

Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol¹

Wanderson Luís de Carvalho², Marcos Antonio Maioli², Luiz Claudio Nogueira Mendes³, Daniela Bernadete Rozza³ e Fábio Erminio Mingatto^{2*}

ABSTRACT.- Carvalho W.L., Maioli M.A., Mendes L.C.N., Rozza D.B. & Mingatto F.E. 2013. [Mechanisms of the intoxication of rat liver caused by gossypol.] Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(3):339-344. Curso de Zootecnia, Campus Experimental de Dracena, Universidade Estadual Paulista, Rodov. Comandante João Ribeiro de Barros SP-294 Km 651, Dracena, SP 17900-000, Brazil. E-mail: fmingatto@dracena.unesp.br

The liver plays a central role in metabolism due to its interposition between the digestive tract and the general circulation of the organism. It is also the main organ involved in biotransformation of exogenous substances (xenobiotics), with ability to convert hydrophobic compounds in water-soluble, more easily eliminated by the body. Gossypol is a toxic phenolic substance present in cotton seed (*Gossypium* sp.). Aiming to study the mechanisms involved in the hepatotoxicity of gossypol we evaluate its effects on the antioxidant system of rat liver performing an experiment that investigated the oxidative stress and the histopathological alterations. In this study, we used Wistar rats, divided into two groups, one that received canola oil (vehicle, Control group) and another that received gossypol at a dose of 40mg/kg body weight of the animal for 15 days (Treated group). The treatment with gossypol caused alterations in the activity of seric enzymes that indicate hepatic injury and a significant oxidative stress characterized by a decrease of reduced glutathione (GSH) levels and a consequent increase in oxidized glutathione (GSSG), including further damage to the plasma membrane and organelles showed by lipid peroxidation. The result of histopathological evaluation showed degeneration of the hepatocytes.

INDEX TERMS: Oxidative stress, glutathione, gossypol, poisoning, liver.

RESUMO.- O fígado desempenha uma função central no metabolismo devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo. Ele é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo. O gossipol é uma substância fenólica tóxica presente na semente de algodão (*Gossypium* sp). Com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos

na hepatotoxicidade do gossipol avaliou-se os seus efeitos no sistema antioxidante do fígado de ratos no que diz respeito ao estresse oxidativo e aspectos histopatológicos. Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, separados em dois grupos, sendo que um recebeu óleo de canola (veículo, grupo Controle) e o outro recebeu gossipol na dosagem de 40 mg/kg de peso vivo do animal por 15 dias (grupo Tratado). O tratamento com gossipol promoveu alterações na atividade sérica das enzimas marcadoras de dano hepático e um significativo estresse oxidativo caracterizado pela diminuição nos níveis da glutathione reduzida (GSH) e consequente aumento da glutathione oxidada (GSSG), incluindo, ainda, danos à membrana plasmática e de organelas demonstrados pela peroxidação lipídica. O resultado da avaliação histopatológica demonstrou degeneração dos hepatócitos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estresse oxidativo, glutathione, gossipol, intoxicação, fígado.

¹ Recebido em 22 de outubro de 2012.

Aceito para publicação em 4 de fevereiro de 2013.

² Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica, Campus de Dracena, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Rodov. Comandante João Ribeiro de Barros SP-294 Km 651, Dracena, SP 17900-000, Brasil. *Autor para correspondência: fmingatto@dracena.unesp.br

³ Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil.

INTRODUÇÃO

A alimentação destaca-se como principal item associado aos custos de produção na exploração econômica de animais ruminantes e não ruminantes e torna-se, então, imprescindível o desenvolvimento de alternativas para minimizar o seu efeito sobre o custo nesta atividade (Vilela 2004).

O farelo de algodão é uma fonte protéica que se enquadra neste quesito, sendo bastante utilizado na alimentação de ruminantes no Brasil. Ele é o resíduo da obtenção do óleo, que pode ser feita tanto pelo esmagamento mecânico do caroço como através do uso de solventes, e é muito utilizado na nutrição animal por ser em termos quantitativos, uma excelente fonte de proteína vegetal, por estar amplamente disponível, possuir custo por unidade de proteína inferior ao farelo de soja, além de ser mais palatável e possuir bom perfil de aminoácidos o que permite a substituição de alimentos volumosos e concentrados sem prejudicar a fermentação ruminal (Embrapa 2003). Apesar da reconhecida qualidade dos subprodutos resultantes da indústria algodoeira como alimentos para os animais permanecem ainda os problemas resultantes da presença do gossipol nestes derivados. Além disso, métodos modernos de extração de óleo têm aumentado a concentração deste composto fenólico nos subprodutos (Bunge Alimentos 2009).

