

Morfologia testicular e qualidade espermática de touros da raça Nelore, submetidos à dieta contendo gossipol

Testes morphology and sperm quality of Nelore bulls fed a gossypol-enriched diet

Marcelo Diniz Santos,* Fabrício Kleyton B. Coelho Portilho,** José Reinaldo Mendes Ruas,*** Silvio Henrique de Freitas,**** Deiler Sampaio Costa,***** Manuel de Jesus Simões*****

Resumo

Com o objetivo estudar o efeito de dieta contendo gossipol sobre a qualidade seminal e morfologia dos testículos de touros da raça Nelore, utilizaram-se 16 animais, distribuídos em dois tratamentos: T1, oito touros submetidos a dieta contendo 20% de caroço de algodão e T2, oito touros submetidos a dieta isenta de gossipol. Realizaram-se coletas de sêmen para avaliar a qualidade seminal. Os testículos dos animais foram retirados ao final dos 73 dias de experimento, fragmentos dos mesmos foram preparados para serem analisados em microscopia eletrônica de transmissão e outros fixados em lâminas e corados por hematoxilina-eosina. O consumo médio de caroço de algodão/animal/dia de 1,71kg interferiu na morfologia dos testículos; os túbulos seminíferos apresentaram menor espessura de parede, redução no número de camadas de células espermatogênicas e no volume dos núcleos da célula de Sertoli em relação aos do T2. Por microscopia eletrônica observou-se que os touros do T1 apresentavam células de Sertoli com membrana citoplasmática enrugada, acúmulo de lipídeos no citoplasma, mitocôndrias deformadas e algumas espermátides estavam em apoptose. Touros do T1 apresentaram redução na motilidade espermática, aumento no percentual de defeitos espermáticos maiores e totais em relação aos animais do T2. O gossipol alterou a morfologia testicular e reduziu a qualidade espermática dos touros.

Palavras-chave: caroço de algodão, degeneração testicular, fertilidade de touros, morfologia espermática.

Abstract

We studied the effect of a gossypol-enriched diet on the quality of semen and the morphology of testes of Nelore bulls. Sixteen animals were scheduled for 2 treatments: T1, 8 bulls fed a diet containing 20% cottonseed and T2, 8 bulls fed a gossypol-free diet. Semen samples were collected in order to evaluate the semen quality. At the end of the 73-day period of treatment, the testes were removed and tissue fragments were prepared for transmission electron microscopy or fixed on slides and stained with haematoxylin-eosin for light microscopy. The mean daily intake of cottonseed by T1 bulls was 1.71 kg/animal, which interfered on testes morphology; the seminiferous tubules had less thick walls, fewer layers of the spermatogenic lineage cells and reduced volumes of Sertoli cell nuclei with regard to T2 bulls. Electron microscopy analyses revealed that the Sertoli cells from T1 animals had a rough cytoplasmic membrane, lipid accumulation in the cytoplasm, deformed mitochondriae; in addition, some apoptotic spermatids were seen. T1 bulls showed reduction of sperm motility and an increase of the percentage of major and total sperm defects in relation to the animals of T2 group. It is concluded that a gossypol-enriched diet promoted alterations in the testicles morphology and it reduced the sperm quality of bulls.

Keywords: bull fertility, cottonseed, sperm morphology, testicular degeneration.

Introdução

O algodão (*Gossypium* spp.) é cultivado em alguns estados do Brasil, sendo utilizado como matéria-prima na indústria têxtil. Após a obtenção da fibra, suas sementes (caroço de algodão) são aproveitadas para extração de óleo ou são fornecidas *in natura* na alimentação de ruminantes.

No Brasil em 2007 foram plantados 57.924.535 ha de algodão, com produção de 3.780,5 mil toneladas e rendimento médio de 3.405 kg/ha (IBGE, 2007). A disponibilidade do caroço e do farelo de algodão no mercado produtor, seu valor energético, protéico e o baixo preço, têm estimulado pecuaristas a adotarem sua utilização na alimentação animal.

