Segundos
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Páginas
Tabela 1. Efeito do gossipol e da vitamina E na fertilidade de ratos machos e no peso dos filhotes	37
Figura 1. Caroço de algodão com sementes que contêm o gossipol (A). Estrutura molecular do Gossipol (B).	05
Figura 2. Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial acoplada a síntese de ATP.....	08
Figura 3. Reação de Fenton	11
Figura 4. Ação da enzima catalase	11
Figura 5. Sistema antioxidante enzimático	12
Figura 6. Representação esquemática do processo cirúrgico envolvido no isolamento de testículo e cauda do epidídimo.....	18
Figura 7. Esquema simplificado da contagem de espermatozoides.....	19
Figura 8. Ninhada de uma das ratas fecundadas (A). Contagem dos descendentes de cada grupo (B).....	20
Figura 9. Filhotes recém-nascidos (A). Pesagem dos descendentes de cada grupo (B).	21
Figura 10. Representação do processo de homogeneização dos testículos.....	22

Figura 11. Aparelho Espectrofotômetro utilizado neste estudo.	23
Figura 12. Interface do sistema operacional do espectrofotômetro no modo cinético (Kinetics/Time)	24
Figura 13. Aparelho Espectrofluorímetro utilizado neste estudo	25
Figura 14. Interface do software utilizado para monitoramento das concentrações de GSH e GSSG	26
Figura 15. Curva padrão para determinação das concentrações de GSH e GSSG.....	27
Figura 16. Interface do software utilizado para determinação do estado oxidativo do NAD(P)H.	28
Figura 17. Interface do sistema operacional do espectrofotômetro no modo de leitura fixa (Fixed Wavelength).....	29
Figura 18. Interface do sistema operacional do espectrofotômetro no modo de leitura fixa (Fixed Wavelength) onde as leituras são instantâneas	30
Figura 19. Isolamento de Mitocôndrias.....	31
Figura 20. Representação esquemática (A) e foto (B) do oxímetro	32
Figura 21. Interface do sistema operacional do software do espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC (Tokyo, Japan).....	33
Figura 22. Aparelho Luminômetro	34

Figura 23. Efeito do gossipol sobre a produção de espermatozoides e ação protetora da vitamina E.	36
Figura 24. Efeito do gossipol sobre a atividade da enzima Glutathione Redutase (GR) no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E.....	38
Figura 25. Efeito do gossipol sobre a atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E	39
Figura 26. Efeito do gossipol sobre a oxidação de GSH no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E	40
Figura 27. Efeito do gossipol sobre a concentração de GSSG no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E	41
Figura 28. Efeito do gossipol sobre o estado oxidativo de NAD(P)H no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E.	42
Figura 29. Efeito do gossipol sobre a oxidação de grupos tióis de proteína no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E.....	43
Figura 30. Efeito do gossipol sobre a concentração de MDA no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E.	44
Figura 31. Efeito do gossipol sobre o estado 2 da respiração em mitocôndrias isoladas de testículos de rato e ação protetora da vitamina E	45
Figura 32. Efeito do gossipol sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) em mitocôndrias isoladas de testículos de rato e ação protetora da vitamina E.	46
Figura 33. Efeito do gossipol sobre os níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de testículos de rato e ação protetora da vitamina E.	47

1. INTRODUÇÃO

Atualmente nutrição animal possui papel relevante nos sistemas de produção, pois visa melhorar o aproveitamento dos alimentos, gerando menor excreção de nutrientes, possibilitando maior lucro com a atividade (MARCATO; LIMA, 2005). As crises econômicas nos últimos anos têm levado os produtores a procurarem alternativas nutricionais para diminuição dos custos com a criação. Uma das formas empregadas é a substituição de ingredientes tradicionais das rações, como o milho e farelo de soja, por alimentos alternativos como o farelo de algodão (MELLO et al 2012).

O farelo de algodão é o resíduo da obtenção do óleo, que pode ser obtido tanto pelo esmagamento mecânico do caroço como por meio do uso de solventes. (IEA, 1994). Ele representa mundialmente a segunda mais importante fonte ou suplemento proteico disponível para a alimentação animal, ultrapassada apenas pela soja, sendo uma excelente fonte de proteína vegetal. (RICHETTI; MELO FILHO, 2001; FAO, 2007). Além de estar amplamente disponível, possui custo por unidade de proteína inferior aos demais, é mais palatável e possui bom perfil de aminoácidos o que permite a substituição de alimentos volumosos e concentrados sem prejudicar a fermentação ruminal (BARROS et al., 2011). A substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão não influencia o desempenho de animais de produção (ALVES et al., 2010).

O aumento da produção de algodão aliado à melhoria dos métodos de processamento do farelo, à disponibilidade, ao custo e ao valor nutricional: 32,1%PB, 89,6%MS, 1,96%EE, 36,7%FDN, 31,2%FDA e 69,7%NDT demonstram que o farelo de algodão é uma ótima fonte para produção de várias classes animais (VALADARES FILHO, 2006). Embora o farelo de algodão seja uma alternativa para baratear custos ele possui como fator antinutricional o gossipol (Figura 1), um composto polifenólico existente nas glândulas produtoras de pigmentos da semente. Essa substância diminui as taxas de fertilidade em espécies ruminantes e não ruminantes que ingerem esse subproduto em concentrações elevadas ou por muito tempo, pois o efeito do mesmo é cumulativo, podendo também reduzir a capacidade

carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares (ABOU-DONIA et al., 1970; ALFORD et al., 1996; ZHANG et al., 2007).

Estudos têm mostrado que o gossipol é um composto altamente reativo, que se liga rapidamente a diferentes substâncias, incluindo minerais e aminoácidos. Dentre os minerais aos quais ocorre a ligação, o principal é o ferro, dando origem ao complexo gossipol-ferro. Como o ferro presente neste complexo não pode ser utilizado desenvolve-se uma deficiência deste metal, afetando principalmente a eritropoiese, podendo produzir anemia. Ao combinar-se com proteínas e aminoácidos, indisponibiliza-os, causando anormalidades nas organelas celulares, interferindo nos processos bioquímicos e inibindo a atividade de várias enzimas (BUTOLO, 2002; SOTO-BLANCO, 2008).

Alguns sinais de toxicidade do gossipol foram relacionados a uma diminuição das concentrações de antioxidantes e aumento na formação pró-oxidantes, já que ele pode interagir com membranas biológicas promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio, e ainda, em altas doses, reduz a atividade de sistemas enzimáticos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e desconecta os processos de respiração e fosforilação oxidativa tendo efeito desacoplador (KOVACIC, 2003).

Efeitos deletérios do gossipol sobre a fertilidade vêm sendo registrados na literatura. Entre os aspectos negativos observados em várias espécies, encontram-se a diminuição da motilidade e do número de espermatozoides. Estes problemas reprodutivos são consequência da degeneração do tecido testicular, que implica em diminuição do número de espermatozoides que atingiriam maturação e aumento da porcentagem de espermatozoides anormais, além de danos no epitélio germinativo, acarretando diminuição no processo de espermatogênese (RANDEL; CHASE; WYSE, 1992; EFSA 2008).

Ainda em reprodutores, pode haver redução da libido, que está relacionada à redução dos níveis de testosterona, hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante. Consumindo dietas com presença de gossipol, os reprodutores podem ainda tornar-se estéreis, no entanto, esse efeito pode ou não ser reversível com a interrupção da dieta, variando de acordo com o tempo de ingestão desta substância (EL-SHARAKY et al., 2010).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel presente nas membranas biológicas, que apresenta papel antioxidante e pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres. Ela contém um grupo hidroxila através do qual ela rege com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir esses radicais, além de ter demonstrado aumentar a concentração espermática no ejaculado (KODAMA et al., 1997; DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos do gossipol sobre a fertilidade em ratos, incluindo avaliação de danos oxidativos causados no homogenato e na bioenergética de mitocôndrias isoladas dos testículos, além de analisar a ação da vitamina E na inibição dos efeitos tóxicos desta substância.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Farelo de Algodão

A nutrição animal possui papel relevante nos sistemas de produção, pois visa melhorar o aproveitamento dos alimentos, gerando menor excreção de nutrientes, possibilitando maior lucro com a atividade (MARCATO; LIMA, 2005). As crises econômicas nos últimos anos têm levado os produtores a procurarem alternativas nutricionais para diminuição dos custos com a criação. Uma das formas empregadas é a substituição de ingredientes tradicionais das rações, como o milho e farelo de soja, por alimentos alternativos como o farelo de algodão (MELLO et al 2012).

A produção brasileira de algodão (*Gossypium* sp) vem se apresentando crescente com o passar dos anos, tendo sido utilizado como matéria-prima na indústria têxtil e em alguns estados é cultivado para produção de fibra e óleo. Fornece inúmeros subprodutos, entre eles torta e farelo, ricos em proteína de boa qualidade e bastante utilizados no preparo de rações. O farelo de algodão representa mundialmente a segunda mais importante fonte ou suplemento proteico disponível para a alimentação animal, ultrapassada apenas pela soja (RICHETTI; MELO FILHO, 2001).

Os farelos em geral, como fontes proteicas, apresentam teores de proteína bruta (PB) de 34,3 a 48,9% e, como fonte de energia, teores de energia digestível (ED) de 3,22 a 3,44 Mcal/kg. Como fontes de macrominerais, ressaltam-se os teores de fósforo (P) acima de 1% nos farelos, de cálcio (Ca), que chegam a 0,24% nos farelos e caroços, e de enxofre (S), atingindo 0,43% no farelo proveniente da extração mecânica do óleo (RANGEL; LIMA JÚNIOR, 2010). Esses dados demonstram que o farelo de algodão é uma ótima fonte para produção de alimentos para várias classes animais, contudo, ele apresenta um fator antinutricional, o gossipol, que tem sido relatado como uma potente toxina, capaz de causar danos irreversíveis nos animais de produção (SOTO-BLANCO, 2008).

2.2. Gossipol

O gossipol, um composto polifenólico amarelo ($C_{30}H_{30}O_8$) (Figura 1), naturalmente presente nas plantas de algodão (*Gossypium* sp.), especialmente em suas glândulas produtoras de pigmento (corpos ovo esferoidal com diâmetros entre 100 e 400 μ m). As glândulas representam em geral 2,4 a 4,8% do miolo da semente e o gossipol representa 20,6 a 39% da massa das glândulas, enquanto outros pigmentos contam apenas 2% (SINGLETON, 1973). É uma toxina natural que combate pragas e insetos. Por ser um fator antinutricional, essa substância é a principal limitação para o uso do farelo de algodão na nutrição animal, pois tem diminuído as taxas de fertilidade em animais que ingerem esse subproduto em concentrações elevadas ou por muito tempo, já que o efeito do mesmo é cumulativo (ABOU-DONIA et al., 1970; LIMA JUNIOR et al. 2010).

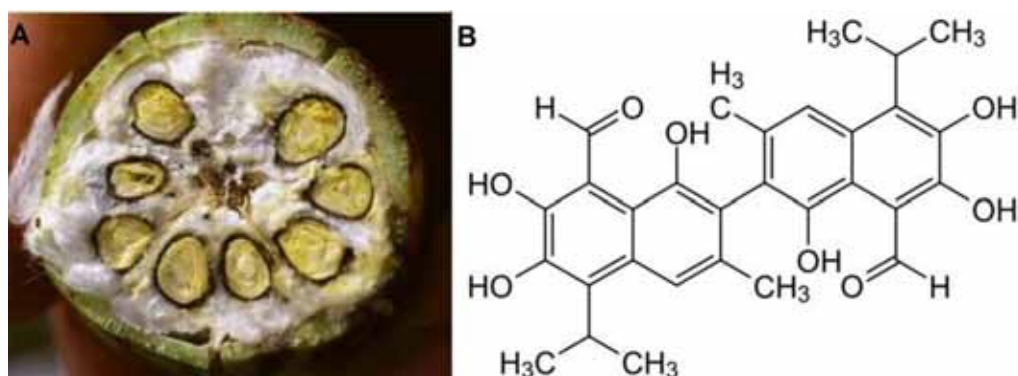


Figura 1. Caroço de algodão com sementes que contêm o gossipol (A), disponível em: <<http://mycottonfield.pl/?p=199>>. Estrutura molecular do Gossipol (B), disponível em: <<http://de.wikipedia.org/wiki/Gossypol>>.

Apresenta toxicidade para espécies não ruminantes e ruminantes, sendo maior para não ruminantes, ou seja, em monogástricos como aves e suínos. Como seu efeito é cumulativo, os efeitos toxicológicos são apresentados após um período variável de ingestão, podendo reduzir a capacidade carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares (ZHANG et al., 2007).

Estudos têm mostrado que o gossipol ao se ligar com o ferro, da origem ao complexo gossipol-ferro. Como o ferro presente neste complexo não é utilizado desenvolve-se uma deficiência neste metal, afetando principalmente a eritropoiese, podendo produzir anemia (SOTO-BLANCO, 2008). Essa característica do gossipol de formar complexos estáveis com vários metais divalentes e trivalentes, principalmente com o ferro é especialmente importante por possuir aplicação tecnológica. A adição de sais de ferro em rações animais contendo farelo de algodão reduz a toxicidade do gossipol. Esse fato pode ser explicado pela redução da solubilidade do gossipol com a formação do complexo (PRZYBYLSKI, 2001).

O gossipol também se combina com proteínas e aminoácidos, indisponibilizando-os e causando anormalidades nas organelas celulares, pois interfere nos processos bioquímicos e inibe a atividade de várias enzimas (BUTOLO, 2002). Os achados patológicos em animais intoxicados incluem edema pulmonar e abomasal, presença de líquido amarelado nas cavidades torácica e peritoneal, fígado com aspecto denominado noz-moscada e fibras cardíacas degeneradas e hipertróficas (SOTO-BLANCO, 2008).

O gossipol pode interagir com membranas biológicas, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio. Alguns sinais de toxicidade foram relacionados com a formação de ERO (espécie reativa de oxigênio) e uma diminuição das concentrações de antioxidantes, já que em altas doses, estudos relataram que o gossipol reduz a atividade de sistemas enzimáticos e na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial desconecta os processos de respiração e fosforilação oxidativa tendo efeito desacoplador (KOVACIC, 2003).

Para aumentar o uso de subprodutos de algodão em rações animais, principalmente o farelo, a toxicidade do gossipol imposta em eventos nutricionais e reprodutivos tem sido extensivamente estudada e relatada e medidas preventivas têm sido procuradas (VELASQUEZ-PEREIRA et al., 2002).

2.2.1 Gossipol na reprodução

Na década de 1950, houve uma drástica redução na taxa de natalidade humana em diversas áreas rurais da China. Naquela ocasião, foi descoberto haver

infertilidade masculina relacionada ao uso do óleo de algodão bruto, rico em gossipol, para preparo de seus alimentos (LIU et al., 1985; SOTO-BLANCO, 2008).

Efeitos deletérios do gossipol sobre a fertilidade têm sido registrados na literatura. Entre os aspectos negativos observados em várias espécies, encontram-se a diminuição da motilidade e do número de espermatozoides. Estes problemas reprodutivos são consequência da degeneração do tecido testicular, que implica em diminuição do número de espermatozoides que atingiriam maturação e aumento da porcentagem de espermatozoides anormais, além de danos no epitélio germinativo, acarretando diminuição no processo de espermatogênese (RANDEL; CHASE; WYSE, 1992; EFSA, 2008). Em reprodutores, pode haver redução da libido, que está relacionada à redução dos níveis de testosterona, hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante (EL-SHARAKY et al., 2010).