O gossipol ($C_{30}H_{30}O_8$) está especialmente presente na parte interna da semente do algodão e confinado em glândulas como corpos ovo-esferoidal com diâmetros de entre 100 e 400 μm . 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 e Kratzer 1973).

Por ser um inibidor enzimático inespecífico, alterando desta forma a divisão celular, o gossipol passou a ser utilizado no tratamento da endometriose (Zhang et al. 1994) e no controle do câncer, principalmente de mama e genital, apresentando bons resultados (Band et al. 1989).

Nos ruminantes a molécula de gossipol não é metabolizada pelas bactérias do rúmen nem pelo animal (Abou-Donia 1976). Ela se une às proteínas que contém aminoácidos livres, impedindo seu metabolismo (Reiser 1962). As ligações com proteínas (Nikokyris et al. 1991), bem como altos níveis de ferro na dieta podem inativar os pontos de ligação do gossipol, diminuindo sua toxicidade. A peletização também resulta em diminuição de sua atividade (Barraza et al. 1991). Os subprodutos do algodão, principalmente aqueles nos quais o gossipol ainda não foi inativado, não são recomendados para bezerros, devido à alta suscetibilidade dos monogástricos (antes do fechamento da goteira esofágica) à intoxicação (Coppock et al. 1987).

Ovinos criados em confinamento alimentados com caroço de algodão apresentaram lesões com grande quantidade de fluído proteináceo amarelo em todas as cavidades corporais, degeneração e necrose do miocárdio e necrose centro-lobular hepática (Bovino et al. 2008).

O fígado desempenha função central no metabolismo pois recebe nutrientes e xenobióticos que são por ele absorvidos, transformados, armazenados e liberados no sangue além de produzir e armazenar a bile. As atividades de biotransformação dos xenobióticos são realizadas pelo

fígado principalmente pelo citocromo P450. Grande parte dessas reações está associada à desintoxicação, porém elas podem representar um grande problema, pois os metabólitos produzidos podem ser altamente reativos e mais tóxicos que o composto de origem (Guillouzo 1998).

Nos hepatócitos as reações que causam depleção de glutathiona reduzida (GSH) resultam no estresse oxidativo, que é um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, a favor do estado pró-oxidativo. Ele pode ser causado pelo acúmulo de produtos oxidativos normais do metabolismo celular ou da ação de substâncias químicas tóxicas. O ciclo redox da glutathiona reduzida (GSH) é um sistema protetor que minimiza a lesão celular do estresse oxidativo. As espécies químicas oxidantes convertem a GSH em seu dissulfeto glutathiona oxidada (GSSG) por meio da ação da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), sendo a GSH regenerada pela glutathiona redutase (GSH-Rd). Quando os níveis celulares de GSH diminuem a defesa celular contra compostos tóxicos é prejudicada, podendo resultar em morte celular (Robbins et al. 2005).

Partindo-se da hipótese de que o gossipol pode gerar estresse oxidativo e consequentes danos celulares estruturais, o objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade do gossipol avaliando-se os seus efeitos sobre o sistema antioxidante, incluindo avaliação de danos celulares pela peroxidação de lipídios, dosagem da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e análise histopatológica do tecido hepático.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Campus Experimental de Dracena (Protocolo 2/2011). Os animais utilizados nesse estudo foram ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 200 e 240g. Estes foram alojados em gaiolas para experimentação com animais de laboratório, com dimensões de 49cm x 34cm x 16cm (comprimento x largura x altura) em um ambiente controlado com temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$ com ciclo de luz de 12 h, recebendo alimentação específica para roedores e água *ad libitum*; os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 5 animais cada de acordo com os tratamentos:

Grupo 1 (Controle) recebeu óleo de canola em volume calculado para ser semelhante aos ratos tratados, sendo observado uma administração de 1mL de óleo por kg de peso do animal, por gavagem gástrica durante 15 dias.