* Prof. da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Cuiabá – UNIC CEP 78050-090 Cuiabá-MT Brasil. E-mail: dinizms@uol.com.br; Av. Agrícola Paes de Barros, 682 Apto 1801 Bloco A, Edifício Ilha dos Açores, CEP 78030-100 Cuiabá, MT. Autor para correspondência.

** Aluno do Curso de especialização em reprodução bovina – UNIC Cuiabá, MT.

*** Pesquisador EPAMIG Belo Horizonte, MG.

**** Prof. da Faculdade de Medicina Veterinária – UNIC Cuiabá, MT.

***** Prof. da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia–UFMS Campo Grande, MS.

***** Prof. do Departamento de Morfologia EPM – UNIFESP São Paulo, SP.

Os benefícios em aumentar o teor de lipídios nas dietas para vacas em lactação foram amplamente estudados em inúmeros trabalhos de pesquisa e extensas revisões. A utilização de alimentos ricos em lipídios na dieta de ruminantes é de grande valia (Apper-Bossard et al., 2006; Degaris et al., 2008) por aumentar a densidade energética da dieta sem aumentar os riscos de ocorrências de acidose ruminal (Fernandes et al., 2002). Entretanto, a adição desses nutrientes à dieta em quantidades consideráveis pode prejudicar a digestibilidade de fibra no rúmen e/ou provocar distúrbios metabólicos, comprometendo o desempenho animal (Fernandes et al., 2002). Uma das fontes de gordura mais utilizadas em propriedades especializadas em produção leiteira é o caroço de algodão, que contém 2,22 Mcal/kg de ELL (Energia líquida de lactação), 23% de proteína bruta, 44% de FDN e 34% de FDA (NRC, 1989).

O gossipol é um pigmento polifenólico de cor amarela, tóxico, antioxidante e antipolimerizante, produzido em glândulas localizadas nas raízes, folhas, caule e sementes do algodão, tendo a fórmula $C_{30}H_{28}O_8$ (Randel et al., 1992; Santos, 1997).

O gossipol livre, que tem o efeito tóxico, é a parte do gossipol que é solúvel em acetona. Normalmente no caroço de algodão, o teor de gossipol livre é semelhante ao teor total, o que tem restringido a utilização deste na alimentação de ruminantes e não-ruminantes. O conteúdo médio de gossipol total no caroço de algodão é de 1,32% (variando de 0,59 a 2,35%) em espécies comumente cultivadas nos Estados Unidos. Fatores como a fertilidade do solo, suprimento de água, adubações e crescimento vegetativo afetam o conteúdo de gossipol na planta (Randel et al., 1992).

O gossipol tem mostrado reduzir a fertilidade em ratos e *hamsters* (Hahn et al., 1981) e em touros (Arshami e Ruttle, 1988). Estudos em fêmeas têm também mostrado propriedades contraceptivas do gossipol (Lin et al., 1985b). Fornés et al. (1993) observaram que a adição de gossipol livre acarretou, *in vitro*, a perda da motilidade espermática de ratos por alteração na membrana celular dos espermatozoides.

Touros jovens foram submetidos à dieta contendo gossipol que resultou em aumento do lúmen dos túbulos seminíferos, redução da espessura e do número de células da parede dos túbulos seminíferos e redução do diâmetro das células de Sertoli. Observaram também maior percentagem de espermatozoides anormais submetidos a dietas com gossipol, caracterizando degeneração testicular (Arshami e Ruttle, 1988).

Touros jovens da raça Brahman alimentados com dieta contendo 2,72 kg de farelo de algodão apresentaram menor ($P < 0,01$) percentagem de espermatozoides normais que os submetidos à dieta isenta de gossipol (Chenoweth et al., 1994).