A intensidade de seu efeito tóxico varia de acordo com o nível e período de consumo, a idade do animal e das condições de estresse desse animal (GAMBOA et al., 2001). Todavia, aspectos patológicos derivados da administração de alimentos com gossipol em ruminantes são raros. Isto pode derivar da capacidade de ligação do gossipol com as proteínas solúveis do rúmen. Apesar do efeito tóxico reduzido na nutrição de ruminantes, o gossipol é responsável pela diminuição da eficiência reprodutiva do rebanho. Machos, principalmente, são afetados por esse fator antinutricional de forma mais prevalente que fêmeas, ocasionando diminuição da qualidade espermática e degeneração testicular (LIMA JUNIOR et al., 2010).

Em trabalho realizado com ratos machos, El-Sharaky et al., 2010 utilizaram doses de 5, 10 e 20 mg de gossipol/kg de peso corporal durante duas semanas e observaram uma diminuição significativa na contagem e na motilidade dos espermatozoides, além de danos nas células de Sertoli e degeneração dos túbulos seminíferos, sendo que as doses de 10 e 20 mg/kg de peso corporal foram as mais prejudiciais.

2.2.2 Gossipol e mitocôndrias

Mitocôndrias são organelas responsáveis pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, por meio da

fosforilação oxidativa, a qual é o estágio final do metabolismo produtor de energia nos organismos aeróbicos. A produção do ATP pelas mitocôndrias ocorre através do acoplamento do funcionamento cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa (Figura 2). A fosforilação oxidativa é um processo que envolve fluxo de elétrons doados por substratos oxidáveis como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH_2), por uma cadeia de transportadores ligados à membrana mitocondrial interna, denominada cadeia respiratória (Complexos I a IV). Os elétrons são transferidos ao O_2 , reduzindo-o a H_2O , processo denominado de respiração mitocondrial. Este fluxo de elétrons também fornece energia livre, que está acoplada ao transporte de prótons para o espaço intermembranas. O fluxo dos prótons transmembrana fornece energia livre para a síntese do ATP, que é catalisada pela ATP sintase (NELSON e COX, 2002).

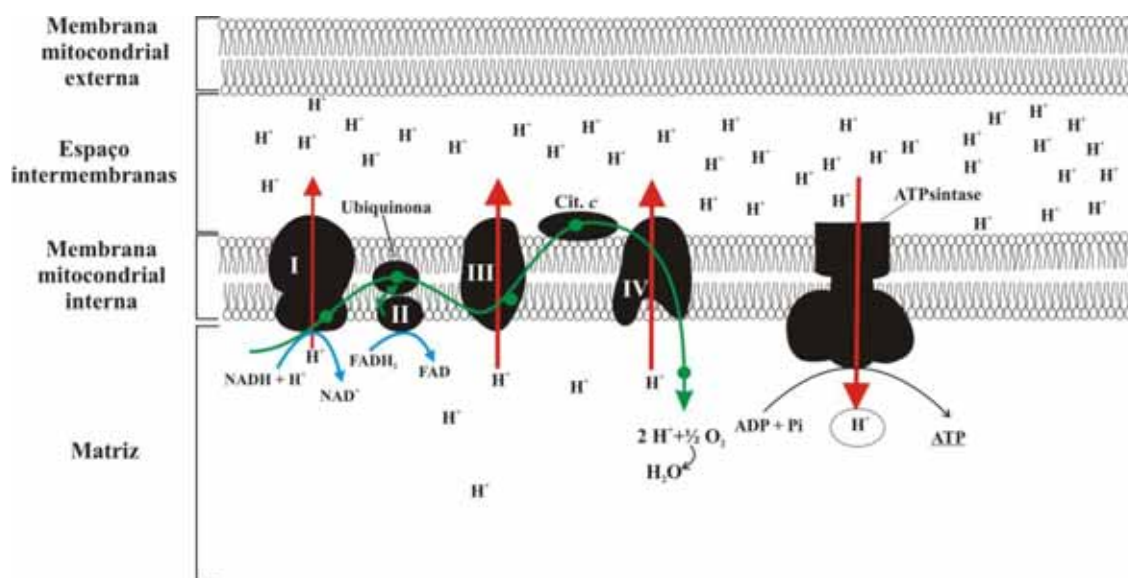


Figura 2. Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial acoplada a síntese de ATP. Fonte: Maioli et al., 2011.

Como mencionado anteriormente, a produção de ATP via fosforilação oxidativa é dependente do acoplamento existente entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, e inúmeras substâncias denominadas, de maneira geral como inibidores e desacopladores diminuem ou impedem a fosforilação do ADP realizada pela ATP sintase. Os desacopladores são substâncias hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna transportando prótons

provenientes do espaço intermembranas até à matriz mitocondrial. Dessa maneira, impedem a formação do gradiente de prótons com dissipação da energia, na forma de calor, que seria empregada na síntese de ATP. O transporte dos elétrons na cadeia torna-se energeticamente mais favorável (pela falta de transporte de prótons contra este gradiente) e sua velocidade aumenta, elevando a velocidade de consumo de oxigênio (MARZZOCO; TORRES, 2007). Relatos da literatura realizados com mitocôndrias isoladas de fígado de rato *in vitro* demonstraram que o gossipol apresenta efeito desacoplador da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (ABOU-DONIA e DIECKERT, 1974; MARTINEZ et al., 1988, MARTINEZ, 1992, MARTINEZ et al., 1993). Em estudos também realizados *in vitro* por Santana et al., 2012 demonstraram que o gossipol tem efeito desacoplador em mitocôndrias isoladas de testículo de ratos, dissipando o potencial de membrana e inibindo a síntese de ATP.

Além de apresentar efeito desacoplador, o gossipol também promove a inibição da respiração mitocondrial em doses elevadas (TSO; LEE; TSO, 1982; KIM; WALLER, 1984).

A ação deletéria do gossipol sobre os espermatozoides pode ocorrer devido ao bloqueio na produção, liberação e utilização do ATP nestas células (UENO et al., 1988). Ainda, espermatozoides anormais são formados nos animais expostos ao gossipol em decorrência de anormalidades nas mitocôndrias (ROMUALDO e KLINEFELTER, 2002).

2.3. Estresse oxidativo e a infertilidade

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o grau de proteção dos mecanismos antioxidantes (ONG; SHAN; CHIA, 2002).

Entre os radicais livres, estão as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as mais importantes o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre essas, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ERO formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado por meio

da dismutação (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A mitocôndria é o principal local de produção das ERO (BARJA, 2007). Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa, o que implica cinco complexos enzimáticos. Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações REDOX (reduções oxidativas), tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é, então, convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP na ATP sintase. Porém, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio consumido pela mitocôndria, é convertida em superóxido, em vez de água (BLIER et al., 2001; DOWNLING; SIMMONS, 2009).

O estresse oxidativo é considerado como uma das causas mais frequentes da disfunção espermática, além de ser um dos principais fatores associados à perda na fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento, principalmente quando utilizadas técnicas que necessitam da retirada do plasma seminal (BALL et al., 2001; CALAMERA et al., 2001; WATSON, 2000; AITKEN; BAKER, 2006).

O espermatozoide é um organismo aeróbio, sendo o oxigênio um elemento essencial para a manutenção de suas funções. Porém, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, o que ocorre, por exemplo, quando da elevada elaboração de ERO. Os danos provocados pelo excesso de ERO afetam a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozoide (IRVINE et al., 2000; VALENÇA; GUERRA, 2007).

Assim, a exposição de espermatozoides às espécies reativas de oxigênio induz a uma perda de motilidade que está diretamente relacionada com o nível de peroxidação lipídica enfrentada pelos mesmos. Similarmente a perda de motilidade observada quando os espermatozoides são submetidos a uma noite de incubação é

altamente correlacionada com o status da peroxidação lipídica dos espermatozoides no final do período de incubação (GOMEZ et al. 1998).

Estudos verificaram que o espermatozóide é particularmente susceptível ao ataque das ERO. Acredita-se que tal fato, deve-se à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

2.4. Mecanismos de proteção antioxidante

O organismo desenvolveu mecanismos para proteger-se do processo oxidativo e as substâncias que participam destes processos receberam o nome de antioxidantes. Dentre as substâncias classificadas como agentes antioxidantes estão vitaminas, minerais e enzimas, estes podem restabelecer o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo, mantendo assim a integridade das membranas celulares e prevenindo o dano oxidativo ao DNA (WOUNG et al., 2000).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), de modo que o organismo mantém as concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro dos limites fisiológicos (DANDEKAR et al., 2002).

Uma vez que as mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{\cdot -}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase (SOD) que o converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical $OH^{\cdot}$ em seu interior (reação de Fenton, Figura 3), (BARREIROS, 2006).

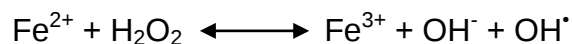


Figura 3. Reação de Fenton.(Barreiros 2006)

A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 citosólico, promovendo a sua catálise até água (Figura 4).

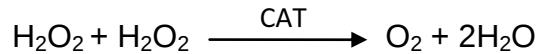


Figura 4. Ação da enzima catalase (RIBEIRO et al., 2005).

Nas mitocôndrias, o H_2O_2 é convertido a H_2O pela glutathiona reduzida (GSH) por ação da glutathiona peroxidase. A manutenção de níveis adequados de GSH é feita à custa da atividade da glutathiona redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH, o qual é produzido pela Via das Pentoses ou por meio de transidrogenases (RIBEIRO et al., 2005) (Figura 5).

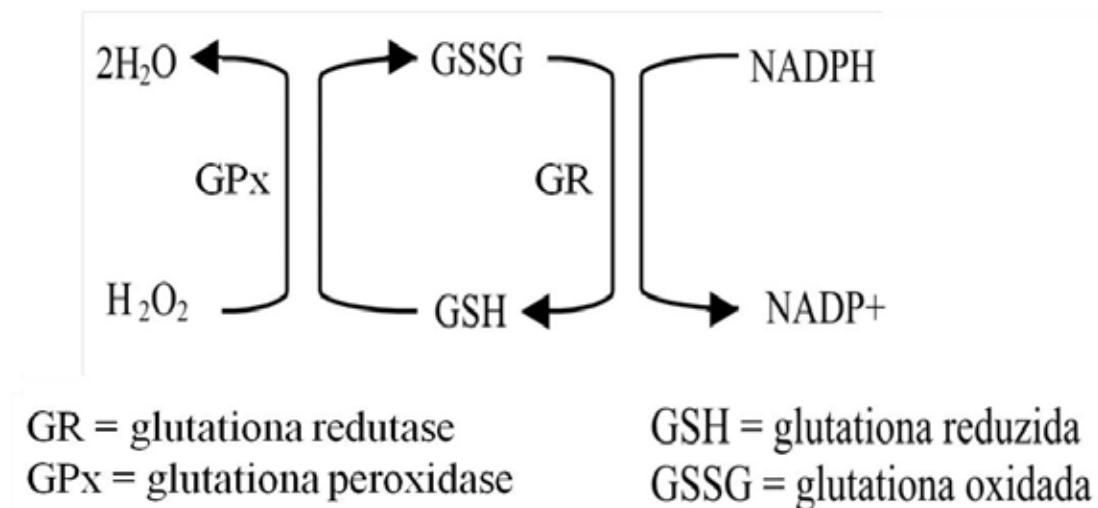


Figura 5. Sistema antioxidante enzimático (Ribeiro, 2005).

O sistema de proteção antioxidante não enzimático é composto basicamente pelas vitaminas E (tocoferol) e C (ascorbato), que são capazes de reparar os radicais livres e assim impedir a cascata oxidativa (BUETTNER, 1993).

As vitaminas E e C atuam conjuntamente na proteção das membranas lipídicas contra o dano oxidativo, sendo que a vitamina E oxida-se e interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (HSU et al. 1998). A vitamina C transfere as ERO da fase aquosa para a cadeia transportadora de elétrons e assim inibe a peroxidação lipídica, além de reciclar a vitamina E oxidada, tornando-a novamente ativa (HSU et al., 1998).

2.5. Vitamina E na terapia antioxidante

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel presente nas membranas biológicas. Ela contém um grupo hidroxila através do qual rege com elétrons desemparelhados, podendo assim reduzir radicais peroxil (DONNELLY et al. 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Com o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva, são utilizados alguns antioxidantes, entre eles as vitaminas A, C e E. Em homens oligospermicos, a administração de vitaminas C e E (200 mg) por um período de dois meses aumentou a concentração espermática no ejaculado (TARÍN, J.J. et al. 1998; KODAMA et al., 1997).

Durante o processo de maturação o espermatozóide perde citoplasma, perdendo assim parte dos mecanismos endógenos de reparo e as defesas enzimáticas, que são observadas nos outros tipos celulares. Contudo, ele é protegido do ataque oxidativo pelo plasma seminal que contem enzimas e moléculas antioxidantes, como as vitaminas E e C, superóxido dismutase e a catalase (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999).

A vitamina E é o principal antioxidante da membrana das células (THEROND et al., 1996), e atua nos ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e nas partículas sub-celulares, evitando suas oxidações. Estabiliza a fração lipídica, impedindo a formação de lipoperóxidos, além de aumentar a resistência das células ao peróxido de hidrogênio e ter a capacidade de destruição dos peróxidos livres formados (*apud* MACHILIN, 1984; COMBS, 1992, DROGE, 2002).

A vitamina E consegue estabilizar os radicais livres recém-formados, pela formação do radical tocoferoxil, porém não é capaz de reverter os danos ocorridos em função da oxidação. Utilizando quimiluminescência como indicador, constatou-se correlação positiva entre a concentração de radicais livres e a morte precoce dos espermatozoides *in vitro*, perda da habilidade de penetração no oócito e baixa tolerância à centrifugação (AIKTEN et al., 1989).

Estudos realizados por Rodenas et al. (2004) demonstraram que rações suplementadas por óleos e vitamina E aumentaram a qualidade seminal, motilidade espermática e a concentração de espermatozoides no ejaculado.

A capacidade dos antioxidantes tais como alfatocoferol para resgatar a mobilidade do esperma *in vivo* e *in vitro* é mais uma prova de que a peroxidação lipídica é uma das principais causas de perda de mobilidade em populações de espermatozóide (SULEIMAN et al. 1996).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Estudar os mecanismos de ação do gossipol sobre a fertilidade incluindo avaliação de danos causados no homogenato e nas mitocôndrias isoladas dos testículos de ratos, além de analisar a ação protetora da vitamina E.

3.2. *Objetivos específicos*

Avaliar os efeitos do gossipol e a possível proteção da vitamina E:

- No estado oxidativo do homogenato de testículo analisando a atividade das enzimas GR, GPx, e as concentrações de GSH e GSSG, além do estado oxidativo de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) e de grupos tióis de proteínas e a peroxidação dos lipídeos de membrana;
- Na bioenergética de mitocôndrias isoladas de testículos rato por meio do consumo de oxigênio (respiração mitocondrial), potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) e síntese de ATP;
- Na fertilidade de ratos machos, incluindo número de espermatozoides e número e peso dos filhotes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos de aproximadamente 200 g provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Estes foram alojados no Biotério de Manutenção do Campus de Dracena em ambiente controlado com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo de luz de 12h, divididos em caixas acrílicas, recebendo alimentação específica para roedores e água ad libitum e, ainda, divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais de acordo com cada tratamento, o tratamento teve a duração de 14 dias.

4.2. Tratamento

- Grupo 1 (Controle) recebeu óleo de milho por gavagem gástrica e uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (NaCl 0,9%) via intraperitoneal durante duas semanas.

- Grupo 2 (TE) recebeu vitamina E na dosagem de 100 mg/kg de peso vivo dissolvida em óleo de milho por gavagem gástrica (EL-DEMERDASH, 2004) e uma mistura de DMSO e NaCl 0,9% via intraperitoneal durante duas semanas.