Grupo 2 (Tratado) recebeu solução de Gossipol Ácido Acético (Sigma-Aldrich) na dosagem de 40 mg por kg de peso vivo do animal dissolvido em óleo de canola como veículo, por gavagem gástrica por um período de 15 dias.

Ratos tratados e controle foram eutanasiados por decapitação com guilhotina sob anestesia com éter etílico. As amostras de sangue foram coletadas individualmente após a decapitação em tubos tipo "Falcon" de 15mL, e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para coagulação. O soro foi separado por centrifugação, com velocidade de 3000g por 15 minutos.

A atividade sérica das enzimas indicadoras de funções hepáticas (ALT e AST) foi determinada por meio de "kit" comercial de

dosagem enzimática (Bioclin, Belo Horizonte/MG) de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em comprimento de onda igual a 340nm em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800, sob agitação e temperatura (37°C) controladas. As amostras de soro foram diluídas 10 vezes em solução salina 0,9% e foram utilizados 100µL de cada amostra para 1000µL do reagente de trabalho. A dosagem da atividade foi obtida por meio de curva padrão descrita no manual do fabricante.

Amostras de fígado com tamanho de aproximadamente 1cm x 1cm foram coletadas dos animais tratados e controle sendo fixadas em formol tamponado 10% pH 7,4. Posteriormente foram processadas para estudo histopatológico e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). A preparação das lâminas foi realizada no Laboratório de Morfologia da Placenta e Embrião (L@MPE) do Curso de Zootecnia da Unesp, Campus Experimental de Dracena. A análise das estruturas foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp, Campus de Araçatuba.

Para a preparação do homogenato de fígado, partes do órgão foram coletadas e colocadas em aproximadamente 50mL de meio contendo sacarose 250mM, EGTA 1 mM e HEPES 10mM, pH 7,2, a 4°C, sendo picotadas e levadas para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen e homogeneizado 3 vezes por 15 s com intervalos de 1 minuto.

A determinação de proteína foi realizada por meio da reação do biureto, usando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Cain & Skilleter 1987).

A peroxidação dos lipídios de membrana foi determinada no homogenato do fígado dos animais tratados e controle por meio da formação do malondialdeído (MDA), o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O homogenato (5mg de proteína) foi colocado em tubo de ensaio e foram adicionados 0,2mL de SDS 8,1% (p/v), 1,5mL de ácido acético 20% (v/v), 1,5mL 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 10UV (Thermo Spectronic, Rochester, EUA). A concentração do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

A determinação do nível de GSH no homogenato do fígado dos animais tratados e controle foi realizada utilizando-se tubos do tipo "Eppendorf" de 2mL onde foram colocados 1mL de meio contendo sacarose 125mM, KCl 65mM e HEPES-KOH 10mM, pH 7,4, homogenato (1mg de proteína) e 500 µL de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 *g* por 3 min. Em tubos de 5mL foram colocados 1780µL de tampão contendo NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5mM, 200 µL do sobrenadante obtido da centrifugação e 20µL de DTNB 10mM completando o volume final de 2mL; no "branco", foram adicionados 1980µL do tampão e 20 µL do DTNB. Em seguida os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800, no comprimento de onda de 412nm e a concentração de GSH foi estimada por meio de uma curva padrão.

Para dosagem da GSSG, 250µL do sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra do item anterior e foram adicionados em tubos tipo "Eppendorf" de 2mL com o acréscimo de 250µL de *N*-etilmaleimida (NEM) 0,04 M e 500µL de NaOH 1 M. Após a

incubação por 20 minutos à temperatura ambiente 100µL desta mistura foram retirados e transferidos para tubos de ensaio onde foram adicionados 2mL de NaOH 1 M e 100mL de *o*-ftalaldeído (OPT) 1% e a mistura foi incubada por 15 minutos. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro RFPC 5301 (Shimadzu, Japão) com comprimento de onda de 350 e 420nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 5 em ambos os casos.

A significância estatística dos dados experimentais do grupo tratado em relação ao controle foi avaliada pelo teste *t* de Student, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, Graphpad Software (San Diego, CA, USA). Os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Na análise da variação do peso dos animais durante o período do tratamento foi evidenciado uma diminuição significativa nos ratos do grupo tratado, conforme apresentado na Figura 1.

