

**TOXICIDADE DO GOSSIPOL NA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO  
DE RATAS (*Rattus rattus norvegicus*)  
(*Gossypol toxicity in pregnant and nursing rats – Rattus rattus norvegicus*)**

SILVA, M.A.<sup>1</sup>; KOZICKI, L.E.<sup>2</sup>; DALSENTER, P.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia; Bandeirantes – Paraná – Brazil.  
masilva@trigo.ffalm.br;

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária – UFPR;

<sup>3</sup>Departamento de Farmacologia - UFPR

**RESUMO** – Na presente pesquisa objetivou-se estudar os efeitos do gossipol ( $C_{30}H_{30}O_8$ ) na gestação e consequente lactação, de 40 ratas com idade média de 120 dias e peso variando entre 200 e 250 gramas, oriundas do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram acompanhados diariamente até a confirmação da cobertura através de esfregaço de lavado vaginal (esfregaço positivo - presença de espermatozoides) e separados em quatro grupos de dez animais: G I - controle, G II – gossipol 20 mg.kg<sup>-1</sup>, G III – gossipol 40 mg.kg<sup>-1</sup>, G IV - gossipol 80 mg.kg<sup>-1</sup> respectivamente de acordo com a concentração de gossipol presente na suspensão utilizada (gossipol 20 mg.mL<sup>-1</sup>, gossipol 40 mg.mL<sup>-1</sup> e gossipol 80 mg.mL<sup>-1</sup>). O gossipol ácido acético (GAA 97,8 % de pureza) diluído em óleo vegetal de canola (veículo) foi administrado oralmente para todos os animais no volume de 1 mL de suspensão para cada quilo de peso vivo. A administração da droga iniciou-se no 5º dia de gestação estendendo-se até o 20º. O peso das ratas foi aferido diariamente, do dia da cobertura até o dia do parto, a fim de se observar possíveis efeitos tóxicos durante a gestação. Durante a lactação as ratas e os filhotes eram pesados a cada 3 dias para acompanhar o desenvolvimento dos filhotes e recuperação materna. No desmame (21º dia pós-parto) todas as fêmeas foram sacrificadas para a observação dos pontos uterinos de implantação, comparando-se o número de fetos nascidos com o número de fetos gerados. Durante o experimento sete ratas do grupo G IV e uma do G III morreram, além de abortos e sinais de canibalismo na parturição. Observou-se como sinais de toxicidade: diarreia, inapetência, pelos eriçados, taquipnéa e perda de peso. Nenhum filhote apresentou alterações morfológicas macroscópicas. Concluiu-se que o gossipol (GAA) causou intoxicação grave nos animais que receberam maior dosagem, bem como interferiu no ganho de peso das ratas durante a gestação, peso ao nascimento e peso à desmama dos filhotes. Contudo não interferiu no processo de manutenção da gestação e no número de filhotes nascidos quando administrado entre o 5º e 20º dia de gestação.

**Palavras chave:** Gossipol, gestação, ratas, toxicidade.

**ABSTRACT** – In order to study the effects of gossypol ( $C_{30}H_{30}O_8$ ) in pregnancy and lactation, 40 female rats (120 days old) weighing between 200 and 250 grams, were used in this experiment. The animals were divided in four different group GI (n = 10), GII (n = 10), GIII (n = 10) and GIV (n = 10). The daily oral dose administered by gavage to the animals of each group was of 0, 20, 40 and 80 mg.kg<sup>-1</sup> respectively of gossypol dissolved in canole oil. All rats were weighed daily from the day of copulation (0 day) to the day of parturition, for evaluation of the toxic effects during pregnancy. All rats and their offspring were weighed on days 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 (day of weaning) of lactation. At the day of weaning, all rats were killed in order to observe the number of uterine implantation sites. Eight rats (1 from GIII group and 7 from GIV) died during the period of drug administration besides the occurrence of abortions and cannibalism at the parturition. Clinical symptoms of toxicity were diarrhea, inappetency, bristly hair, tachypnea, loss of weight. Neither pup displayed either macroscopic or morphological alterations. Heavy poisoning has been induced in rats that received higher doses of gossypol acetate as well as a dose-dependent decrease in body

weight gain in pregnant rats, lesser weight at birth and at weaning. Nevertheless, gossypol did not interfere in the maintenance of pregnancy and in the number of pups born when administered from day 5 through day 20 of pregnancy.