- Grupo 3 (TG5) recebeu solução de Gossipol Ácido Acético na dosagem de 5 mg/kg de peso vivo dissolvido em uma mistura de DMSO e NaCl 0,9% via intraperitoneal (EL-SHARAKY et al., 2010) e óleo de milho por gavagem gástrica durante duas semanas.

- Grupo 4 (TG5+E) recebeu solução de Gossipol Ácido Acético na dosagem de 5 mg/kg de peso vivo dissolvido em uma mistura de DMSO e NaCl 0,9% via intraperitoneal e vitamina E dissolvida em óleo de milho na dosagem de 100 mg/kg de peso vivo por gavagem gástrica durante duas semanas.

4.3. *Reagentes*

Em todos os ensaios foram empregados reagentes de maior grau de pureza disponíveis comercialmente e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3[®] (Milli-Q[®]). O gossipol foi solubilizado em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (NaCl 0,9%) e a vitamina E foi solubilizada em óleo de milho comercial.

4.4. *Avaliação ética*

Todo experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal determinados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da referida instituição (Protocolo nº 19/2012).

4.5. *Testes de fertilidade*

Os ratos foram eutanasiados por decapitação após anestesia com éter, a pele do escroto foi incisada e os órgãos sexuais de 6 animais de cada grupo foram removidos: testículos e epidídimo (Figura 6).

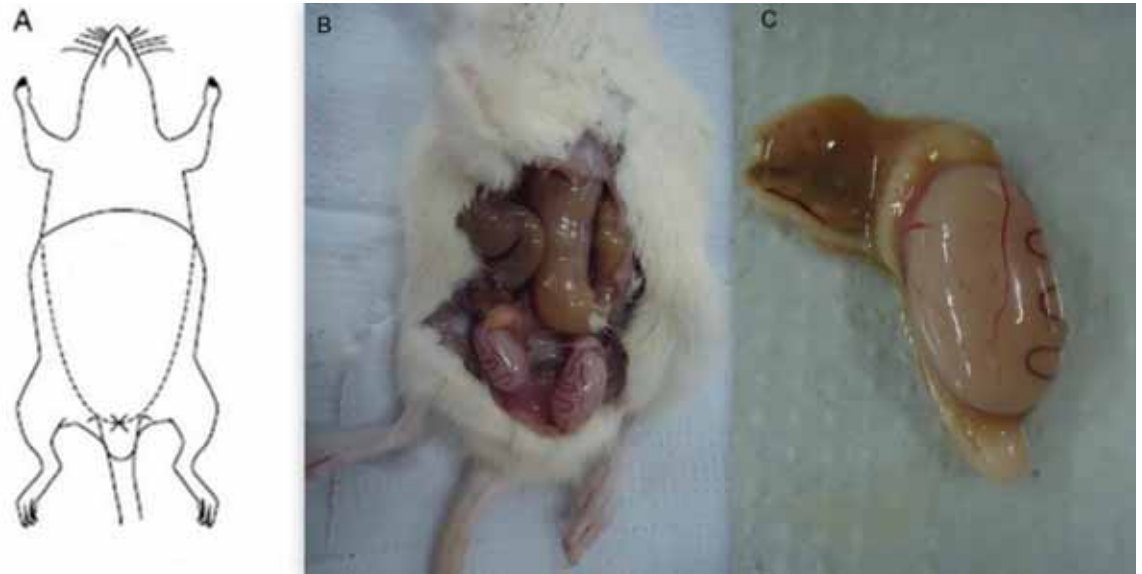


Figura 6. Representação esquemática do processo cirúrgico envolvido no isolamento de testículo e cauda do epidídimo. Incisão bilateral no abdômen do animal (A), retirada dos órgãos (testículo e epidídimo) (B), testículo com epidídimo (C).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.5.1. Contagem de espermatozoides

De acordo com a metodologia de Elbetieha e Isa Das, 2003, as caudas dos epidídimos de cada rato foram colocadas em 10 mL de solução salina normal (NaCl 0,9%) e refrigeradas durante a homogeneização. O macerado resultante de cada epidídimo foi acondicionado em tubos tipo “ependorff” individuais, sendo retirado um volume correspondente a 100 μ L do macerado. No ependorff foi acrescido 900 μ L de solução de NaCl 0,9% chegando a um volume final de 1 mL. Desse volume foi realizada a contagem do número total de espermatozoides, sendo utilizada para tanto uma câmara de Neubauer, na qual foram contados 128 pequenos quadrados (Figura 7). A contagem foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. O número de espermatozoides foi determinado por meio da seguinte fórmula:

$$S = C \times FC \times V$$

S = Soma total por animal

C = Número de espermatozoides contados

FC = Fator da câmara (1,25)

V = Diluição (10^6)

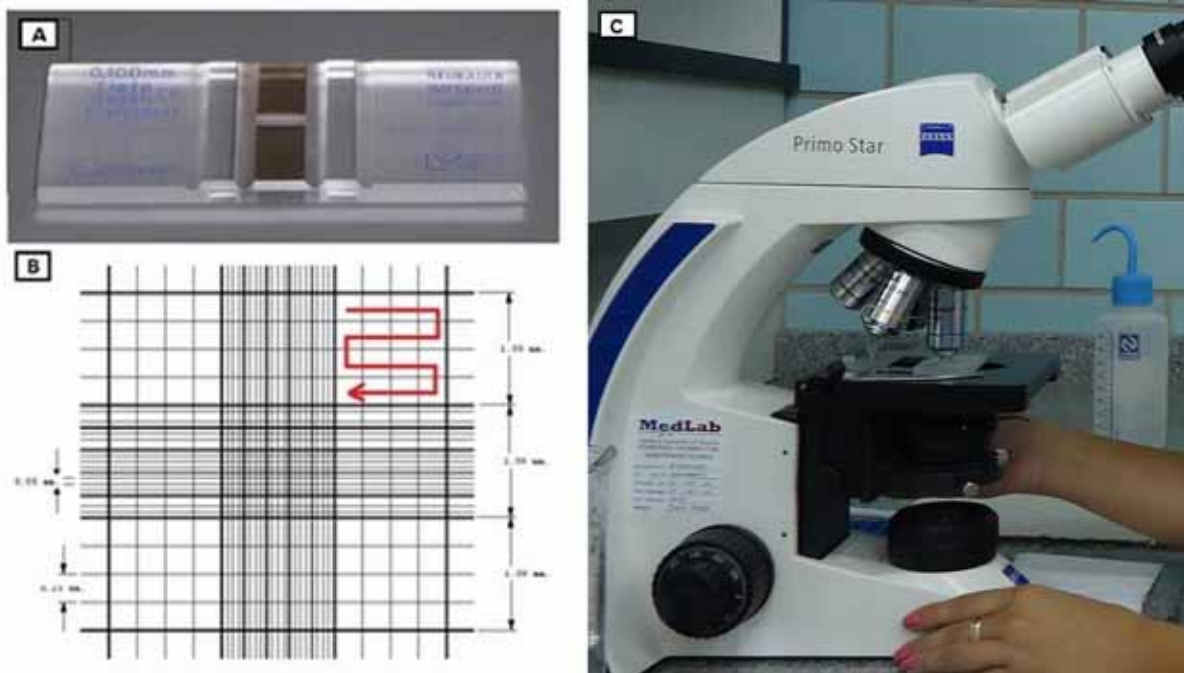


Figura 7. Esquema simplificado da contagem de espermatozoides. Visão macroscópica da câmara de Neubauer (A), visão microscópica da organização dos quadrantes utilizados para a contagem dos espermatozoides (B), Microscópio óptico (C).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.5.2. Número e peso dos filhotes

O número e peso dos filhotes foi estimado em todos os grupos tratados em comparação ao controle. Ao final do período de tratamento, quatro machos de cada grupo foram colocados individualmente em caixas com duas ratas virgens não tratadas. Os animais foram deixados com as fêmeas por 10 dias, durante os quais dois ciclos estrais ocorreram (ELBETIEHA; ISA DAAS, 2003). Após esse período, os ratos machos foram removidos e as fêmeas mantidas em caixas separadas até o parto. Assim que as ratas pariram, a quantidade e o peso dos descendentes para cada grupo foi avaliado (Figura 8 e 9).



Figura 8. Ninhada de uma das ratas fecundadas (A). Contagem dos descendentes de cada grupo (B).

Fonte: elaborado pelo autor.



Figura 9. Filhotes recém-nascidos (A). Pesagem dos descendentes de cada grupo (B).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6. Experimentos em homogenato de testículo

4.6.1. Preparação do homogenato de testículo

O homogenato de testículo foi preparado de acordo com Amaral et al., 2008. Após a eutanásia, a túnica albugínea e os vasos principais de cada um dos testículos de 6 animais de cada grupo foram removidos e imersos em 25 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,2 mM, EDTA 0,1 mM, HEPES-KOH 5 mM (pH 7,4) e BSA 0,1%, mantido à 4°C e posteriormente recortados e homogeneizado com Potter-Elvehjem. Para realização da dosagem de GR e GPx a amostra foi centrifugada a 8500 g por 10 min, podendo ser utilizado dentro de um período de 3 horas (Figura 10).

A proteína do homogenato foi determinada utilizando-se a reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), e BSA como padrão.

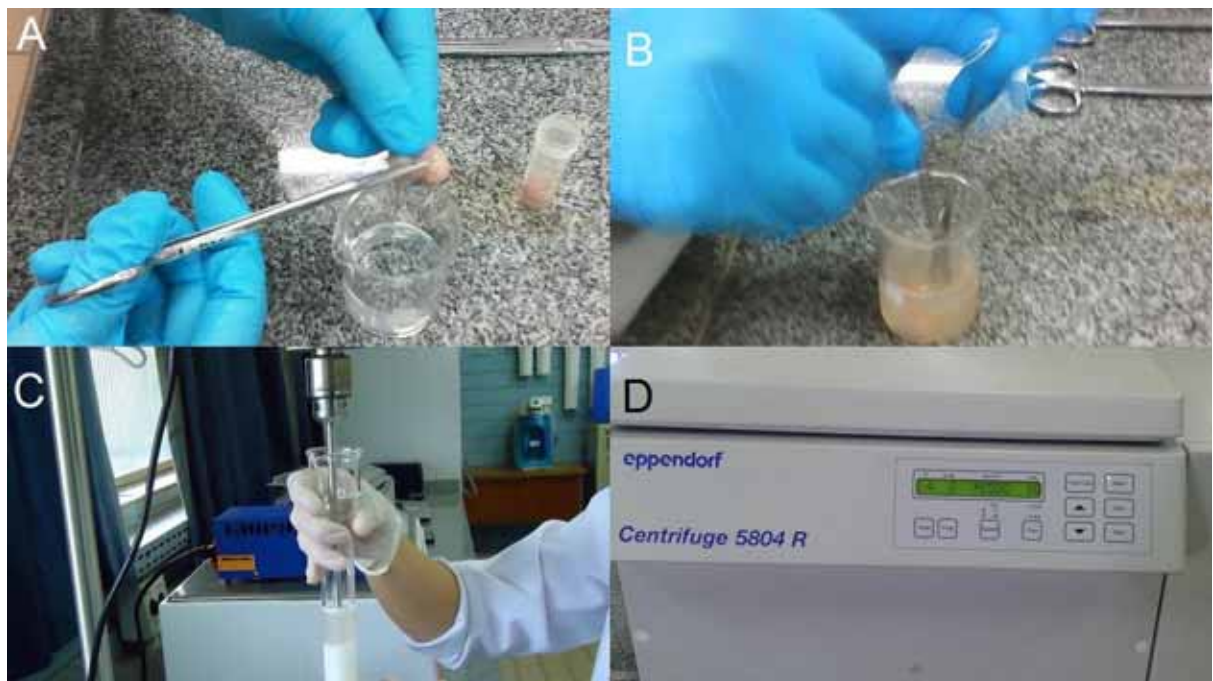


Figura 10. Representação do processo de homogeneização dos testículos. Retirada da túnica albugínea e principais vasos (A), testículo picotado em 25 mL de meio (B), homogeneização no homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (C), centrifugação de uma porção do homogenato (D).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.2. Atividade da enzima glutathione redutase (GR)

A taxa de oxidação de NADPH pela GSSG a 30°C foi utilizada como medida direta para a atividade da enzima glutathione redutase. O sistema de reação será composto de 1,5 mL contendo: GSSG 1,0 mM, NADPH 0,1 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6), triton X-100 0,1% e homogenato de testículo (1 mg de proteína/mL). A oxidação de 1 μ mol de NADPH/min avaliada em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 no comprimento de onda de 340 nm (Figuras 11 e 12) será usada como uma unidade de glutathione redutase. A atividade específica será expressa como unidade por mg de proteína.

4.6.3. Atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada por um método indireto baseado na oxidação da glutathione reduzida (GSH) para glutathione oxidada (GSSG), catalisada pela GPx e a consequente oxidação do NADPH pela GSSG a 30°C. O sistema de reação foi composto de 1,5 mL contendo: GSH 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6), triton X-100 0,1% e homogenato de testículo (1 mg de proteína/mL). A atividade enzimática foi avaliada em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 no comprimento de onda de 340 nm e a oxidação de 1 μ mol of NADPH/min foi usada como uma unidade de GPx (Figuras 11 e 12). A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína.



Figura 11. Aparelho Espectrofotômetro utilizado neste estudo.
Fonte: elaborado pelo autor.

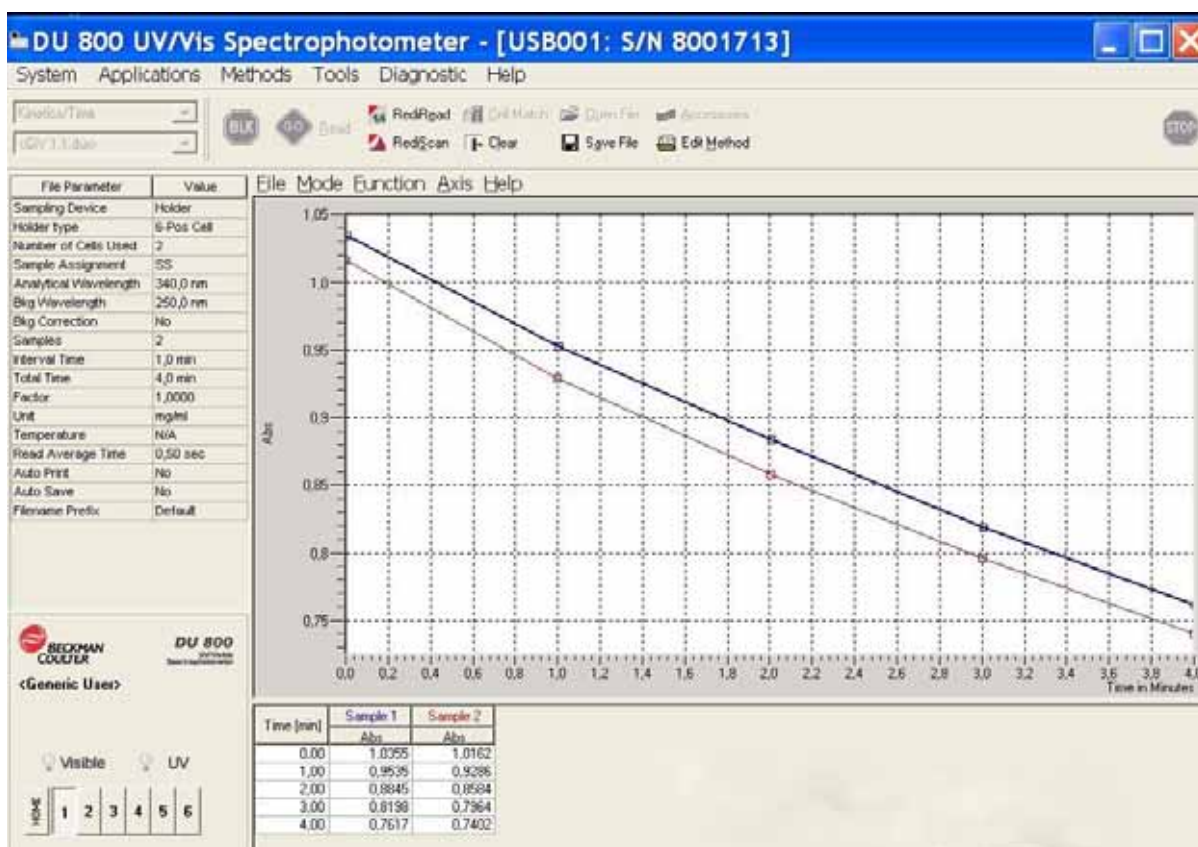


Figura 12. Interface do sistema operacional do espectrofotômetro no modo cinético (Kinetics/Time), onde as leituras da atividade das enzimas GPx e GR foram realizadas a cada um minuto, dando origem às curvas acima apresentadas.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.4. Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH no homogenato de testículo dos animais foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976) utilizando-se tubos do tipo "ependorf" de 2 mL. Colocado o homogenato (1 mg de proteína), adicionou-se meio contendo sacarose 125 mM, KCl, 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 para completar 1 mL e após uma leve homogeneização foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 min. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 µL de tampão contendo NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 µL do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 µL de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada

a leitura em espectrofluorímetro (Figura 13) RFPC 5301 (Shimadzu, Japão) com comprimento de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 3 em ambos os casos(Figura 14).