A análise histopatológica dos fígados dos animais do grupo controle demonstrou hepatite mista discreta e moderada caracterizada por infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear com predominância de células

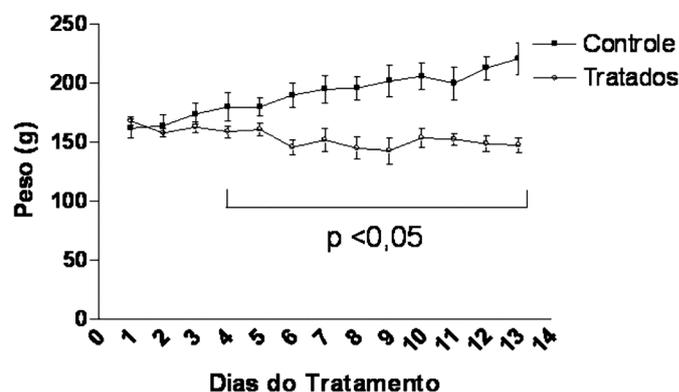


Fig.1. Variação de peso dos animais dos grupos Controle e Tratado no decorrer do experimento. Os valores representam a média \pm desvio padrão da média de 5 animais para o grupo controle e 5 para o grupo tratado.

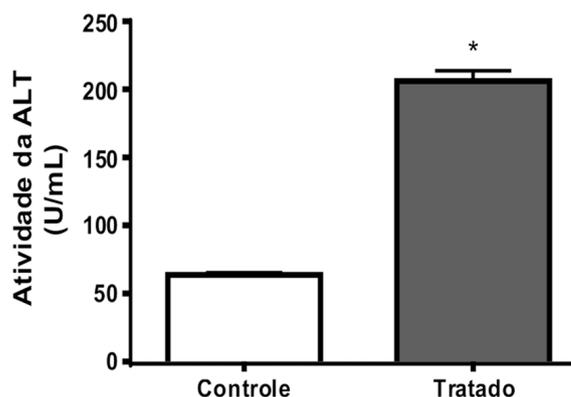


Fig.2. Atividade da enzima ALT, avaliada no soro de ratos controle (óleo de canola) e tratados com gossipol (40mg/kg de peso corporal por 15 dias). Os resultados representam a média \pm EPM de quatro animais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

polimorfonucleares. Nos fígados dos animais do grupo tratado ficou evidenciada presença de hepatite mista discreta a acentuada e degeneração moderada dos hepatócitos, além de degeneração gordurosa moderada a acentuada em apenas um animal.

As atividades da enzima ALT e AST nas amostras de soro dos animais controle e tratados com gossipol estão mostradas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Os dados obtidos caracterizaram aumentos significativos da atividade sérica de ambas as enzimas, sendo isto utilizado como parâmetro para lesão hepática provocada pelo gossipol.

Outro dado relevante demonstrado nesse estudo foi o importante aumento na concentração de malondialdeído (MDA), como pode ser observado na Figura 4. Concomitantemente ao aumento na concentração de MDA, ocorreu uma diminuição significativa do nível de GSH no homogenato de fígado dos animais tratados com o gossipol em relação ao grupo controle (Fig.5), indicando que o gossipol induziu a oxidação da glutatona gerando o seu homodímero glutatona oxidada (GSSG), apresentando assim um aumento na concentração de GSSG dos animais tratados em relação aos animais controle (Fig.6).

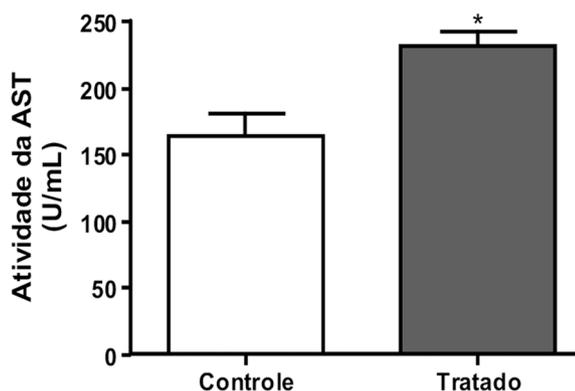


Fig.3. Atividade da enzima AST, avaliada no soro de ratos controle (óleo de canola) e tratados com gossipol (40mg/kg de peso vivo por 15 dias). Os resultados representam a média \pm EPM de quatro animais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