**Key words:** Gossypol, pregnancy, females, rats, toxicity.

### Introdução

O gossipol ( $C_{30}H_{30}O_8$ ) é pigmento amarelo de ocorrência natural em plantas da família *Malvaceae*, especialmente nas sementes das plantas do gênero *Gossypium* (ABOU-DONIA, 1976). Na nutrição animal, a semente e a torta resultante da semente do algodão (*G. hirsutum*), após a extração do óleo, representam a segunda fonte de proteína para a alimentação animal, ultrapassado somente pela soja. Os efeitos tóxicos do gossipol há muito tempo são conhecidos, principalmente em espécies monogástricas. Este fato limitou a utilização dos subprodutos desta lavoura na alimentação, principalmente, para aves e suínos (ANDRIGUETTO *et al.*, 1982).

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

O gossipol por ser um inibidor enzimático inespecífico (HERVE *et al.*, 1996), alterando desta forma a divisão celular, passou a ser utilizado no tratamento da endometriose (ZHANG *et al.*, 1994) e no controle do câncer, principalmente de mama e genital, apresentando bons resultados (BAND *et al.*, 1989; HU *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2002).

Muitas pesquisas com o gossipol foram desenvolvidas nos últimos 20 anos, visando seus efeitos contraceptivos tanto em machos como fêmeas, bem como, os seus possíveis mecanismos de toxicidade. Desta forma esse trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade do gossipol em interferir na manutenção da gestação e no número de filhotes nascidos, bem

como seus efeitos tóxicos nas fêmeas durante a gestação, lactação e desenvolvimento dos filhotes até a desmama.

### Material e Métodos

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

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

O acompanhamento do ciclo estral e a confirmação da cobertura foram feitos por esfregaço vaginal, segundo a técnica descrita por CHAHOUD e KWASIGROCH (1977), sendo a presença de um espermatozóide no esfregaço confirmativo de cobertura (dia 0).

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

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

**Preparo da droga:** O gossipol ácido acético, na forma pura (97,8%) e em pó,

foi dissolvido em óleo de canola em três diferentes concentrações, formando três diferentes suspensões da droga: 20 mg.mL<sup>-1</sup>, 40 mg.mL<sup>-1</sup> e 80 mg.mL<sup>-1</sup>.

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

*Delineamento Experimental e Tratamentos:* Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, onde foram testados quatro tratamentos com dez repetições em cada: Grupo I - Controle, Grupo II - Gossipol 20 mg.kg<sup>-1</sup>, Grupo III - Gossipol 40 mg.kg<sup>-1</sup> e Grupo IV - Gossipol 80 mg.kg<sup>-1</sup>.

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

Grupo I (G I)- 1 mL.kg<sup>-1</sup> de peso corporal de óleo de canola;

Grupo II (G II)- 1 mL.kg<sup>-1</sup> de peso corporal da suspensão contendo 20 mg.mL<sup>-1</sup>;

Grupo III (G III)- 1 mL.kg<sup>-1</sup> de peso corporal da suspensão contendo 40 mg.mL<sup>-1</sup>;

Grupo IV (G IV)- 1 mL.kg<sup>-1</sup> de peso corporal da suspensão contendo 80 mg.mL<sup>-1</sup>.