4.6.5. Concentração de glutathiona oxidada (GSSG)

Para a dosagem de GSSG, 250 μ L do sobrenadante inicial foram tratados com 250 μ L de N-etilmaleimida (NEM) 0,04 M e submetidos ao mesmo procedimento de mistura com o OPT. As concentrações de GSH e GSSG foram estimadas por meio de uma curva padrão(Figura 15).



Figura 13. Aparelho Espectrofluorímetro utilizado neste estudo.

Fonte: elaborado pelo autor.

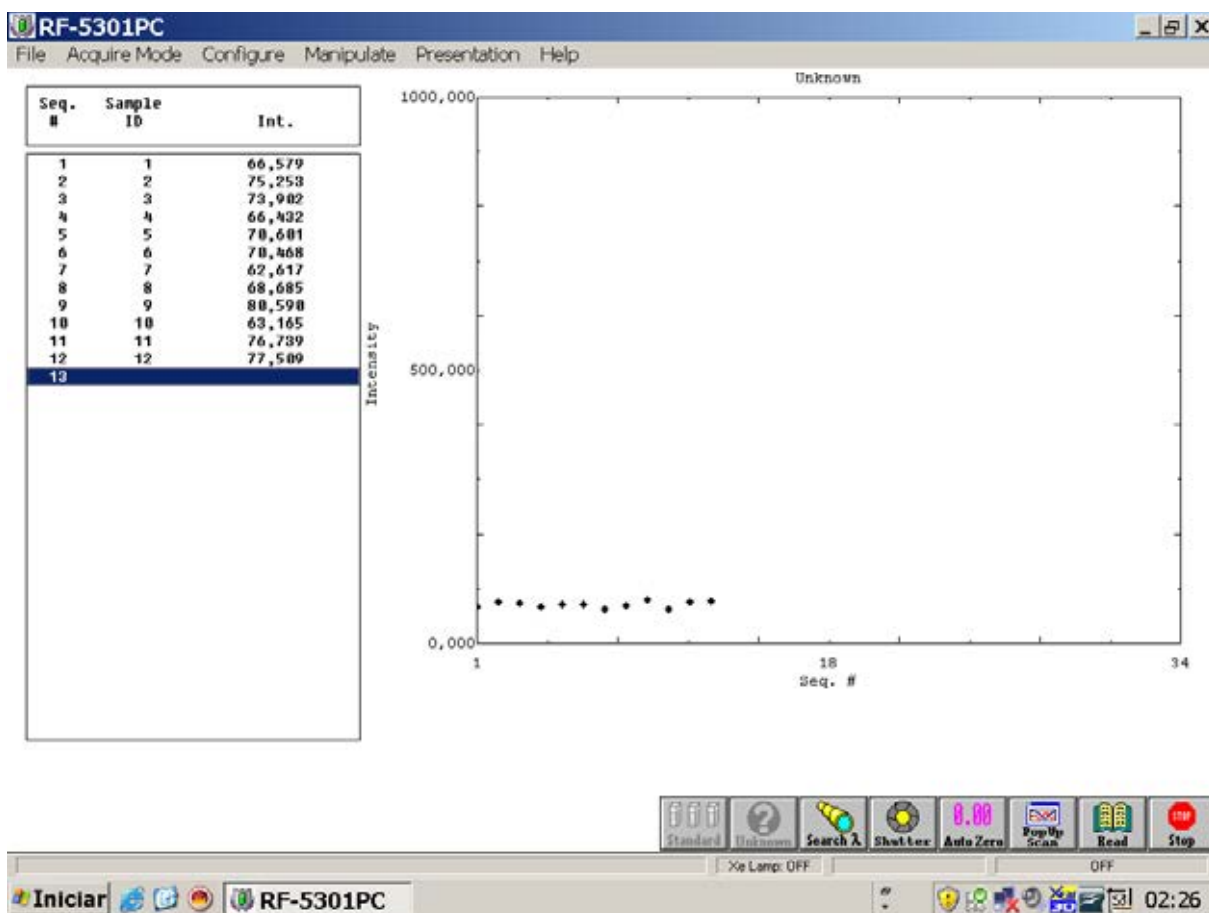


Figura 14. Interface do software utilizado para monitoramento das concentrações de GSH e GSSG.

Fonte: elaborado pelo autor.

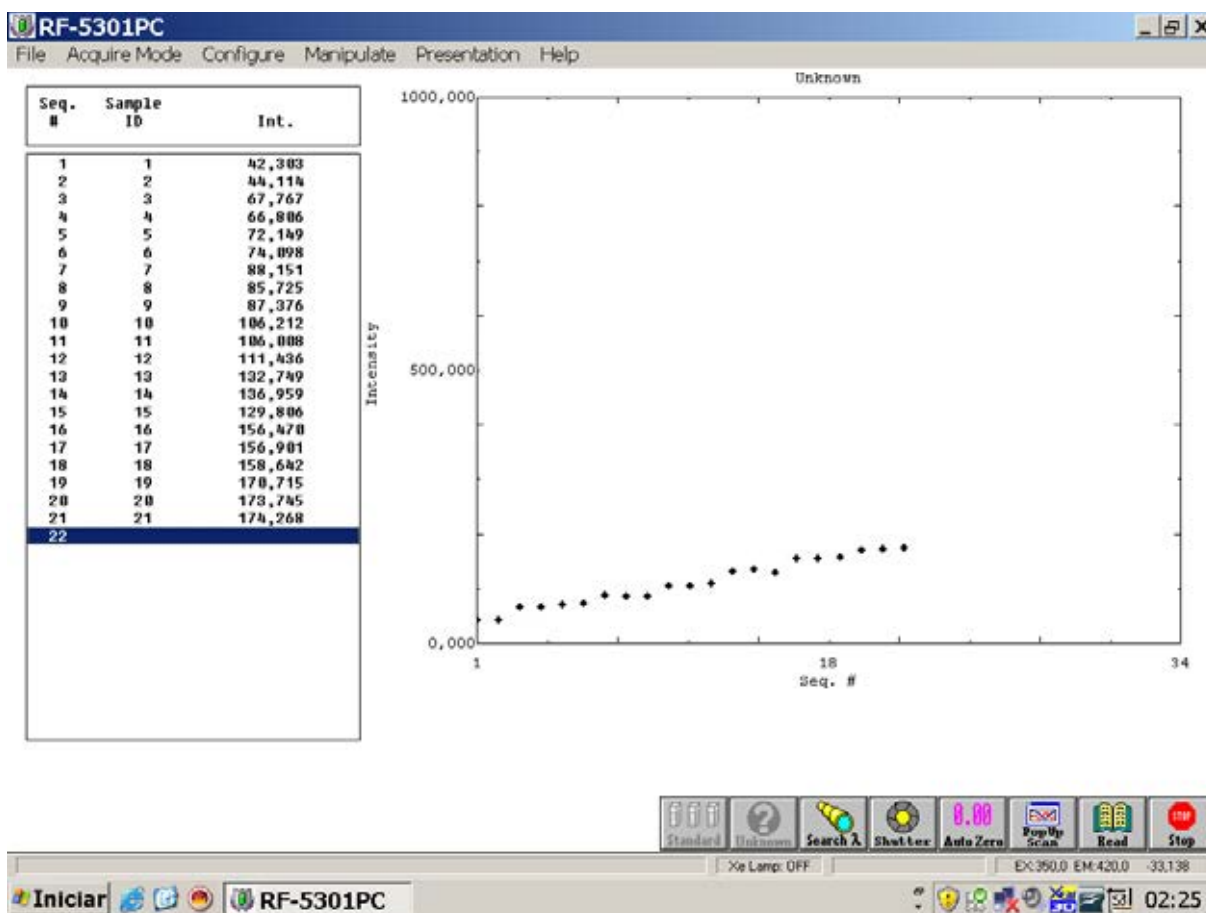


Figura 15. Curva padrão para determinação das concentrações de GSH e GSSG.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.6. Estado oxidativo de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

A determinação do estado oxidativo do NAD(P)H foi realizada no homogenato de testículo. Amostras de homogenato (1 mg de proteína/mL) foram adicionadas a um meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 (volume final de 2 mL) e a leitura foi realizada em espectrofluorímetro, usando-se 366 e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente (Figura 16) (LUND; MILLER; WOODS, 1993). Os resultados foram expressos como Unidade Relativa de Fluorescência (URF).

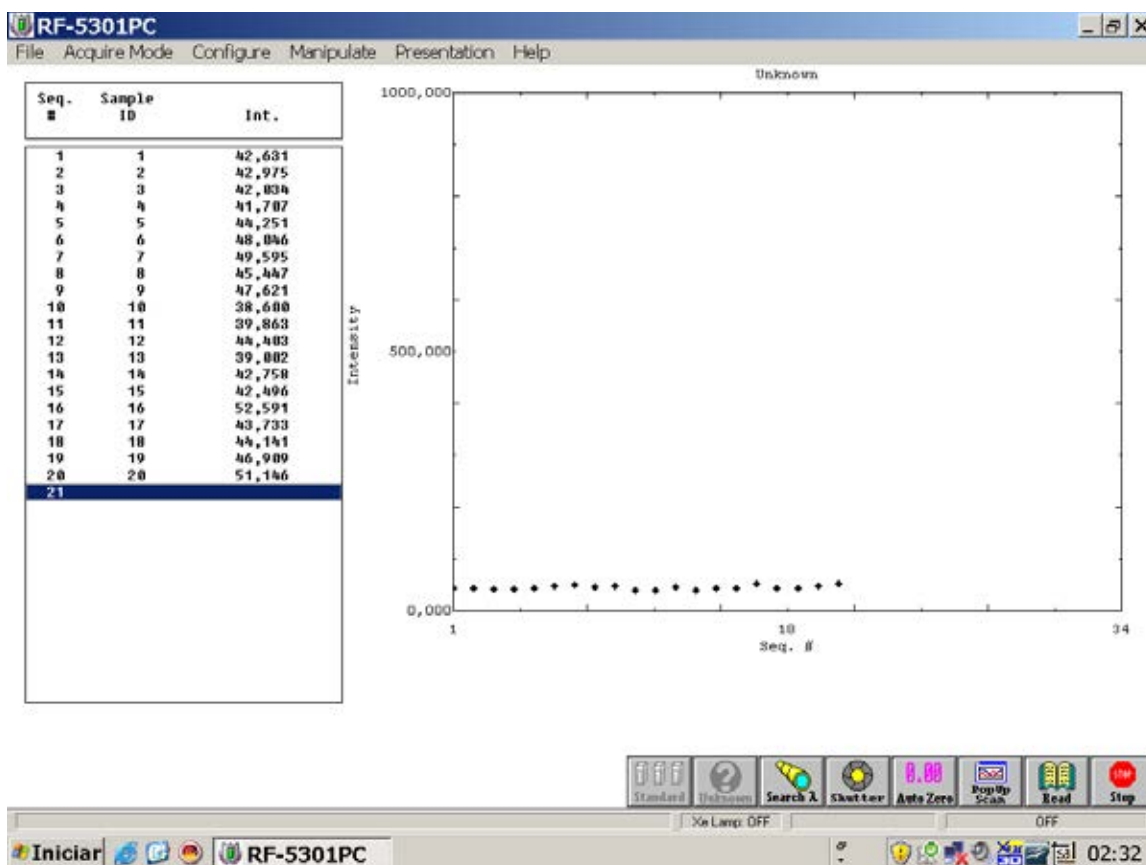


Figura 16. Interface do software utilizado para determinação do estado oxidativo do NAD(P)H.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.7. Oxidação dos grupos tióis de proteínas

A concentração de grupos tióis (-SH) de proteínas foi determinado usando o reagente de Ellman de acordo com Sedlak & Lindsay (1968) com algumas modificações. Uma amostra do homogenato (5 mg de proteína) foi tratada com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, contendo EDTA 5 mM e submetida a centrifugação a 2500 g por 5 minutos. O precipitado protéico foi lavado duas vezes com a mesma solução de TCA-EDTA. As proteínas foram redissolvidas em 3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo EDTA 5 mM e dodecil sulfato de sódio 0,5%. Alíquotas dessa solução foram tratadas com DTNB (concentração final 0,1 mM) dissolvido em 2 mL de tampão Tris-EDTA, pH 8,6. As amostras foram incubadas “no escuro” e a absorvância foi medida a 412 nm e os valores subtraídos de um “branco” obtido pelo tratamento das amostras com N-etilmaleimida 5 mM

antes da reação com o DTNB. A concentração de grupos tióis foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Figura 17).