Segundo Poore e Rogers (1995) deve-se limitar a utilização do caroço de algodão para se evitar os efeitos tóxicos do gossipol, recomendando sua utilização em função do percentual da dieta total e por kg/animal/dia, respectivamente: vacas (20% ou de 2,3 a 3,2), touros (15% ou 2,3 a 3,2), bovinos em crescimento (15% ou de 0,7 a 1,1), pré-ruminantes e touros jovens (não utilizar). Já Rogério et al. (2003) relataram que os melhores resultados de desempenho produtivo descrito na literatura são alcançados com níveis situados entre 10 e 25% de caroço de algodão na matéria seca total da dieta. V a l e ressaltar que em função do alto teor de lipídeo existente no

caroço de algodão, o seu excesso pode acarretar redução no consumo de matéria seca. Estudos têm demonstrado que níveis de lipídeo (extrato etéreo – EE), na matéria seca, acima de 5 a 6% na dieta total de ruminantes podem interferir na fermentação ruminal, causando redução na digestibilidade e no consumo de matéria seca (Palmquist, 1994).

Considerando a necessidade de disponibilidade de informações, principalmente nacional, com relação aos efeitos do gossipol sobre a morfologia espermática, além do aspecto relevante de avaliação sob a óptica eletrônica, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dieta contendo gossipol sobre a qualidade seminal e morfologia testicular de touros da raça Nelore.

Material e métodos

O experimento foi desenvolvido na fazenda Matrinchan, localizada no município de São José do Rio Claro, MT, distante 290km de Cuiabá, MT.

Foram utilizados 16 touros da raça Nelore com média de 30 meses de idade e 445kg de peso vivo, identificados e distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: T1, oito touros submetidos a dieta contendo 20% de caroço de algodão (gossipol) com base na matéria seca e T2, oito touros submetidos a dieta isenta de gossipol (Tabela 1). Os animais de cada tratamento foram mantidos confinados em área com 200m², dotada de bebedouro e cochos para mistura mineral e para volumoso.

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas nos tratamentos 1 e 2, com base na matéria seca

Ingredientes	Tratamento 1 (%)	Tratamento 2 (%)
Silagem de milho	35,0	35,0
Milho grão	29,3	29,3
Caroço de algodão	20,0	-
Resíduo de soja	10,0	10,0
Farelo de arroz	5,0	25,0
Mistura mineral	0,7	0,7
Total	100	100

Antes de se iniciar o experimento, amostras dos alimentos foram coletadas para determinação da MS (matéria seca), PB (proteína bruta), EE (extrato etéreo), NDT (nutrientes digestíveis totais), FDN (Fibra detergente neutro), Ca e P. As dietas foram formuladas para ganhos estimados de 1.200 g/animal/dia. Em função do teor de caroço de algodão do T1, o nível de extrato etéreo (EE) estimado foi de 8%, já no T2, isento de caroço de algodão, foi de 6%. As dietas foram reformuladas após 41 dias do início do experimento para atender às exigências dos animais conforme o ganho de peso obtido, sendo pesadas e fornecidas *ad libitum* duas vezes ao dia, às 7h e 17h. Antes das 7h foi realizada a limpeza dos cochos e pesagem das sobras, para se obter o consumo.

Foram adicionados ao concentrado 2,2 gramas de Rumensin¹ por animal/dia nos dois tratamentos. Os valores nutricionais das dietas, com base na matéria seca, foram: Tratamento 1-PB 12,5%, NDT 74,6%, EE 8,0%, FDN 38,3%, Ca 0,30% e P

¹ Monensina sódica – Elanco, Greenfield, Estado de Indiana, Estados Unidos.

0,21%; Tratamento 2- PB 11,5%, NDT 74,0%, EE 6,0%, FDN 37,8%, Ca 0,35% e P 0,23%.

O período experimental teve duração de 73 dias, incluindo 16 dias de adaptação dos animais às dietas. Foram realizadas coletas de sêmen (eletroejaculação) e mensuração da circunferência escrotal no início, com 41 dias e ao final da fase experimental (73 dias), para avaliar o efeito das dietas sobre a qualidade espermática dos touros.