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

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

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

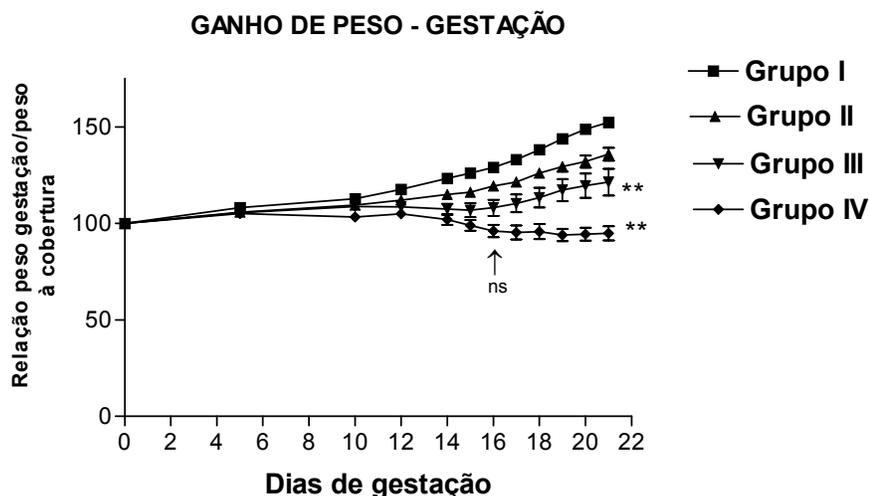
*Parto e Lactação:* No dia do parto, foi assinalado o peso da mãe, o número de filhotes nascidos (vivos e mortos) e o peso individual dos filhotes.

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

Ao desmame, todas as fêmeas foram sacrificadas para contagem do número de implantes uterinos, comparando desta forma, o número de fetos nascidos com o número de fetos gerados. As fêmeas que não pariram até o 25° dia pós-cobertura, foram também sacrificadas para a inspeção de pontos de implantação uterino.

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

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



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

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

## Resultados

**Ganho de Peso e Toxicidade na Gestação:** Os valores médios de ganho de peso das ratas de cada grupo nos dias 0, 5, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 de gestação estão na TABELA 1 e GRÁFICO 1. Conforme evidenciado, as ratas do grupo G I apresentaram maior média de ganho de peso, uma vez que quanto maior a dose recebida, menor a média de ganho por grupo; saliente-se o grupo que recebeu  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$ , o qual perdeu peso até o término da gestação. As fêmeas que morreram, tiveram seu último peso em vida repetido até o dia 21 da sua respectiva gestação.

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

Na TABELA 2 estão representadas as médias, por grupo, das porcentagens de peso no dia do parto em relação ao peso das ratas no dia da cobertura. Os grupos GI, GII, GIII e GIV apresentaram, respectivamente, peso ao parto de 118,1%; 110,6%; 97,0 % e 86,0% do peso

à cobertura, com os valores entre o grupo G I e G II diferentes estatisticamente ao nível de 5% e, entre G I e G III e G I e G IV diferentes ao nível de 1%. O GRÁFICO 1 demonstra a curva de ganho de peso durante a gestação para os quatro grupos estudados.

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

Durante a gestação, uma rata do grupo G III abortou, uma morreu no dia 17 e outras duas demonstraram sinais de canibalismo em todos os filhotes no dia do parto, ocorrendo o mesmo com uma rata do grupo G II. Das ratas do grupo G IV, somente uma rata prenhe sobreviveu ao período de gestação, sendo que uma morreu no dia 17, três no dia 18, duas no dia 20 e uma no dia 21 de gestação. O primeiro sinal clínico observado, em algumas ratas dois dias após o início da administração da droga, foi a presença de diarreia. As ratas, antes de morrerem, apresentavam sinais de emagrecimento, pelos eriçados,

apatia e taquipnéia. Todos animais que morreram foram necropsiados e amostras de tecido cardíaco, hepático, pulmonar, renal e muscular encaminhados para análise histopatológica.

TABELA 1 – GANHO DE PESO (% DO PESO À COBERTURA) DURANTE A GESTAÇÃO DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL. 2000. (n=40).

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

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

A rata do grupo G III que falhou na concepção manteve seu peso até o final do período de administração da droga, já as duas fêmeas do grupo G IV que

falharam na concepção perderam peso, porém permaneceram vivas e dois dias após o término da administração do gossipol passaram a ganhar peso.