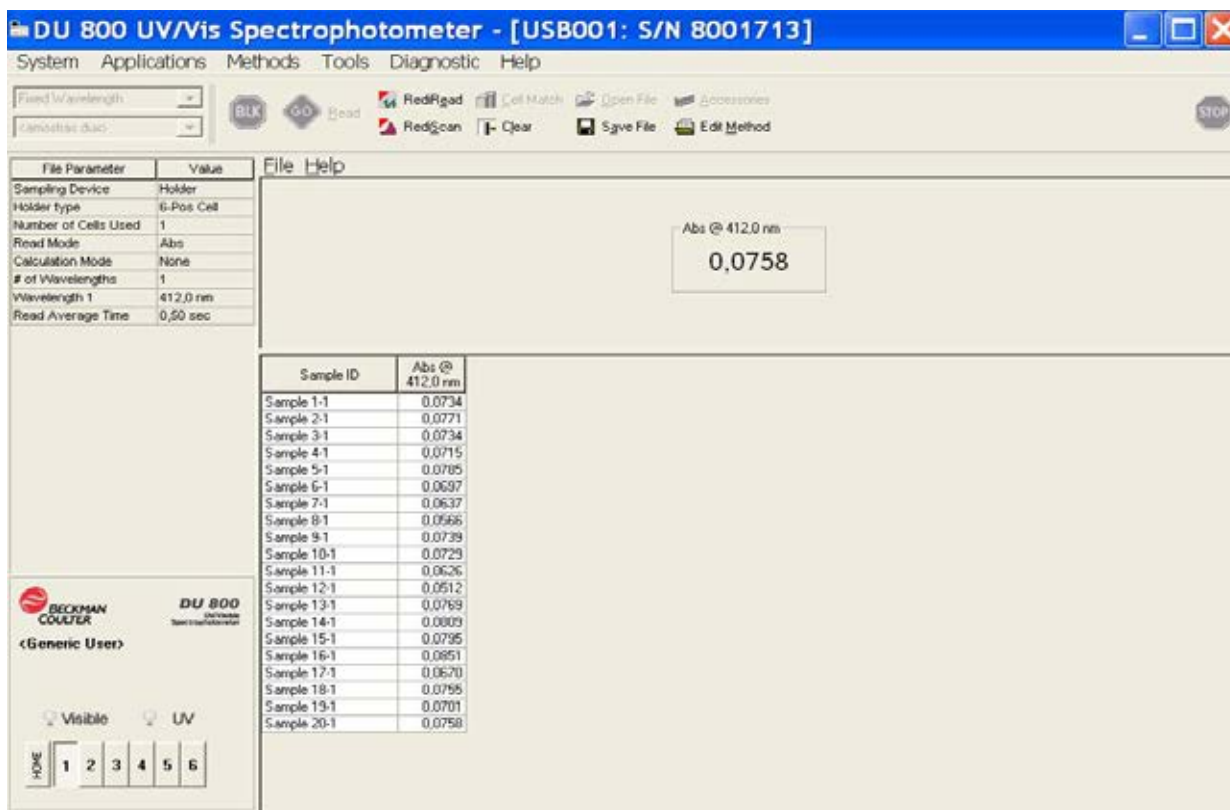


Figura 17. Interface do sistema operacional do espectrofotômetro no modo de leitura fixa (Fixed Wavelength), onde as leituras são instantâneas, dando origem a uma tabela de dados acima apresentada.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.8. Peroxidação dos lipídeos de membrana

A peroxidação dos lipídios de membrana foi determinada no homogenato de testículo dos animais tratados e controle por meio da formação do malondialdeído (MDA), o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (BUEGE; AUST, 1978). O homogenato (5 mg de proteína) foi colocado em tubo de ensaio e foram adicionados 0,2 mL de SDS 8,1% (p/v), 1,5 mL de ácido acético 20% (v/v), 1,5 mL de solução aquosa de TBA a 0,67% (p/v); em seguida o volume foi completado até 4 mL com água destilada e deionizada (tipo Milli-Q) e a mistura colocada em banho-maria a

95°C por 60 min. Após o período de incubação os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e foi adicionado 1mL de água Milli-Q e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5mL de n-butanol. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2000 *g* por 10 minutos e a parte orgânica foi coletada e a absorvância medida a 535nm em um espectrofotômetro Genesys 10 UV (Thermo Spectronic, Rochester, EUA) (Figura 18). A concentração do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

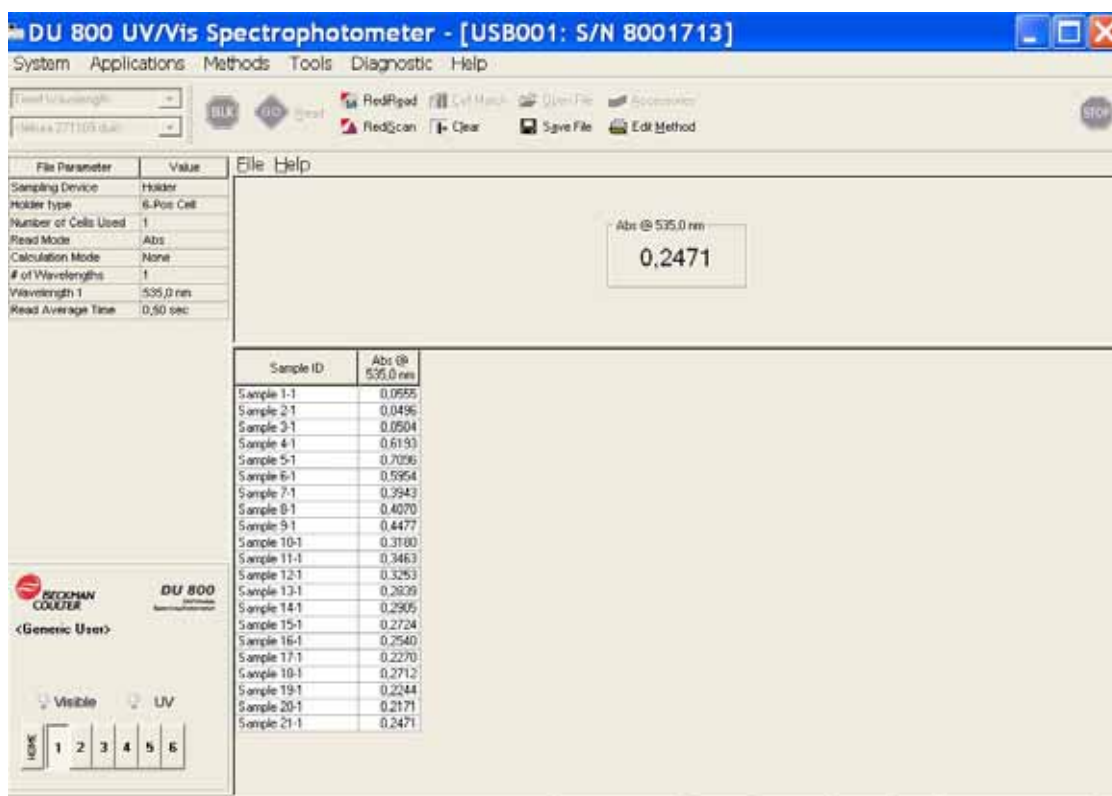


Figura 18. Interface do sistema operacional do espectrofotômetro no modo de leitura fixa (Fixed Wavelength), onde as leituras são instantâneas, dando origem a uma tabela de dados acima apresentada.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.7. Análises realizadas em mitocôndrias isoladas de testículos

4.7.1. Isolamento de mitocôndrias

O isolamento das mitocôndrias de testículo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Amaral et al., 2008. A túnica albugínea e os vasos principais de cada um dos testículos foram removidos e cada testículo colocado em 30 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,2 mM, EDTA 0,1 mM, HEPES-KOH 5 mM (pH 7,4) e BSA 0,1%, mantido à 4°C e posteriormente picotado e homogeneizado com Potter-Elvehjem. O homogenato foi centrifugado a 2500 *g* por 10 min. o sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e centrifugado novamente a 10000 *g* por mais 10 min. O precipitado foi lavado e centrifugado novamente a 10000 *g* por mais 10 min. O sedimento final contendo as mitocôndrias foi suspenso com 1 mL de meio contendo sacarose 250 mM e HEPES-KOH 5 mM (pH 7,4) (Figura 19), sendo utilizado dentro de um período de 3 horas.

A proteína mitocondrial e do homogenato foi determinada utilizando-se a reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), e BSA como padrão.

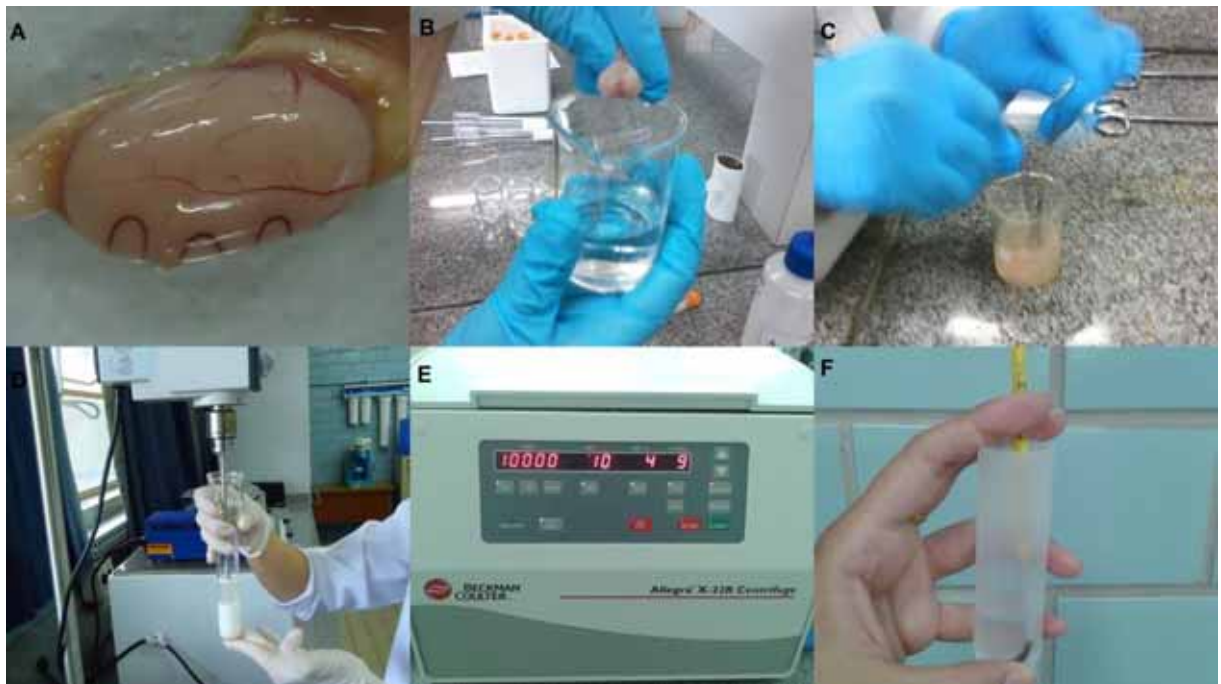


Figura 19. Isolamento de Mitocôndrias. Retirada do testículo (A). Remoção da túnica e principais vasos (B). Testículos sendo picotados (C). Homogeneização (D). Centrifugações (E). Lavagem e suspensão das mitocôndrias (F).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.7.2. *Respiração mitocondrial*

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas com glutamato de potássio 5 mM + malato de potássio 5 mM foi medido usando um medidor de

oxigênio dissolvido (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) (Figura17) equipado com um eletrodo tipo Clark (Figura 20). As mitocôndrias (0,8 mg de proteína/mL) foram incubadas em uma câmara termostatzada fechada sob agitação no meio de respiração contendo KCl 65 mM, sacarose 125 mM, EGTA 20 μ M, KH₂PO₄ 2,5 mM e Tris 10 mM (pH 7,4) (volume final de 1 mL), a 27°C. A velocidade de consumo de oxigênio no estado 2 foi determinada por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

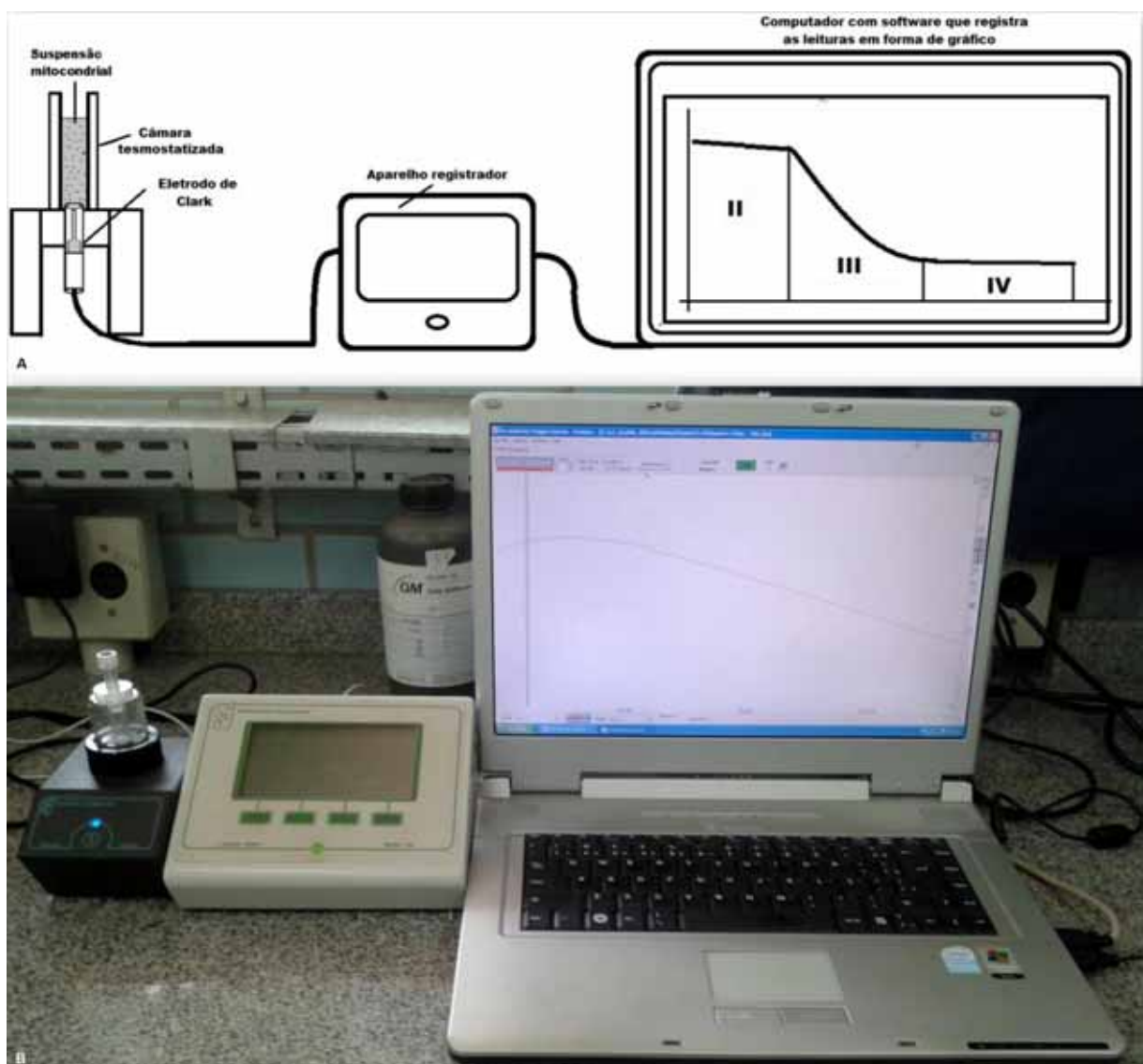


Figura 20. Representação esquemática (A) e foto (B) do oxímetro utilizado para o monitoramento do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias e do software usado para registrar e calcular as velocidades de consumo de oxigênio. Fonte: elaborado pelo autor.

4.7.3. Determinação do potencial de membrana

O potencial de membrana das mitocôndrias (2 mg de proteína/mL) energizadas com glutamato de potássio 5 mM + malato de potássio 5 mM foi determinado espectrofluorimetricamente no meio de respiração (volume final de 2 mL) com o indicador safranina O (4 μ M) (ZANOTTI; AZZONE, 1980). A variação de fluorescência foi avaliada utilizando-se um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão) (Figura 21), nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente.