O ganho de peso foi avaliado durante 57 dias, pois não se consideraram os 16 dias de fase de adaptação dos animais às dietas, sendo os mesmos pesados, no início, com 16, 41 e 73 dias, pela manhã, antes do fornecimento da primeira refeição.

Para estudar o efeito das dietas sobre as características histológicas dos testículos dos touros, foi realizada ao final do experimento orquiectomia e identificação dos mesmos por animal e por tratamento, respectivamente. Fragmentos dos testículos foram mergulhados em glutaraldeído a 2%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por duas horas, e refixados em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora. Após esses procedimentos, o material foi processado para inclusão em araldite, seguindo os métodos habituais para microscopia eletrônica de transmissão. Os cortes foram contrastados pelo citrato de chumbo e acetato de uranila e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss - EM109.

Para avaliação das estruturas testiculares via microscopia por coloração com hematoxilina-eosina, outros fragmentos foram mergulhados por duas horas em líquido de Bouin para fixação. A seguir, fragmentos de 4 mm de espessura por 15mm de comprimento foram retirados da região central do parênquima testicular e novamente mergulhados nesse líquido por 24 horas. Procedeu-se à desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa controlada à temperatura de 59°C. Os fragmentos dos testículos foram incluídos e orientados de tal maneira que permitissem obter cortes para observação da albugínea e dos túbulos seminíferos. Os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot ajustado para 5mm, sendo os mesmos fixados em lâminas e corados pela hematoxilina-eosina.

Utilizou-se sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz (Carl Zeiss) com objetiva 40x, adaptado em câmera de alta resolução (Axio Cam MRC da Carl Zeiss) em monitor de vídeo colorido, para a análise morfométrica dos túbulos seminíferos das células intersticiais (Leydig) e das células de Sertoli. Para a determinação da atividade das células intersticiais e de Sertoli, foram calculados seus volumes nucleares, sendo mensurados o maior e o menor diâmetro por núcleo e, a seguir, aplicados na fórmula $V = a^2 \cdot b / 1,91$, onde v = volume, a = menor diâmetro e b = maior diâmetro (Baracat et al., 1991). As medidas dos diâmetros e dos volumes dos núcleos das células de Sertoli e Leydig foram realizadas em 50 núcleos de cada tipo celular, por animal, tomando-se sempre túbulos cortados transversalmente. Para mensuração da espessura da parede e do número de camadas da linhagem espermatogênica foram selecionados

aleatoriamente 10 cortes transversais de túbulos seminíferos, por animal. Os quais foram avaliados nos quatro quadrantes (superior, inferior e os laterais) com relação à espessura da parede e do número de camadas celulares, respectivamente, utilizando-se o programa de análise de imagens Axion Vision REL 4.3 da Carl Zeiss.

As análises estatísticas das variáveis ganho de peso, qualidade seminal e morfometria testicular foram interpretadas por análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de F, a 1 e 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

No presente trabalho o nível estimado de lipídeo foi de 8% (T1) e 6% (T2), na matéria seca das dietas, reduzindo ($P < 0,05$) o consumo médio diário de alimentos, sendo de 15,5 kg (T1) e 21,5 kg (T2) (na matéria natural), acarretando menor ($P < 0,05$) ganho médio de peso diário (0,822 x 1,182 kg), pelos animais do T1 em relação aos do T2, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Médias dos pesos inicial (PI) e final (PF), ganho de peso no período (GPP) e ganho médio de peso diário (GPD) dos touros da raça Nelore, submetidos às dietas com caroço de algodão (T1) e sem caroço de algodão (T2), durante 57 dias de avaliação

Tratamento	Touros(n)	PI (kg)	PF (kg)	GPP (kg)	GPD (kg)
T1	8	452 ± 21,45	499 ± 26,92	46,87±12,26 [*]	0,822±0,21 [*]
T2	8	438 ± 14,12	506 ± 17,97	67,37±13,97 [*]	1182±0,24 [*]