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

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

\* (p ≤ 0,05)

\*\* (p ≤ 0,01)

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

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

*Período de Gestação* : O período médio da gestação foi de 22,75; 22,50; 22,43 e 22,00 dias, respectivamente, para as ratas

do grupo G I (n=8), G II (n=8), G III (n=7) e G IV (n=1), não havendo diferença estatística entre eles.

*Filhotes Nascidos*: Na TABELA 3 estão as médias dos números e dos pesos individuais ao nascimento de filhotes nascidos de ratas tratadas com gossipol durante a gestação. A média de filhotes nascidos para os grupos G I, G II e G III foram, respectivamente, 10,00; 7,71 e 10,20 filhotes. A única rata gestante do grupo G IV que sobreviveu matou todos

os filhotes logo após o parto, o mesmo ocorrendo com uma rata do grupo G II e duas do grupo G III. As médias encontradas para o número de filhotes nascidos não diferiram estatisticamente. Uma rata do grupo G II apresentou um filhote natimorto, ao passo que no grupo G III três ratas tiveram natimortos (duas ratas um e uma dois natimortos). Nenhum natimorto foi observado no grupo G I.

Os animais do grupo G I apresentaram maior peso ao nascer ( $6,29 \pm 0,74$  g),

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

TABELA 3 – NÚMERO E PESO AO NASCIMENTO DE FILHOTES NASCIDOS DE RATAS TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE GOSSIPOL DURANTE A GESTAÇÃO. 2000.

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

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

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

Os filhotes das ratas do grupo G I apresentaram o maior peso médio na desmama ( $36,42 \pm 5,45$  g), seguidos pelos filhotes das ratas do grupo G II ( $36,26 \pm 1,94$  g) e com os filhotes do grupo G III apresentando a menor média de peso ( $28,98 \pm 3,49$  g). Diferença significativa foi observada entre os grupos G I e G III ( $p \leq 0,01$ ).

Na data do desmame avaliou-se a porcentagem de filhotes machos. O grupo

G II apresentou a menor porcentagem de machos, sendo a diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo G I (G I  $53,14 \pm 11,26$  %; G II  $32,14 \pm 17,92$  %; G III  $49,67 \pm 14,0$  %).

As médias das porcentagens de fetos nascidos em relação ao número de implantes uterinos, para os grupos estudados, foram muito parecidas entre os grupos:  $94,00 \pm 7,07$ %;  $91,29 \pm 10,18$  % e  $91,80 \pm 14,74$  % respectivamente para os grupos G I, G II e G III, não havendo diferença entre eles.

## Discussão

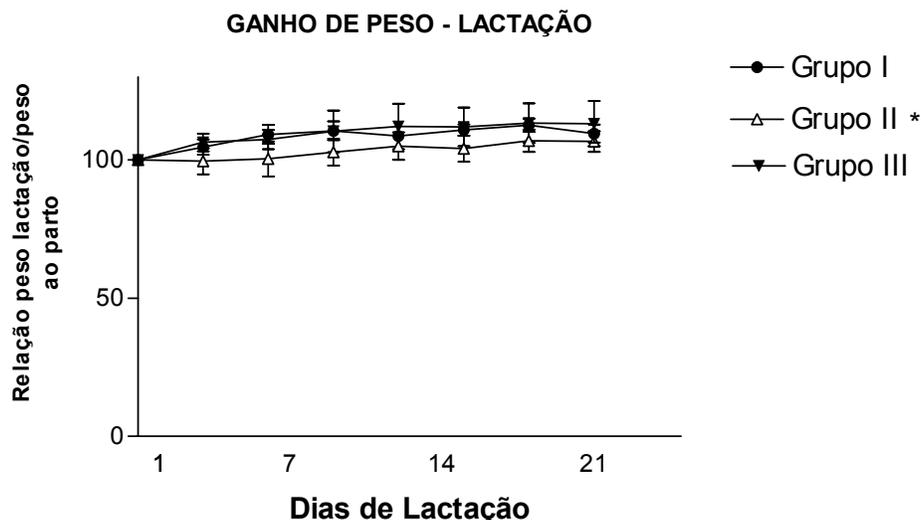
**Ganho de Peso e toxicidade na Gestação:** A partir dos valores médios de ganho de peso durante a gestação para os animais dos grupos controle e tratados observa-se uma relação de dose e tempo dependência, onde, quanto maior a dose administrada de gossipol, menor o ganho de peso apresentado. Os dados do GRÁFICO 1 representam os resultados da tabela 1, acusando a inexistência de diferença significativa no ganho médio de peso entre os grupos testados até o 16º dia de gestação. O ganhos de pesos