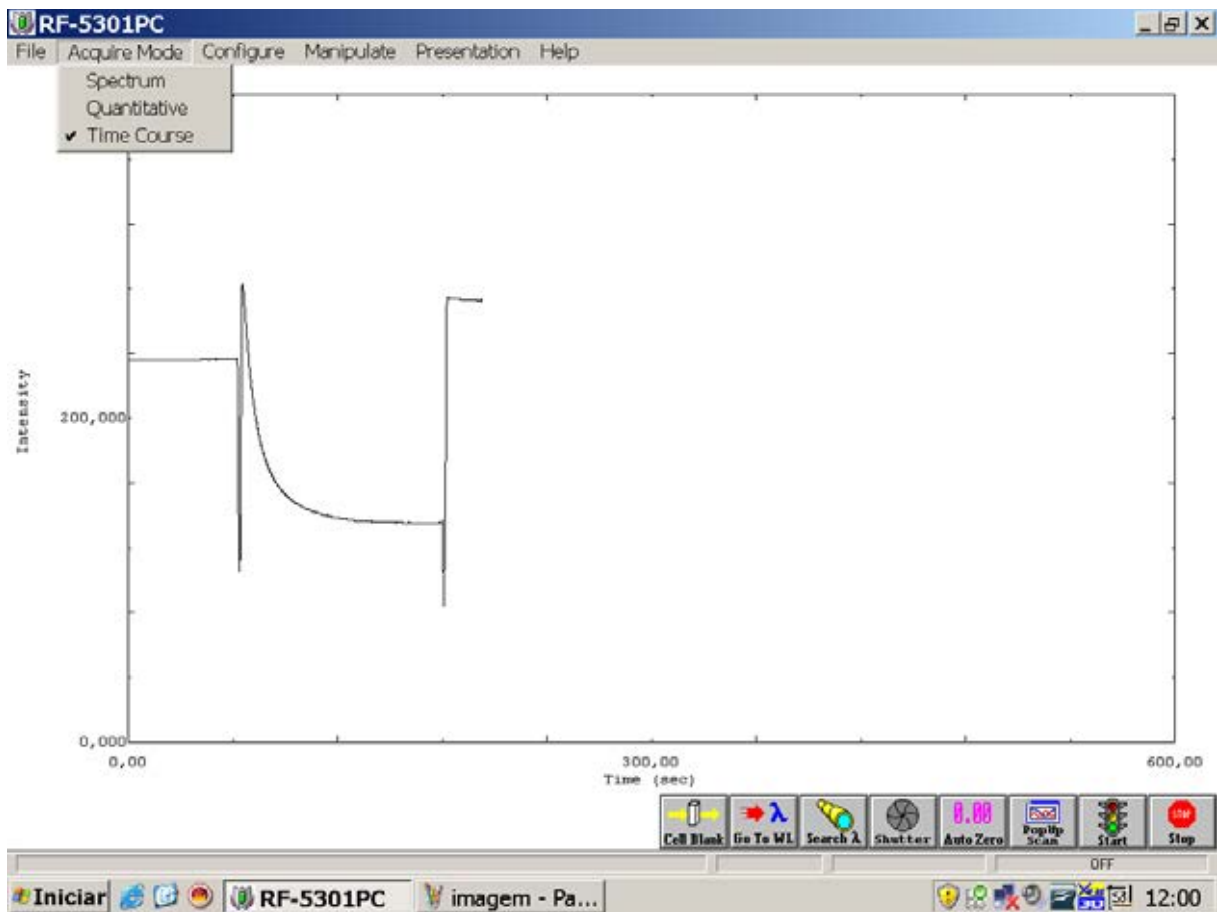


Figura 21. Interface do sistema operacional do software do espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC (Tokyo, Japan), utilizado para mensuração do potencial de membrana.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.7.4. Síntese de ATP

A síntese de ATP foi determinada pelo método de quimioluminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase de vaga-lume (LEMASTERS; HACKENBROCK, 1976). por meio de um kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha) (Figura 22). As mitocôndrias (1 mg de proteína) foram suspensas em 1 mL de meio contendo KCl 65 mM, sacarose 125 mM, HEPES 10mM, com pH= 7,2 e foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 min a 4°C. O precipitado foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M gelado e centrifugado a 12000 *g* por 10 min a 4°C . Foram aliqüotadas 100 µL de cada amostra obtida e as mesmas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado tampão TRIS-HCl 100 mM, pH 7,8, até completar 1 mL, sendo as amostras novamente centrifugadas a 12000 *g* por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit.



Figura 22. Aparelho Luminômetro. Fonte: elaborado pelo autor.

4.8. Forma de análise dos resultados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições por tratamento.

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $P < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

5. RESULTADOS

5.1. Testes de Fertilidade

5.1.1. Contagem de espermatozoides

O tratamento com gossipol 5 mg/kg p.v. (G3) diminuiu significativamente a contagem de espermatozoides da cauda epidídimo em relação ao G1 e a vitamina E apresentou efeito protetor sobre este parâmetro (G4) (Figura 23). O tratamento com gossipol 10 mg/kg p.v. (G5) também diminuiu significativamente o número total de espermatozoides, e neste caso a diminuição foi ainda maior mostrando um efeito dose-dependente, porém, a vitamina E, na dose utilizada neste estudo, não foi capaz de proteger o efeito deletério do gossipol nessa concentração (dados não apresentados), por isso, para a continuação deste estudo, foi utilizada apenas a dose de 5 mg/kg p.v. do gossipol.

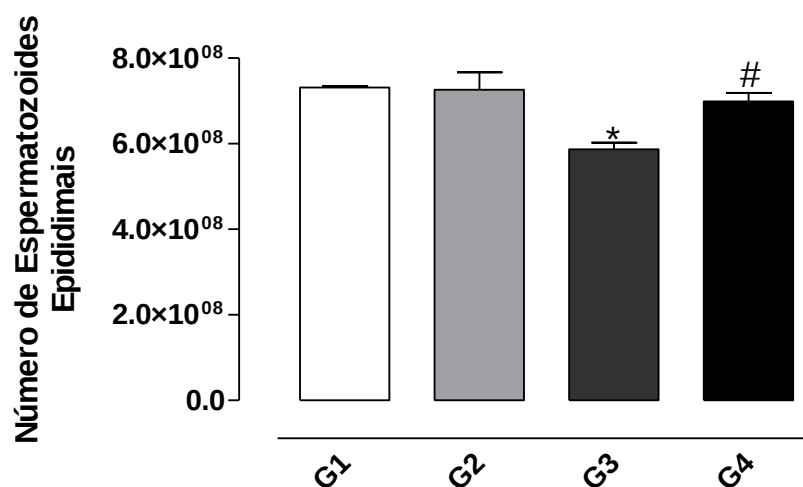


Figura 23. Efeito do gossipol sobre a produção de espermatozoides e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. *Significativamente diferente do controle (G1) (P<0,05). #Significativamente diferente do tratado com gossipol (G3) (P<0,05).

5.1.2. Número e peso dos filhotes

A Tabela 1 apresenta o número de machos utilizados para o cruzamento por grupo, o número e a porcentagem de fêmeas que foram fecundadas, o número total e o peso médio dos filhotes. Pode-se observar o efeito benéfico da vitamina E sobre a fertilidade, uma vez que todas as fêmeas desse grupo (G2) foram fecundadas e também apresentou o maior número de filhotes. O gossipol apresentou efeito prejudicial sobre a fertilidade, pois nenhuma fêmea foi fecundada (G3) e o número de filhotes desse grupo foi zero. No Grupo 4, onde os animais foram tratados com gossipol associado à vitamina E observa-se o efeito protetor da vitamina já que 50% das fêmeas foram fecundadas e o número de filhotes se aproximou ao do grupo controle. O peso dos filhotes ao nascimento foi significativamente diferente entre todos os grupos.

Tabela 1. Efeito do gossipol e da vitamina E na fertilidade de ratos machos e no peso dos filhotes

Tratamento	Nº de machos	Nº (%) de fêmeas prenhas	Nº de filhotes	Peso dos filhotes*
G1	4	8/7 (87,5)	65 ^{ab}	6,54±0,85 ^a
G2	4	8/8 (100)	89 ^a	5,98±0,60 ^b
G3	4	8/0 (0)	0 ^c	-
G4	4	8/4 (50)	42 ^b	5,44±0,53 ^c

*Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P < 0,05).

5.2. Experimentos em homogenato de testículo

5.2.1. Atividade da enzima glutathiona redutase (GR)

Na análise da atividade da enzima Glutathiona Redutase observou-se que também houve um aumento significativo no grupo tratado com o gossipol (G3) em relação ao controle e o tratamento concomitante dos animais com a vitamina E (G4) não protegeu contra o efeito provocado pelo gossipol sobre a enzima (Figura 24).

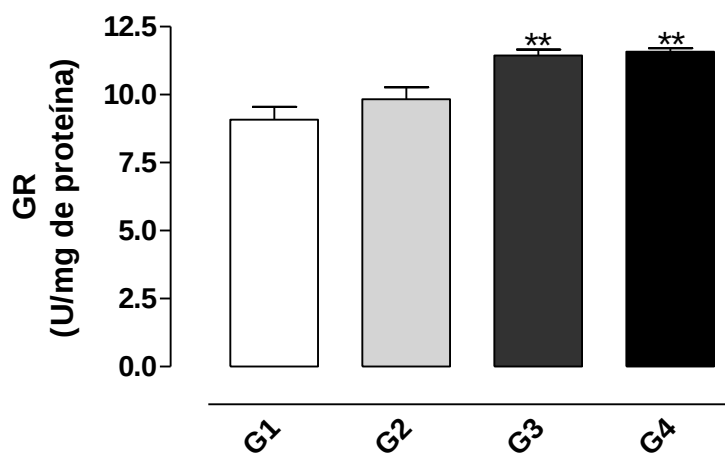


Figura 24. Efeito do gossipol sobre a atividade da enzima Glutathiona Redutase (GR) no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v. **Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,01$).

5.2.2. Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A análise da atividade da enzima Glutathiona Peroxidase demonstrou que houve um aumento significativo no grupo tratado com o gossipol (G3) em relação ao controle, porém o tratamento dos animais com a vitamina E (G4) não protegeu contra o efeito provocado pelo gossipol sobre a enzima (Figura 25).

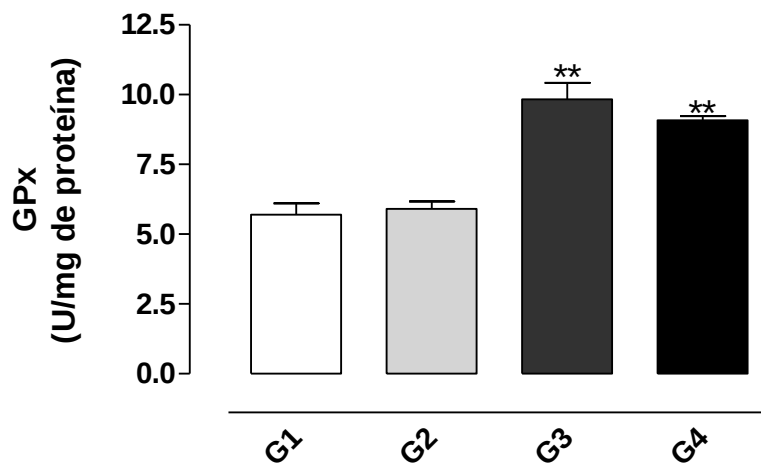


Figura 25. Efeito do gossipol sobre a atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx) no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. **Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,01$).

5.2.3. Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

O tratamento dos animais com o gossipol (G3) promoveu uma redução significativa do nível de GSH no homogenato de testículo (Figura 26). O tratamento dos animais com a vitamina E (G4) protegeu os testículos do efeito provocado pelo gossipol.

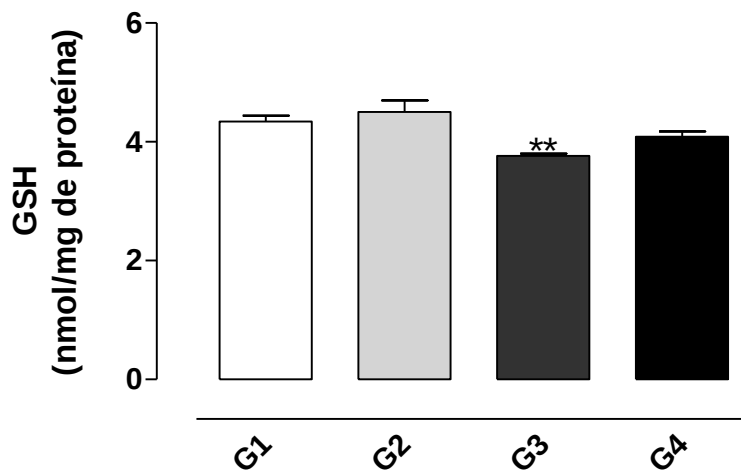


Figura 26. Efeito do gossipol sobre a oxidação de GSH no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). **Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,01$).

5.2.4. Concentração de glutathiona oxidada (GSSG)

Ocorreu um aumento do nível de GSSG no homogenato de testículo dos animais tratados com Gossipol (G3) indicando que essa substância induziu a oxidação da glutathiona presente no homonegato (Figura 27). O tratamento dos animais com a vitamina E (G4) protegeu os testículos do efeito provocado pelo gossipol.

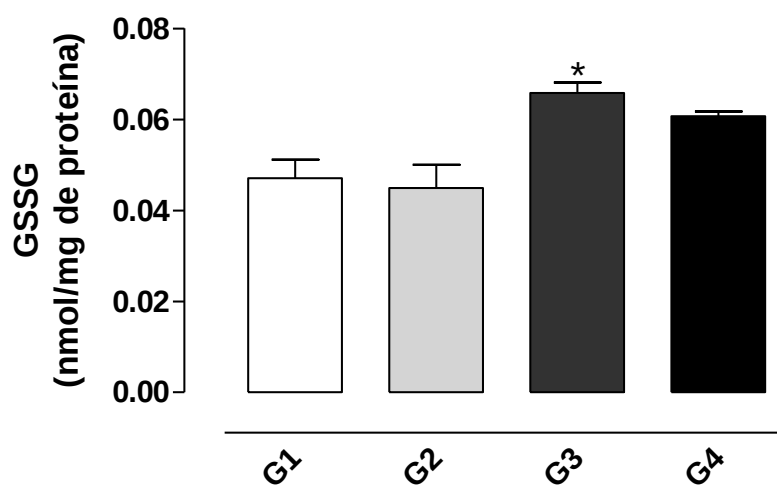


Figura 27. Efeito do gossipol sobre a concentração de GSSG no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$).

5.2.5. Estado oxidativo de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

Ocorreu uma redução do nível de NAD(P)H do homogenato de testículo no grupo tratado com gossipol (G3) em relação ao controle, demonstrando que o gossipol promoveu a oxidação dos nucleotídeos de piridina. O tratamento dos animais com a vitamina E (G4) protegeu os testículos do efeito provocado pelo gossipol (Figura 28).

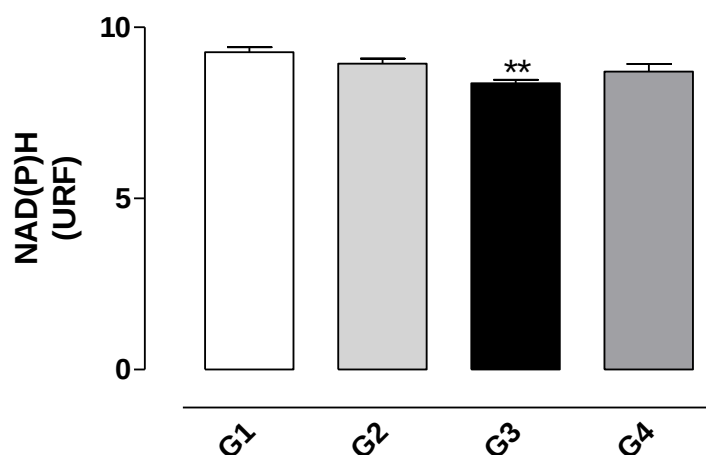


Figura 28. Efeito do gossipol sobre o estado oxidativo de NAD(P)H no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v. **Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,01$). URF = Unidade Relativa de Fluorescência.