^{*} $P < 0,05$ pelo teste F

Poore e Rogers (1995) recomendaram a utilização de 2,3 a 3,2 kg/animal/dia de caroço de algodão na matéria natural (MN). Neste trabalho, a estimativa de consumo de alimentos do T1 foi de 20,7 kg/animal/dia (MN), em que os 20% de caroço de algodão na matéria seca equivaliam a 2,3kg de caroço de algodão/animal/dia na matéria natural. Considerando que, em função do alto teor de lipídeos da dieta do T1, os animais consumiram, em média, 15,5 kg/dia, neste caso, pode-se estimar que o consumo médio de caroço de algodão/animal/dia foi de 1,71kg (MN), quantidade esta que ficou abaixo do recomendado para touros, conforme Poore e Rogers (1995).

O consumo médio de 1,71kg de caroço de algodão/animal/dia interferiu na morfologia dos testículos. A Figura 1 mostra as características histológicas dos testículos dos touros submetidos à dieta com caroço de algodão (T1) e sem caroço de algodão (T2). Nos testículos dos touros do T2, observou-se que no interior dos lóbulos encontravam-se inúmeros cortes de túbulos seminíferos intercalados por células intersticiais. Os túbulos seminíferos eram compostos de fora para dentro por células mióides, células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos I, espermatócitos II, espermatídes e espermatozóides. Observou-se que os touros do T1 apresentaram testículos com a mesma arquitetura histológica observada nos touros do T2. No entanto, foram identificados no interior do parênquima testicular túbulos seminíferos com lúmen amplo, menor número de camadas e menor espessura de sua parede ($P < 0,01$) (Figura 1 e Tabela 3). Em alguns locais identificaram-se, nos touros do T1, túbulos seminíferos intensamente eosinófilos, com pequeno diâmetro, indicando processo de atrofia. Na maioria dos túbulos foram identificadas todas as células da linhagem germinativas.

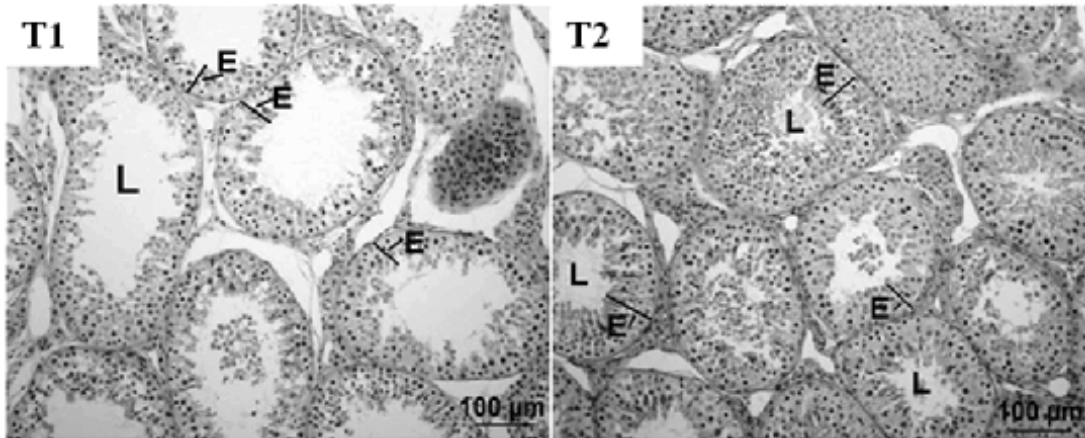


Figura 1: Características histológicas dos testículos de touros submetidos à dieta com caroço de algodão (T1) e sem caroço de algodão (T2). Notar no grupo T1 túbulos seminíferos com lúmen amplo (L) e com menor espessura de sua parede (E) em relação ao grupo T2. H.E.