médios para as fêmeas dos grupos G IV e G III passaram a apresentar diferença significativa em relação ao grupo G I, respectivamente, a partir do dia 16 (dia 16  $p \leq 0,05$  e dia 17  $p \leq 0,01$ ) e dia 18 (dia 18  $p \leq 0,05$  e dia 20  $p \leq 0,01$ ) de gestação. O ganho de peso entre as fêmeas do grupo G I e G II não diferiu estatisticamente até o 21º dia de gestação.

Devido às diferenças de tamanho nas ninhadas, espera-se diferenças no ganho de peso durante a gestação entre os animais, assim, como parâmetro de toxicidade materna, avaliou-se a

porcentagem do peso materno ao parto em relação ao peso à cobertura. Como demonstrado na tabela 2 houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com gossipol, onde as ratas do grupo G II aumentaram o peso real até o parto, em média, 10,6% ( $p \leq 0,05$ ) ao passo que as ratas do grupo G I aumentaram 18,1%. As médias de ganho de peso real para as ratas dos grupos G III e G IV foram negativas, tendo as fêmeas do grupo G III perdido 3% ( $p \leq 0,01$ ) e a do grupo G IV 14% ( $p \leq 0,01$ ) de seu peso entre a cobertura e o parto.

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



\*  $p \leq 0,05$

Os sinais de toxicidade materna foram observados a partir do 12º dia de gestação (8º dia de administração da droga) nas ratas do grupo G III e G IV, estando elas apáticas, com pelos eriçados, secreção nasal, taquipnéia e, algumas apresentaram diarreia a partir do 2º dia de administração da droga. Os óbitos ocorreram a partir do dia 17 da gestação (12º dia de administração da droga), totalizando, até o dia 21 de gestação, 7 óbitos no grupo G IV e um no grupo G III. Canibalismo, no dia do parto, foi constatado em uma rata do grupo G II, duas do grupo G III e na única rata gestante sobrevivente do grupo G IV, não

se conseguindo desta forma, avaliar se os filhotes haviam nascidos vivos ou mortos. Houve ainda um aborto no grupo G III. Duas ratas do grupo G II apresentaram diarreia, mas se recuperaram antes do final da gestação. Nenhuma rata do grupo G I e G II demonstrou sinais de apatia e alterações respiratórias na inspeção diária até o final da gestação.

Os sinais observados são semelhantes aos sinais observados nas intoxicações pelo gossipol em outros mamíferos (SAKESENA *et al.*, 1981; PATTON *et al.*, 1985; HUDSON *et al.*, 1988; HASCHEK *et al.*, 1989; EAST *et al.*, 1994).

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

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

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

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

efeitos tóxicos do gossipol, pois as ratas apresentaram os mesmos efeitos de intoxicação, se não mais graves, e em menor tempo de administração da droga.

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

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

*Período e Manutenção da Gestação:* Não houve diferença estatística no período de gestação entre os grupos testados. A média do tempo de gestação ficou em 22 dias para todos os grupos, estando em conformidade com a fisiologia reprodutiva da rata (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977).