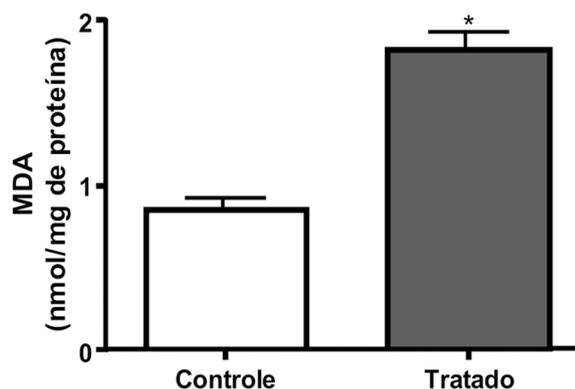


Fig.4. Lipoperoxidação no homogenato de fígado de ratos controle (óleo de canola) e tratados com gossipol (40mg/kg de peso vivo por 15 dias). Os resultados representam a média \pm EPM de quatro animais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

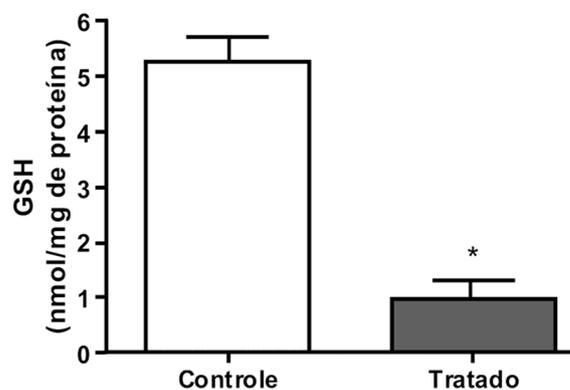


Fig.5. Níveis de glutatona reduzida (GSH) no homogenato de fígado de ratos controle (óleo de canola) e tratados com gossipol (40mg/kg de peso vivo por 15 dias). Os resultados representam a média \pm EPM de quatro animais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

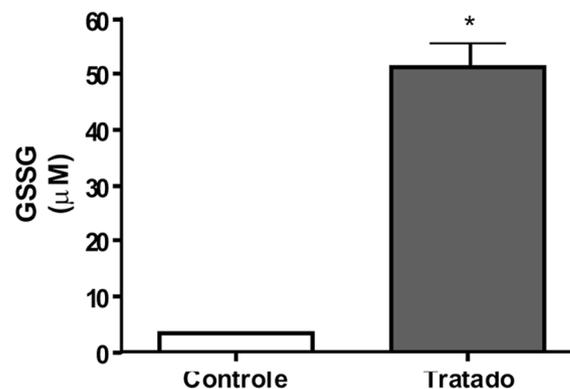


Fig.6. Níveis de glutatona oxidada (GSSG) no homogenato de fígado de ratos controle (óleo de canola) e tratados com gossipol (40mg/kg de peso vivo por 15 dias). Os resultados representam a média \pm EPM de quatro animais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As células de mamíferos possuem um mecanismo de proteção que tem a função de minimizar os danos provocados pelo metabolismo normal da célula e o de compostos tóxicos, sendo o maior sistema protetor celular o ciclo redox da glutatona (Reed 1986). A glutatona exerce sua ação protetora de duas formas, pois pode tanto atuar como agente nucleofílico ligando-se a um grande número de compostos e seus metabólitos, convertendo centros eletrofílicos em ligações tioeter, e também servindo de substrato para a glutatona peroxidase, mediando a quebra dos hidroperóxidos (Reed 1990).

Os animais do grupo tratado apresentaram diminuição em torno de 60% nas concentrações de GSH, e segundo Moldéus & Quanguan (1987) a diminuição dos níveis de glutatona em 20 a 30% são suficientes para prejudicar a defesa da célula contra agentes tóxicos, inclusive a morte. Acompanhado da diminuição os níveis de GSH, foram observados aumentos nos níveis de GSSG nos animais que receberam gossipol, alterando a relação GSH/GSSG. Uma possível explicação para a inversão dessa relação é o fato do gossipol ser altamente reativo (Lin et al. 1993) e sua

toxicidade, de acordo com Wong et al. (1972), envolve sua habilidade em se ligar a macromoléculas como proteínas (como as proteínas funcionais) ou as bicamadas lipídicas das membranas celulares, modificando sua estrutura.