5.2.6. Oxidação dos grupos tióis de proteínas

Não foi observada alteração significativa na concentração de grupos tióis de proteína nos animais tratados com gossipol em relação ao grupo controle (Figura 29), indicando que o gossipol na concentração de 5 mg/kg p.v. não exerce efeito oxidante sobre esses grupos.

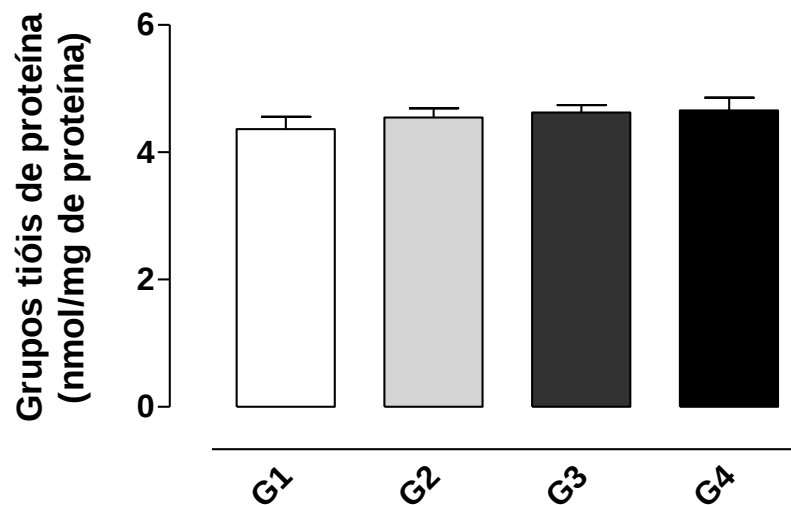


Figura 29. Efeito do gossipol sobre a oxidação de grupos tióis de proteína no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v..

5.2.7. Peroxidação dos lipídeos de membrana

A peroxidação dos lipídios de membrana foi avaliada por meio da dosagem do malondialdeído (MDA). Os resultados demonstraram que o tratamento com gossipol (G3) aumentou significativamente a concentração de MDA em relação ao grupo controle (G1). O tratamento concomitante com a vitamina E protegeu os testículos da oxidação dos lipídeos provocada pelo gossipol (Figura 30).

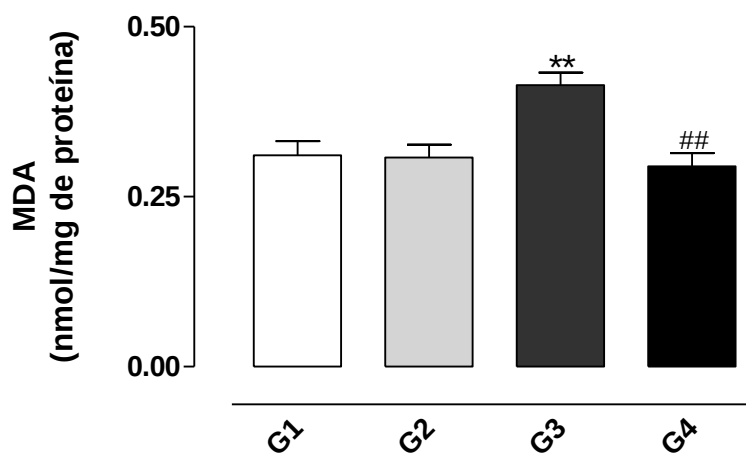


Figura 30. Efeito do gossipol sobre a concentração de MDA no homogenato de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. **Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,01$). ##Significativamente diferente do tratado com gossipol (G3) ($P < 0,01$).

5.3. Análises realizadas em mitocôndrias isoladas de testículos

5.3.1. Respiração mitocondrial

Neste experimento, os substratos oxidáveis utilizados foram glutamato 5 mM juntamente com malato 5 mM. O gossipol apresentou efeito aumentou significativamente o consumo de oxigênio no estado 2 da respiração mitocondrial em relação ao grupo controle (G1), indicando que ele atua como um desacoplador da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. O tratamento com a vitamina E restaurou a velocidade do consumo de oxigênio a valores próximos aos do controle (Figura 31).

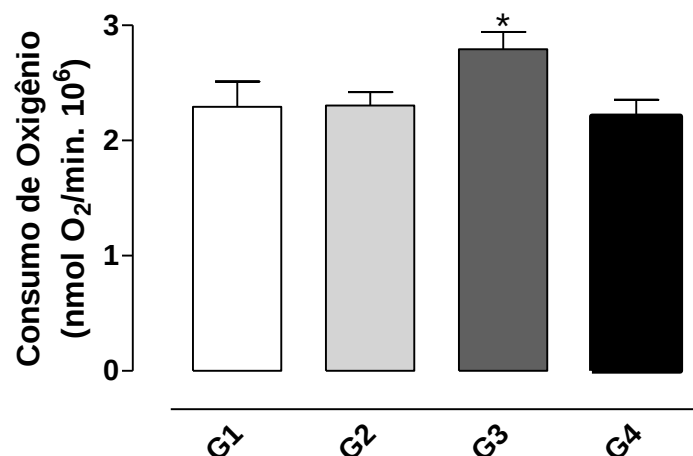


Figura 31. Efeito do gossipol sobre o estado 2 da respiração em mitocôndrias isoladas de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). ##Significativamente diferente do tratado com gossipol (G3) ($P < 0,01$).

5.3.2. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

A Figura 32 mostra os efeitos do gossipol sobre o potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de testículos de rato energizadas com glutamato e malato. Em linha com os resultados obtidos na respiração mitocondrial, o gossipol dissipou significativamente o $\Delta\Psi_m$ se comparado ao grupo controle (G1) e a vitamina E apresentou efeito protetor sobre o parâmetro avaliado.

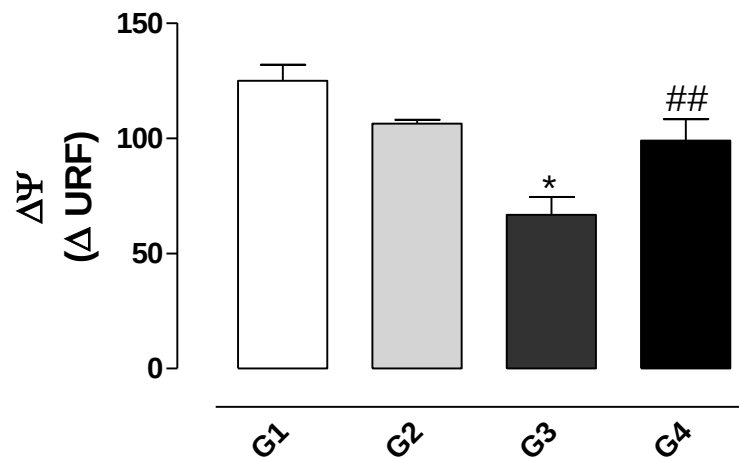


Figura 32. Efeito do gossipol sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) em mitocôndrias isoladas de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. **Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,01$). ##Significativamente diferente do tratado com gossipol (G3) ($P < 0,01$). URF = Unidade Relativa de Fluorescência.

5.3.3. Síntese de ATP

O efeito do gossipol sobre a síntese de ATP pelas mitocôndrias isoladas de testículos de rato está apresentado na Figura 33. O gossipol causou uma inibição significativa na síntese de ATP mitocondrial em relação ao grupo controle (G1), enquanto que a vitamina E reestabeleceu a concentração de ATP a valores próximos aos do grupo controle.

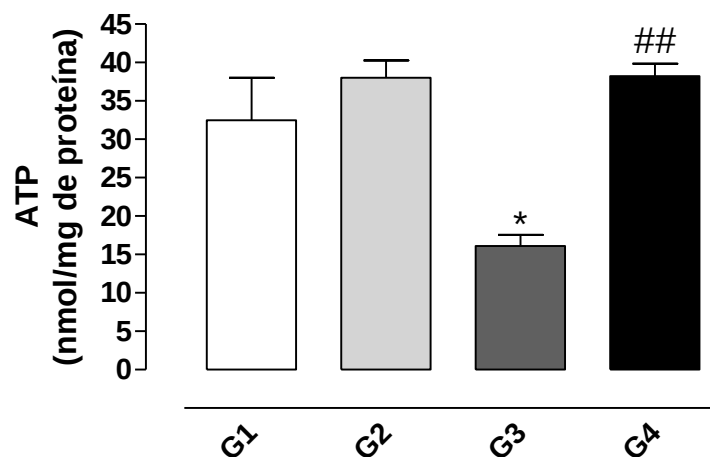


Figura 33. Efeito do gossipol sobre os níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de testículos de rato e ação protetora da vitamina E. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. G1 = controle; G2 = vitamina E 100 mg/kg p.v.; G3 = Gossipol 5 mg/kg p.v.; G4 = Gossipol 5 mg/kg p.v. + vitamina E 100 mg/kg p.v.. *Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). ##Significativamente diferente do tratado com gossipol (G3) ($P < 0,01$).

6. DISCUSSÃO

Efeitos deletérios do gossipol sobre a fertilidade têm sido amplamente registrados na literatura. Entre os aspectos negativos observados em várias espécies, encontram-se a redução na concentração, inibição da motilidade e aumento da mortalidade de espermatozoides (CHONGTHMMAKUN et al., 1986; ZIRKLE et al., 1988; HONG et al., 1989; RANDERL et al., 1992; FORNÉS et al., 1993; BROCAS et al., 1997; CHENOWETH et al., 2000; YUAN; SHI, 2000; EFSA 2008; EL-SHARAKY et al. 2010). Esses problemas têm sido atribuídos ao bloqueio na produção, liberação e utilização do ATP nos espermatozoides (UENO et al., 1988). Além disso, o gossipol também inibe o influxo de cálcio e a atividade das enzimas Mg-ATPase e Ca-Mg-ATPase nas membranas plasmáticas dos espermatozoides (BREITBART et al., 1984). Ainda, espermatozoides defeituosos são formados nos animais expostos ao gossipol em decorrência de anormalidades na membrana nuclear, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (HAFFER, 1983; ARSHAMI; RUTTLE, 1988; CHENOWETH et al., 2000; ROMUALDO; KLINEFELTER, 2002).

Neste estudo, o tratamento com gossipol 5 mg/kg de p.v. levou à diminuição do número total de espermatozoides da cauda do epidídimo dos ratos, efeito esse revertido pelo tratamento dos animais com a vitamina E, indicando que uma atividade oxidante do gossipol pode estar envolvida. Efeito semelhante foi observado por Velasquez-Pereira et al. (1998) quando avaliaram o efeito da vitamina E sobre a produção de espermatozoides em bovinos. Nossos resultados também estão de acordo com os apresentados por Tanyildizi (2004), que observaram o mesmo efeito do gossipol em espermatozoides bovinos. Como consequência do efeito do gossipol na produção de espermatozoides dos ratos, observou-se uma diminuição na fertilidade dos animais por meio do menor número e peso de filhotes. E ainda, a vitamina E apresentou efeito protetor na fertilidade. A partir dessas observações foi avaliado o efeito do gossipol e da vitamina E sobre o sistema antioxidante celular e a bioenergética mitocondrial para determinar os mecanismos envolvidos.

A glutathiona reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes oxidantes (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando-se das reservas de enzimas antioxidantes, entre elas a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Redutase (GR). O estresse oxidativo é caracterizado por diminuição nos níveis de GSH, aumentos na glutathione oxidada (GSSG) e lipoperoxidação, bem como redução da atividade de enzimas antioxidantes: catalase, superóxido dismutase (SOD), GPx e GR (SIES, 1986). O tratamento com gossipol 5 mg/kg p.v. induziu o estresse oxidativo no homogenato de testículo dos ratos como indicado pela diminuição nas concentrações de GSH e um aumento na concentração de GSSG. Essas alterações encontradas no ciclo redox da glutathione no presente estudo não condizem com os encontrados por El-Sharakly et al. (2010), que avaliaram o efeito do gossipol em ratos que receberam doses de 5, 10 e 20 mg/kg de peso vivo via intraperitoneal, pois foram observados aumentos progressivos nas concentrações de GSH e reduções nos níveis de GSSG. Essas divergências podem ser justificadas em função do trabalho desenvolvido por Kovacic (2003) que mostrou que o gossipol apresenta dupla ação, ou seja, atua tanto como agente anti como pró-oxidante. Porém, os resultados obtidos neste estudo são compatíveis com os encontrados por Carvalho et al. (2013) que observaram uma diminuição significativa do nível de GSH no homogenato de fígado de ratos tratados com o gossipol em relação aos animais controle, com um consequente aumento na concentração de GSSG. Ainda, a vitamina E foi capaz de proteger contra o efeito oxidante do gossipol sobre a glutathione.

O sistema NAD opera como um aceptor de elétrons e H^+ nas reações de oxidação de substratos orgânicos, e o sistema NADP funciona como um doador de equivalentes redutores em processos de biossíntese. A proporção entre [metabólito oxidado]/[metabólito reduzido] reflete o estado redox dos nucleotídeos de piridina na relação $NAD^+/NADH$ e $NADP^+/NADPH$. Além do mais, os nucleotídeos de piridina são uma fonte de equivalentes redutores necessários para remover radicais livres de oxigênio endógenos e exógenos, sendo o principal poder redutor para reconstituição do sistema enzimático glutathione redutase/peroxidase (VELIKY et al., 2001). O tratamento com gossipol também promoveu a oxidação do NAD(P)H indicando uma

possível ação sobre as enzimas antioxidantes, enquanto que a vitamina E protegeu contra esse efeito.

Os resultados deste estudo mostraram um aumento nas atividades das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) no homogenato de testículo dos animais tratados com gossipol em comparação com o grupo controle. Esses dados estão de acordo com Bender et al. (1988) que relataram que o gossipol poderia induzir a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é altamente tóxico para as células e provocar consequentemente uma elevação da atividade específica da GPx, enzima responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O às custas de equivalentes redutores provenientes da GSH, a qual por sua vez é regenerada pela GR.

O gossipol, de acordo com Fornes et al. (1993) e Peyster et al. (1984), estimula a geração de peróxidos lipídicos, e estes por sua vez promovem danos à membrana plasmática. Estes efeitos são condizentes aos apresentados neste estudo, visto que ocorreu uma elevação na formação do MDA no homogenato de testículo dos animais tratados com gossipol, indicando a ocorrência da peroxidação lipídica. Resultado semelhante foi relatado por Carvalho et al. (2013) quando avaliaram os efeitos do gossipol sobre o fígado de ratos. Em nosso estudo, o tratamento com a vitamina E protegeu os testículos contra este efeito, o que pode estar associado ao fato da vitamina E ser o principal antioxidante da membrana das células e atuar nos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, impedindo a formação de lipoperóxidos tóxicos ou destruindo os peróxidos formados, evitando assim sua oxidação (COMBS, 1992; SOUZA et al., 2007).

A oxidação de proteínas decorre, principalmente, da ação dos radicais livres sobre o grupo tiol (-SH) da cisteína, causando também agregação e fragmentação de aminoácidos, o que leva à desnaturação proteica (ARKEZENOV; MARKESBERY, 2001; LEICHERT; JAKOB, 2004). Algumas das consequências da oxidação proteica são: a redução ou a inativação da atividade enzimática, o dano a receptores, vias de transdução de sinais e de transporte (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O gossipol é um agente altamente reativo que interfere em numerosos processos fisiológicos tais como metabolismo e crescimento atuando como um inibidor enzimático não específico, afetando diversos tipos de reações essenciais para a sinalização celular.