Segundo BAZER (1999), a gestação dos roedores está dividida em duas fases, separadas por eventos endócrinos distintos. O primeiro evento é a cobertura, que por arco reflexo neural, induz a ondas diurnas e noturnas de prolactina, que perduram até o dia 12 da gestação ou pseudogestação. O aumento da prolactina é necessário para a conversão do CL não funcional do ciclo estral em CL funcional da gestação. O segundo evento é dependente da implantação, que acontece até o quinto dia pós-fecundação, e do desenvolvimento de conceptos normais. A partir do sexto dia da gestação, a prolactina hipofisária deixa de ser estritamente necessária, ficando a manutenção da gestação, também a cargo dos lactogênios placentários.

Neste trabalho a administração do gossipol, após o quinto dia de gestação, não foi capaz de interromper a gestação, mesmo em doses que provocaram intoxicação grave nas fêmeas tratadas (40 e 80 mg.kg<sup>-1</sup>). Este fato vem colaborar os achados de LIN *et al.* (1985) que observaram não interrupção da gestação em ratas prenhes que receberam 12,5 ou 25 mg.kg<sup>-1</sup> de gossipol, por via intramuscular, entre o 7° e 14° ou 14° e 21° dia de gestação. Porém, quando estes autores iniciaram o tratamento no proestro e estenderam-no até o sétimo dia de gestação, observaram, através de laparotomia no oitavo dia de gestação, menos implantes uterinos naquelas fêmeas que receberam a maior dosagem, comparado às fêmeas controle, embora nenhum filhote nascera desses animais. Paralelamente, observou-se nessas fêmeas, significativa diferença nas concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol, estando estes abaixo dos valores encontrados para os animais do grupo controle. YANG e WU (1987) observaram, administrando 90 e 120 mg.kg<sup>-1</sup> de gossipol, entre o primeiro e quinto dia de gestação em ratas, bloqueio da gestação em 85 e 75% das fêmeas, respectivamente. Os autores acima concordam que esse fato é devido à baixa secreção de progesterona e estrógeno provocada pela administração do gossipol antes da fase de implantação dos fetos no útero, uma vez que a administração de hormônios exógenos (progesterona e estrógeno), durante essa fase (dia 0 ao 8 da gestação), foi capaz de manter a gestação até o final.

Os dados sugerem que o gossipol não é capaz de interromper a gestação em ratas, quando administrado após a fase de implantação dos embriões no útero, que ocorre até o quinto dia da prenhez. Dessa forma, o gossipol, em altas doses, pode interferir na transformação, mediada pela prolactina, do CL não funcional do ciclo estral em CL funcional da gestação, limitando assim a secreção de progesterona e estrógeno que são indispensáveis na manutenção inicial da gestação de ratas, fato este que ocorre

pouco antes e durante a fase de implantação uterina.

Após a fase de implantação, os lactogênios placentários assumem importante papel na manutenção da gestação, estimulando a produção de progesterona pelo corpo lúteo (BAZER, 1999). Como a administração de gossipol, após a fase de implantação, não induziu interrupção da gestação, acredita-se que, nas dosagens de gossipol utilizadas, os lactogênios placentários sejam capazes de manter a secreção de progesterona em níveis suficientes para manutenção da gestação, apesar de haver trabalho relatando queda na produção de progesterona durante a gestação em ratas tratadas com gossipol neste período (YANG e WU, 1987).

*Filhotes Nascidos:* As médias para os números de filhotes nascidos não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados (tabela 3). Porém as fêmeas do grupo G II apresentaram média de filhotes nascidos (7,71 ± 3,15) um pouco abaixo da média esperada para espécie (9 a 10 filhotes) segundo CHAHOUD e KWASIGROCH (1977). Já as médias dos números de filhotes nascidos para os grupos G I e G III estiveram dentro do normal esperado.