As alterações encontradas no ciclo redox da glutatona em nossos experimentos vão de encontro aos apresentados por El-Sharaky et al. (2010), que avaliou o efeito do gossipol em ratos que receberam doses de 5, 10 e 20mg/kg de peso vivo via intraperitoneal, pois foram observados aumentos progressivos nas concentrações de GSH e reduções nos níveis de GSSG. Essas divergências são justificáveis 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. Além disso, fatores associados ao delineamento experimental (maior período de tratamento, dosagens superiores de gossipol e via de administração) influenciam a atividade de compostos químicos.

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 resultados são condizentes aos apresentados neste estudo, visto que ocorreu uma elevação na formação do MDA em tecidos hepáticos dos animais tratados, indicando a ocorrência da peroxidação lipídica. Bender et al. (1988) relataram que o gossipol poderia induzir a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é altamente tóxico para as células e provocar, conseqüentemente, uma elevação da atividade específica de GSH-Px, enzima responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O .

A degeneração dos hepatócitos observada no fígado dos animais tratados com gossipol pode ter ocorrido em função da facilidade da interação com as proteínas através de interação não-covalente ou ligação covalente entre os grupos aldeído do gossipol e os grupos amina das proteínas celulares, pela formação da base de Schiff (Strom-Hansen et al. 1989) e também pela redução da captação de glicose pelas células (Fornes et al. 1993). Associado a essa deficiência na captação de nutrientes, devido à reatividade do gossipol, está a ação desacopladora do composto (Reyes & Benos 1988, Reyes et al. 1988), que faz com que a mitocôndria rapidamente seja transformada de casa de força da célula para uma fornalha molecular, pois esta passa a desperdiçar a energia metabólica resultante da oxidação dos substratos (Wallace e Starkov 2000), interferindo no processo metabólico para obtenção de energia, explicando a redução no ganho de peso dos animais do grupo tratado.

Como conseqüência do não aproveitamento dos nutrientes ocorre a degradação do tecido adiposo que leva ao aumento do fluxo de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma, sendo estes encaminhados ao fígado para serem convertidos em lipoproteínas (alta e baixa densidade) e então distribuídos aos tecidos para utilização. No entanto, de acordo com Postic & Girard (2008), quando a degradação do tecido adiposo ocorre de maneira excessiva, os AGNE se acumulam no citoplasma dos hepatócitos, e em casos mais severos torna-se degeneração gordurosa, conforme observado em um dos animais tratados.

A redução da defesa antioxidante e o aumento na produção do malondialdeído (MDA) estimulados pelo gossipol levou à oxidação dos lipídios de membrana dos hepatócitos (Guéraud et al. 2010) aumentando assim a permeabilidade da membrana celular, o que conseqüentemente desencadeou a liberação de transaminases séricas (ALT e AST), visto que foram observados aumentos significativos da atividade dessas enzimas no grupo tratado com gossipol.

Os nossos resultados mostram que o gossipol alterou o ciclo redox e o metabolismo celular, estimulando o aparecimento de hepatite mista e degeneração dos hepatócitos nos animais que receberam a substância.