Esta substância pode inibir uma variedade de enzimas, incluindo adenilato ciclase, proteína quinase C, DNA polimerase, topoisomerase, malato desidrogenase, lactato desidrogenase, glutathione-S-transferase, as enzimas envolvidas no transporte de íons, no metabolismo de nucleotídeos, na esteroidogênese e outras (QUIAN; WANG, 1984; UENO et al., 1988). Neste estudo, o tratamento dos animais com gossipol não promoveu alteração na concentração de grupos tióis de proteínas indicando que o seu efeito sobre as enzimas não está relacionado com sua ação oxidante sobre este grupo.

As mitocôndrias desempenham uma função crucial na manutenção dos processos celulares dependentes de ATP e são reconhecidas como alvo potencial de toxicidade induzida por xenobióticos, sendo que uma grande variedade destes compostos tem sido descritos como desacopladores da fosforilação oxidativa. Os desacopladores diminuem a eficiência da produção de ATP pelo aumento na permeabilidade da membrana interna ou pela diminuição do grau de acoplamento entre a força próton-motriz e os complexos da fosforilação. O mau funcionamento da bioenergética mitocondrial instantaneamente transforma as mitocôndrias de “casa de força” celular para “forno” molecular, desperdiçando a energia metabólica dos substratos (WALLACE; STARKOV, 2000).

A disfunção mitocondrial é um mecanismo patogênico fundamental de várias toxicidades significantes em mamíferos (SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002), e ainda, a diminuição dos níveis de ATP afeta a funcionalidade do espermatozoide (UENO, 1988). Assim sendo, a fim de investigar se a interferência do gossipol sobre a fertilidade está relacionada com uma ação da substância sobre as mitocôndrias e a possível proteção da vitamina E, foram realizados experimentos para avaliar seus efeitos na bioenergética de mitocôndrias isoladas de testículos de rato.

De acordo com os resultados deste trabalho, o gossipol apresentou efeito desacoplador da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa e ainda, dissipou o potencial de membrana mitocondrial, enquanto que a vitamina E apresentou efeito protetor sobre esses parâmetros. Esses resultados do gossipol estão de acordo com os apresentados por Martinez et al. (1988), Martinez (1992), Martinez et al. (1993) quando avaliaram o efeito do gossipol em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e encontraram que o gossipol teve efeito desacoplador e ainda estimulou a atividade

da ATPase. Santana et al., 2012 que avaliaram o efeito *in vitro* do gossipol nas doses de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 μM em mitocôndrias isoladas de testículo de ratos também observou que o gossipol possuía efeito desacoplador, além de dissipar o potencial de membrana e inibir a síntese de ATP. Entretanto, quando utilizado em altas doses (75 μM) o gossipol apresentou efeito inibidor da cadeia respiratória em mitocôndrias testiculares (KIM; WALLER, 1984). Ainda em estudos realizados por Abou-Donia e Dieckert (1974), o gossipol produziu efeitos adversos em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, estimulando a respiração mitocondrial em baixas concentrações e inibido em concentrações elevadas e estimulou a atividade da ATP sintase em baixas concentrações e inibido em concentrações elevadas.

Uma possível explicação para a dissipação no potencial de membrana provocado pelo gossipol em mitocôndrias isoladas de testículos pode estar relacionada à ruptura da homeostase intracelular de Ca^{2+} (SKULACHEV, 1999; MARTINEZ et al., 1993). Quando as mitocôndrias estão expostas ao gossipol, ocorre a ruptura da homeostase intracelular do íon. Ao ter sua concentração aumentada no citoplasma da célula a mitocôndria capta os excedentes por um canal chamado uniporter (UP). Segundo Brookes et al. (2004) a captação do íon pelo UP é dependente do potencial de membrana, portanto, o movimento de cargas devido à captação do cálcio consome o potencial de membrana formado.

Ao desacoplar a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa e inibir a formação do potencial de membrana mitocondrial, seria esperado que o gossipol reduzisse a concentração intracelular de ATP. Esse efeito foi observado no grupo tratado com o gossipol e recuperado no grupo tratado com gossipol e vitamina E, mostrando que a vitamina E exerceu a função protetora sobre o efeito toxicológico do gossipol. Ueno, 1988 observou que o gossipol diminui a produção e a utilização de ATP e essa queda na produção de ATP está diretamente relacionada à diminuição na taxa de motilidade dos espermatozoides. Em estudos realizados *in vitro* por Wichmann et al. (1983) em espermatozoides incubados com gossipol, também foi observada uma queda drástica na produção de ATP enquanto que os níveis de ATP se mantiveram inalterados no grupo controle. Além disso, a redução da concentração de ATP nos testículos pode ter contribuído para a diminuição do

número de espermatozoides observada neste estudo, uma vez que a energia é necessária no processo de espermatogênese (GROOTEGOED et al, 1984).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste estudo pode se concluir que o mecanismo de toxicidade do gossipol sobre os testículos de rato consiste na indução do estresse oxidativo e diminuição da bioenergética mitocondrial, levando assim a danos nas membranas celulares e à redução na produção de ATP, que somados levam a uma queda da taxa de fertilidade. O tratamento dos animais com a vitamina E mostrou-se eficiente na prevenção dos danos oxidativos e na bioenergética provocados pelo gossipol. Dessa forma, pode-se sugerir o uso da vitamina E em animais sujeitos à intoxicação pelo gossipol.

8. REFERÊNCIAS

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

ABOU-DONIA, M. B.; LYMAN, C. M.; DIECKERT, J. W. Metabolite fate of gossypol: The metabolism of ^{14}C -gossypol in rats. **Lipids**, v.5, n.11, p.938-946, 1970.

AITKEN, R. J.; BAKER M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.250, n.1, p.66-69, 2006.

AITKEN, R. J. et al. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **J. Androl.**, v.10, p.214-220, 1989.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, v.302, p.141-145, 2001.

AMARAL, S. et al. Testicular aging involves mitochondrial dysfunction as well as an increase in UCP2 levels and proton leak. **FEBS Letters**, v.582, p.491-496, 2008.

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

ALFORD, B. B., LIEPA, G. U., VANBEBER, A. D. Cottonseed protein, what does the future hold. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v.49, p.1-11, 1996.

ALVES, A. F. et al. Substituição do farelo de soja por farelo de algodão de alta energia em dietas para vacas leiteiras em produção: consumo, digestibilidade dos nutrientes, balanço de nitrogênio e produção leiteira. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.3, p.532-540, 2010.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotix tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.**, v.22, p.1061-1069, 2001.

BARJA G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Res.**, v.10, p.215-223, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARROS, L. V. et al. Replacement of soybean meal by cotton seed meal 38% in multiple supplements for grazing beef heifers. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.4, p.852-859, 2011.

BENDER, H. S.; DEROLF, S. Z.; MISRA, H. P. Effects of gossypol on the antioxidant defense system of the rat testis. **Arch. Androl.**, v.21, n.1, p.59-70, 1988.

BLIER P. U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R. S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends Genet.**, v.17, p.400-406, 2001.

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

BROCAS, C. et al. Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes and embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, p.901-907, 1997.

BROOKES, P. S. et al. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.287, p.C817-C833, 2004.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v.52, p.302-310, 1978.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid, peroxidation, trocopherol, and ascorbato. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.300, p.535-543, 1993.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: Ed. FACTA, 2002. 430p.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.), **Biochemical Toxicology**, Oxford, IRL Press, p.217-254, 1987.

CALAMERA, J. C. et al. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v.33, n.2, p.79-86, 2001.

CARVALHO, W. L. et al. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, n.3, p.339-344, 2013.

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

CHONGTHMMAKUN, S. Effects of gossypol on human and monkey sperm motility in vitro. **Contraception**, v.34, p.323-331, 1986.

COMBS, G. F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. New York: Academic Press, 1992.

DANDEKAR, S. P. et al. Lipid Peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **J. Postgrad. Med.**, v.48, n.3, p.186-190, 2002.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertil. Steril.**, v.72, n.3, p.484-495, 1999.

DOWNLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v.276, p.1737-1745, 2009.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v.82, p.47-95, 2002.

EFSA – European Food Safety Authority. Gossypol as undesirable substance in animal feed - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **The EFSA Journal**, v.908, p.1-55, 2008.

ELBETIEHA, A.; ISA, D. A. A. S. Assessment of antifertility activities of abamectin pesticide in male rats. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.55, p.307-313, 2003.

EL-DEMERDASH, F. M. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v.18, c.1, p.113–121, 2004.

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

EMBRAPA. **Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar**: subprodutos do algodão. 2003. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/subprodutos.htm>>. Acesso em: 9 jun. 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit, Fishstat Plus**: Vers, 2. Roma: FAO, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>>. Acesso em: 9 jun. 2009.

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

GAMBOA, D. A. et al. Use of expanded cottonseed meal in broiler diets formulated on a digestible amino acid basis. **Poultry Science**, v.80, n.6, p.789-794, 2001.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **Int. J. Androl.** v.21, p.81-94. 1998.

GROOTEGOED, J. A.; JANSEN, R.; VAN DER MOLEN, H. J. The role of glucose, pyruvate and lactate in atp production by rat Spermatocytes and spermatids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.767, p.248-256, 1984.

HAFER, A. P. Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study. **Biol. Reprod.**, v.28, p.1000-1003, 1983.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 704p.

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

HISSIN, P. J., HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v.74, c.1, p.214–226, 1976.

HSU, P. C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicol.**, v.128, n.3, p.169-179, 1998.

IEA - Instituto de Economia Agrícola. Mercado de Produtos. **Informações Econômicas**, v.24, n.9, p.43-50, 1994.

IRVINE, D. S. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **J. Androl.**, v.21, p.33-44, 2000.

JORDÃO JÚNIOR, A. A. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.31, p.434-449, 1998.

KIM, I.; WALLER, D. P. Specific inhibition of the testicular mitochondrial respiratory chain *in vitro* by gossypol. **J. Androl.**, v.5, p.424-430, 1984.

KODAMA, H. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertil. Steril.**, v.68, n.3, p.519-24, 1997.

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

LEICHERT, L. I.; JAKOB, U. Protein thiol modifications visualized in vivo. **PLoS Biol.**, v.2, n.11, e333, 2004. doi:10.1371/journal.pbio.0020333

LEMASTERS, J. J.; HACKENBROCK, C. R. Continuous measurement and rapid kinetics of ATP synthesis in rat liver mitochondria, mitoplasts and inner membrane vesicles determined by firefly-luciferase luminescence. **Eur. J. Biochem.**, v.67, p.1-10, 1976.

LIMA JUNIOR, D. M. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Vet. Brasilica**, v.3, n.4, p.132-143, 2010.

LIU G. Z.; LYLE C. K.; CAO J. Trial of gossypol as a male contraceptiveIn: Segal S.J. (ed.). **Gossypol: a potential contraceptive for men**. New York: Plenum Press, p.9-16, 1985.

LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, v.45, p.2017-1024, 1993.

MACHILIN, L. J. **Handbook of vitamins**: nutritional, biochemical, and clinical aspects. New York: Marcel Dekker, Inc, 1984. 632 p.

MARCATO, S. M.; LIMA; G. J. M. M. Efeito da restrição alimentar como redutor do poder poluente dos dejetos de suínos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.34, p.855-863. 2005.

MARTINEZ, F. The antifertility agent, gossypol, changes several mitochondrial functions in the presence of Mg²⁺. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v.103, n.1, p.87-90, 1992.

MARTINEZ, F.; GAMBOA, S.; DÍAZ-SÁNCHEZ, V. Biochemical effects of gossypol in isolated mitochondria: monovalent cations and ATPase activity. **Int. J. Biochem.** v.20, n.2, p.189-192, 1988.

MARTINEZ, F. et al. The antifertility agent, gossypol, releases calcium from rat liver mitochondria. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v.104. n.1, p.165-169, 1993.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. In: MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.11, p.132-155, 2007.

MELLO, G. et al. Farelo de algodão em rações para suínos nas fases de crescimento e terminação. **Arch. Zootec.**, v.61, n.233, p.55-62, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antônio Simões. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap.19, p.515-537.

NORDBERG, J.; ÁRNER E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol. Med.**, v.31, p.1287-1312, 2001.

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available? **Toxicol. Lett.**, v.134, p.17-30, 2002.

PEYSTER, A. et al. Oxygen radical formation induced by gossypol in rat liver microsomes and human sperm. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.118, n.2, p.573-579, 1984.

QUIAN, S. Z.; WANG, Z. G. Gossypol: A potential antifertility agent for males. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.24, p.329-360, 1984.

PRZYBYLSKI, PIOTR. Spectroscopic and semiempirical study of Gossypol complexes with Fe⁺² and Fe⁺³ cations. **J. Mol. Struct.**, v.569, p.147-155, 2001.

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

RANGEL, A. H. N.; LIMA JÚNIOR, D. M. Subprodutos agroindustriais na alimentação de vacas de leite, In: BRITO, A. S.; NOBRE, F. V.; FONSECA, J. R. R. (ed.). **Bovinocultura Leiteira**. Natal: Informações Técnicas e de Gestão - SEBRAE-RN, 2010. p.37-66.

RICHETTI, A.; MELO FILHO, G. A. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. ALGODÃO: TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO, 2001, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa, 2001. p.13-34.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v.21, n.3, p.133-149, 2005.

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

SANTANA, A. T.; GUELFÍ, M.; MINGATTO, F. E. Inibição da síntese de ATP causada pelo gossypol em mitocôndrias isoladas de testículo de rato. In: ENCONTRO DE ZOOTECNIA, VIII SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS e XXIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9., 2012, Dracena. **Anais...** Dracena: UNESP, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v.25, p.192-205, 1968.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.25, p.1058-1071, 1986.

SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H. Plant Phenolics. In: **Toxicants Occurring Naturally in Foods**. Washington: National Academy of Sciences, p.309-345, 1973.

SKULACHEV, V. P. Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Mol. Aspects Med.**, v.20, n.3, p.139-184, 1999.

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

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, n.3, p.456-461, 2007.

SULEIMAN, S. A. et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **J. Androl.**, v.17, p.530-537, 1996.

SZEWCZYK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacol. Rev.**, v.54, n.1, p.101-127, 2002.

TANYILDIZI, S.; BOZKURT, T. In vitro effects of linamarin, amygdalin and gossypol acetic acid on hyaluronidase activity, sperm motility and morphological abnormality in bull sperm. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.28, p.819-824, 2004.

TARÍN, J. J.; BRINES, J.; CANO, A. Antioxidant may protect against infertility. **Hum. Reprod.** v.13, n.6, p.1415-6, 1998.

THEROND, P. et al. alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. **Mol. Hum. Reprod.**, v.2, n.10 p.739-744, 1996.

TSO W. W.; LEE C. S.; TSO, M. Y. Effect of gossypol on boar spermatozoal adenosine triphosphate metabolism. **Arch. Androl.**, v.9, p.319-331, 1982.

UENO, H. Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. **Contraception**, v.3, p.333-341, 1988.

VALADARES FILHO, S. C. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 329p.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **R. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, p.47-53, 2007.

VELASQUEZ-PEREIRA, J. et al. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo development and viability in vivo and in vitro. **J. Dairy Sci.**, v.86, supl.1, p.240, 2003.

VELIKY, M. M. et al. Redox state of nicotinamide nucleotides and antioxidant enzyme activities in C-27 hepatoma tissue and liver of tumor-bearing rats. **Experim. Oncol.**, v.23, p.39-42, 2001.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.216, p.31-39, 2004.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.40, p.353-388, 2000.

WATSON, P. F.; The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WICHMANN, K. Effect of gossypol on the motility and metabolism of human spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.69, p.259-264, 1983.

WOUNG, W. Y. et al. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertil. Steril.**, v.73, n.3, p.435-442, 2000.

WU, E.Y. et al. Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.282, n.2, p.358-362, 1990.

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

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.201, p.255-265, 1980.

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

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