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

O aborto que ocorreu em uma rata do grupo G III foi detectado pela presença de pontos de implantação uterinos depois de

decorridos 25 dias da cobertura e sem o animal apresentar sinais de parição

Os resultados para o peso ao nascimento apresentados na tabela 3, mostram, mais uma vez, a relação de dose dependência para os efeitos do gossipol, onde, os filhotes do grupo G III, apresentaram média de peso inferior aos filhotes do grupo G I ( $p \leq 0,01$ ), contudo a média de peso ao nascimento esteve dentro do esperado para a espécie, segundo BIVIN (1986). O peso médio ao nascimento para os filhotes do grupo G II, que receberam  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ , não diferiu estatisticamente do grupo controle, resultado que também foi obtido por BEAUDOIN (1985), administrando a mesma dose para ratas entre o 6° e o 15° da gestação.

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

*Ganho de Peso Durante a Lactação:* Ao se comparar os resultados para o ganho de peso durante a lactação, em relação ao peso ao parto (GRÁFICO 2), observa-se maior ganho de peso para os animais do grupo G III, devido ao fato de ser o grupo que mais sofreu os efeitos tóxicos do gossipol durante a gestação. Assim com o término do tratamento, esses animais apresentaram maior ganho, porém sem diferir estatisticamente do grupo controle. Por outro lado, o ganho médio de peso para as fêmeas do grupo G II foi inferior aos das fêmeas do grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

Observando a TABELA 2, verifica-se que o período de lactação não foi suficiente para que as fêmeas dos grupos G II e G III ganhassem peso a ponto de alcançarem o peso das fêmeas do grupo G I, sendo que as fêmeas do grupo G I foram sacrificadas no dia do desmame pesando, em média, 30,4% a mais que no

dia da cobertura, as fêmeas do grupo G II 19,9% ( $p \leq 0,05$ ) e as do grupo G III 9,5% ( $p \leq 0,01$ ).

As médias para os pesos ao desmame dos filhotes de ratas tratadas com gossipol durante a gestação indicam, mais uma vez, a relação de dose dependência para toxicidade do gossipol. LANGERLOF e TONE (1985) observaram menor peso ao desmame em filhotes de ratas tratadas com gossipol utilizando a dose de  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Neste trabalho, os filhotes de ratas que receberam  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  não apresentaram ganho de peso inferior aos filhotes das ratas controle, contudo os filhotes das ratas que receberam  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  apresentaram menor ganho ( $p \leq 0,01$ ). O menor crescimento desses filhotes pode ter sido provocado pela menor produção de leite pelas mães, bem como, resquícios da ação tóxica do gossipol sobre a mãe na vida intrauterina, uma vez que também apresentaram menor peso ao nascimento.

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

## Conclusões

A partir dos resultados deste trabalho pode-se concluir:

- fêmeas durante a gestação são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do gossipol que os machos;
- a dose de  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$  foi extremamente tóxica para ratas gestantes;
- gossipol não interferiu na manutenção da gestação e no número de filhotes nascidos quando administrado entre o 5° e o 20° dia de gestação;
- filhotes de ratas tratadas com doses acima de  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  de gossipol durante a gestação, apresentaram

menor peso ao nascimento e menor ganho de peso até o desmame, contudo sem apresentar alterações morfológicas macroscópicas.