REFERÊNCIAS

- Abou-Donia M. 1976. Physiological effects and metabolism of gossypol. *Residue Rev.* 61:125-160.
- Band V., Hoffer A.P., Band H., Rhinehardt A.E., Knapp R.C., Matlin S.A. & Anderson D.J. 1989. Antiproliferative effect of gossypol and its isomers on human reproductive cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* 3:273-277.
- Barraza M.L., Coppock C.E., Brooks K.N., Wilks D.L., Sauders R.G. & Latimer Jr G.W. 1991. Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:3457-3467.
- Bender H.S., Derolf S.Z. & Misra H.P. 1988. Effects of gossypol on the antioxidant defense system of the rat testis. *Arch. Androl.* 29:59-70.
- Bovino F., Cadioli F.A., Rozza D.B., Mendes L.C.N., Feitosa F.L.F., Araújo M.A. Teodoro P.H.M. & Peiró J.R. 2008. Intoxicação por gossipol em ovinos: relato de casos. *Vet. Zootec.* 15:24.
- Bunge Alimentos 2009. Farelo de algodão de alta energia. Disponível em <<http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3048>> Acesso em 8 jun. 2009.
- Cain K. & Skilleter D.N. 1987. Preparation and use of mitochondria in toxicological research, p.217-254. In: Snell K. & Mullock B. (Eds), *Biochemical Toxicology: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Coppock C.E., Lanham J.K. & Horner J.L. 1987. A review of the nutritive value and utilization of whole cottonseed, cottonseed meal, and associated by-products by dairy cattle. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 18:89-129.
- El-Sharaky A.S., Newairy A.A., Elguindy N.M. & Elwafa A.A. 2010. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. *Food Chem. Toxicol.* 48:3354-3361.
- Embrapa 2003. Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar: Subprodutos do algodão. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/subprodutos.htm>> Acesso em 9 jun. 2009.
- Fornes M.W., Barbieri A.M. & Burgos M.H. 1993. Sperm motility loss induced by gossypol: Relation with OH scavengers, motile stimulators and MDA production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:1289.
- Guéraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P.M., Huc L., Jouanin I., Siems W. & Uchida K. 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Rad. Res.* 44:1098-1124.
- Guillouzo A. 1998. Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ. Health Perspect.*, Washington, 106:511-532.
- Kovacic P. 2003. Mechanism of drug toxic actions of gossypol: Focus on reactive oxygen species and electron transfer. *Curr. Med. Chem.* 10:2711-2718.
- Lin T.S., Schinazi R.F., Zhu J., Birks E., Carbone R., Si Y., Wu K., Huang L. & Prusoff W.H. 1993. Anti-HIV-1 activity and cellular pharmacology of various analogs of gossypol. *Biochem. Pharmacol.* 46:251-255.
- Moldéus P. & Quanguan J. 1987. Importance of the glutathione cycle in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* 33:37-40.
- Nikokyris P., Andylis K.K., Deligiannis K. & Liamadis D. 1991. Effects of gossypol content of cottonseed cake on blood constituents in growing-fattening lambs. *J. Dairy Sci.* 74:4305-4313.

- Posti C. & Girard J. 2008. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Met.* 34:643-648.
- Reed D.J. 1986. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 35:7-13.
- Reed D.J. 1990. Glutathione: Toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:603-631.
- Reiser R. 1962. The mechanism of gossypol detoxification by ruminant animals. *J. Nutr.* 76:215-218.
- Reyes J. & Benos D.J. 1988. Specificity of gossypol uncoupling: A comparative study of liver and spermatogenic cells. *Am. J. Physiol.* 23:C571-C576.
- Reyes J., Borriero L. & Benos D.J. 1988. A bioenergetic model of gossypol action: Effects of gossypol on adult rat spermatogenic cells. *Am. J. Physiol.* 23:C564-C570.
- Robbins S., Kumar V. & Abbas A.K. 2005. Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças. 7ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 1592p.
- Singleton V.L. & Kratzer F.H. 1973. Plant phenolics, p.309-345. In: *Ibid.* (Eds), *Toxicants Occurring Naturally in Foods*. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Strom-Hansen T., Cornett C. & Jaroszewski J.W. 1989. Interaction of gossypol with amino acids and peptides as a model of enzyme inhibition. *Int. J. Protein Res.* 34:306-310.
- Vilela D. 2004. Produção de Leite em Pasto: atualidades e perspectivas futuras. *Anais Sul-Leite Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem, Viçosa, MG, p.419-463p. (Resumo)*
- Wallace K.B. & Starkov A.A. 2000. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:353-388.
- Wong R.C., Nakagawa Y. & Perlmann G.E., 1972. Studies on the nature of the inhibition by gossypol of the transformation of pepsinogen to pepsin. *J. Biol. Chem.* 247:1625.
- Zhang Y.W., Han M.L. & Wang Y.F. 1994. Estrogen and progesterone cytosol receptor concentrations in patients with endometriosis and their changes after gossypol therapy. *Chung Hua Fu Chang Ko Tsa Chih* 29:220-223.