### Referências

- ABOU-DONIA, M. B. Physiological Effects and Metabolism of Gossypol. **Residue Reviews**, New York, v. 61, p. 125-160, 1976.
- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMING, J.S.; SOUZA, G.A.; BONA, A. **Nutrição Animal**. Curitiba : Nobel, 1982.
- BAND, V.; HOFFER, A.P.; BAND, H.; RHINEHARDT, A.E.; KNAPP, R.C.; MATLIN, S.A.; ANDERSON, D.J. Antiproliferative effect of gossypol and its isomers on human reproductive cancer cell lines. **Gynecologic Oncology**, Orlando, v. 32, n. 3, p. 273-277, 1989.
- BAZER, F.W. Maintenance of Pregnancy. In: KNOBIL, E.; e NEILL, J.D.; **Encyclopedia of Reproduction vol 3**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 1002-1006.
- BEAUDOIN, A.R. The embryotoxicity of gossypol. **Teratology**, New York, v. 32, n. 2, p.251-257, 1985;
- BENDER, H.S.; SAUNDERS, G.K.; MISRA, H.P. A histopathologic study of the effects of gossypol on the female rat. **Contraception**, New York, v. 38, n. 5, p 585-592, 1988.
- BIVIN, W.S. The Rat. In: MORROW, D.A.; **Current Therapy in Theriogenology 2**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986. p. 1015-1022.
- CHAHOU, I.; KWASIGROCH, T.E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D. **Methods in Prenatal Toxicology**. Stuttgart : G. Thieme Publishers, 1977. p. 78-91.
- EAST, N.E.; ANDERSON M.; LOWENSTINE, L.J. Apparent gossypol induced toxicosis in adult dairy goats. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 204, n. 4, p. 642-643, 1994.
- HASCHEK, W.M.; BEASLEY, V.R.; BUCK, W.B.; FINNELL, J.H. Cottonseed meal (gossypol) toxicosis in a swine herd. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 195, n. 5, p. 613-615, 1989.
- HERVE, J.C.; PLUCIENNIK, F.; BASTIDE, B.; CRONIER, L.; VERRECCHIA, F.; MALASSINE, A.; JOFFRE, M.; DELEZE, J. Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. **European Journal of Pharmacology**, New York, v. 313, n. 3, p. 243-255, 1996.
- HU, Y.F.; CHANG C.J.; BRUEGGEMEIER, R.W.; LIN, Y.C. Presence of antitumor activities in the milk collected from gossypol treated dairy cows. **Cancer Letters**, Schannon, v. 87, n. 1, p. 17-23, 1994.
- HUDSON, L.M.; KERR, L.A.; MASLIN, W.R. Gossypol toxicosis in a herd of beef calves. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 192, n. 9, p. 1303-1305, 1988.
- JOHANSEN, R.L.; MISRA, H.P. Effects of gossypol on the drug metabolizing system in rats. **Contraception**, New York, v. 42, n. 6, p. 683-690, 1990.
- LANGERLOF, R.F.; TONE, J.N. The effect of gossypol acetic acid on female reproduction. **Drug and Chemical Toxicology**, Monticello, v. 8, n. 6, p. 469-482, 1985.
- LIN, Y.C.; FUKAYA, T.; RIKIHISA, Y.; WALTON, A. Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. **Life Sciences**, New York, v. 37, n.1, p. 39-47, 1985.
- LIU, S.; KULP, S.K.; SUGIMOTO, Y.; JIANG, J.; CHANG, H.L.; DOWD, M.K.; WAN, P.; LIN, Y.C. The (-)-enantiomer of gossypol possesses higher anticancer potency than racemic gossypol in human breast cancer. **Anticancer Research**, Jattiki. v. 22, n.1, p. 33-38, 2002.
- PATTON, C.S.; LEGENDRE, A.M.; GOMPF, R.E.; WALKER, M.A. Heart failure caused by gossypol poisoning in two dogs. **Journal the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 187, n. 6, p. 625-627, 1985.
- QIAN, S.Z. e WANG, Z.G. Gossypol: a potential antifertility agent for males. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 329-360, 1984.
- SAKESENA, S.K.; SALMONSEN, R.; LAU, I.F.; CHANG, M.C. Gossypol: its toxicological and endocrinological effects in male rabbits. **Contraception**, New York, v. 24, n. 2, p. 203-214, 1981.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**, EPA/630/R-96/009. Washington, 1996.

YANG, Y.Q. e WU, X.Y. Antifertility mechanisms of gossypol acetic acid in female rats. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 80, n. 2, p. 425-429, 1987.

ZHANG, Y.W.; HAN, M.L.; WANG, Y.F. Estrogen and progesterone cytosol receptor concentrations in patients with endometriosis and their changes after gossypol therapy. **Chung Hua Fu Chang Ko Tsa Chih**, v. 29, n. 4, p. 220-223, 1994.

Recebido para publicar: 30/07/2002

Aprovado: 03/10/2002