Tabela 3: Características histológicas dos testículos dos touros submetidos às dietas com caroço de algodão (T1) e sem caroço de algodão (T2), durante 73 dias de avaliação

Parâmetros avaliados	Tratamento 1	Tratamento 2
Volume nuclear das células de Leydig (μm^3)	158,76 \pm 20,41	163,40 \pm 15,12 ^{ns}
Volume nuclear das células de Sertoli (μm^3)	212,77 \pm 18,20	509,97 \pm 30,40**
Número de camadas de células da linhagem espermatogênica	2,50 \pm 1,01	5,40 \pm 1,41**
Espessura das paredes dos túbulos seminíferos (μm)	49,25 \pm 5,12	65,18 \pm 8,71**

^{ns} $P > 0,05$ pelo teste F

** $P < 0,01$ pelo teste F

Ocorreu redução ($P < 0,01$) no número de camadas de células da linhagem espermatogênica, no volume dos núcleos das células de Sertoli e na espessura da parede dos túbulos seminíferos dos touros submetidos à dieta contendo caroço de algodão (gossipol), em relação aos touros do T2 (Tabela 3). Segundo Baracat et al. (1991), o aumento do volume nuclear é diretamente proporcional ao metabolismo celular, uma vez que este contém o material genético.

Não foram identificadas alterações aparentes nas células intersticiais (Leydig) em nenhum dos animais estudados, fato este também observado por Arshami e Ruttle (1988), sugerindo que o gossipol não interfere nas referidas células e possivelmente também na produção de testosterona.

A avaliação da ultra-estrutura dos túbulos seminíferos dos testículos dos touros do T1 mostrou que as células de Sertoli apresentavam lâmina basal contendo inúmeras dobras (LB), gotículas de lipídeos no citoplasma (L) e algumas mitocôndrias deformadas (M) (T1-A). Observou-se T1-B algumas espermátides com alterações nucleares indicativas de processo apoptótico, tais como área eletrodensa perinuclear, figuras de mielina (Mi) e dobras da membrana nuclear. No citoplasma identificaram-se alguns corpos eletrodensos (CE) e complexo de Golgi vacuolizado (CG) (T1-B). Os animais do T2 apresentavam todas as estruturas citadas com morfologia normal (T2-A e B) (Figura 2).

O consumo de caroço de algodão interferiu na qualidade espermática dos touros, reduziu ($P < 0,01$) a motilidade, aumentou ($P < 0,01$) o percentual de defeitos espermáticos maiores e totais, em relação aos animais com dieta isenta de gossipol. A maior porcentagem de espermatozoides anormais

dos touros submetidos à dieta com gossipol pode reduzir a fertilidade dos animais, que possivelmente poderá se tornar mais grave com o tempo e com o maior consumo de caroço de algodão (Tabela 4).

Diversos autores têm estudado os efeitos da utilização de caroço de algodão sobre o processo digestivo e desempenho produtivo de bovinos. Fernandes et al. (2002) relataram que a inclusão do mesmo em até 12% da dieta total não acarretou prejuízos ao processo digestivo. Melo et al. (2006) observaram que a inclusão de caroço de algodão em até 25% da matéria seca da dieta melhorou o desempenho animal. Contudo, os estudos também devem levar em consideração os aspectos reprodutivos, já que o caroço de algodão, em função do nível de consumo, pode acarretar alterações na morfologia dos testículos e reduzir a qualidade espermática de touros, conforme observado por Arshami e Ruttle (1988) e comprovado neste estudo. Além disso, Lin et al. (1985b) e Andreazzi (1998) relataram propriedades contraceptivas em fêmeas.

Segundo Randel et al. (1992), o conteúdo de gossipol no algodão foi correlacionado positivamente com o período de chuva e negativamente com a temperatura. Além destes, outros fatores como a fertilidade do solo, suprimento de água, adubações e crescimento vegetativo afetam o conteúdo de gossipol na planta. No Brasil, estudos devem ser desenvolvidos para avaliar se estes fatores podem interferir na concentração de gossipol do algodão e, conseqüentemente, em maior ou menor efeito tóxico aos animais.

Considerando a disponibilidade e os preços dos produtos e subprodutos do algodão no estado de Mato Grosso, bem como seu elevado valor nutricional, fatores que viabilizam a utilização

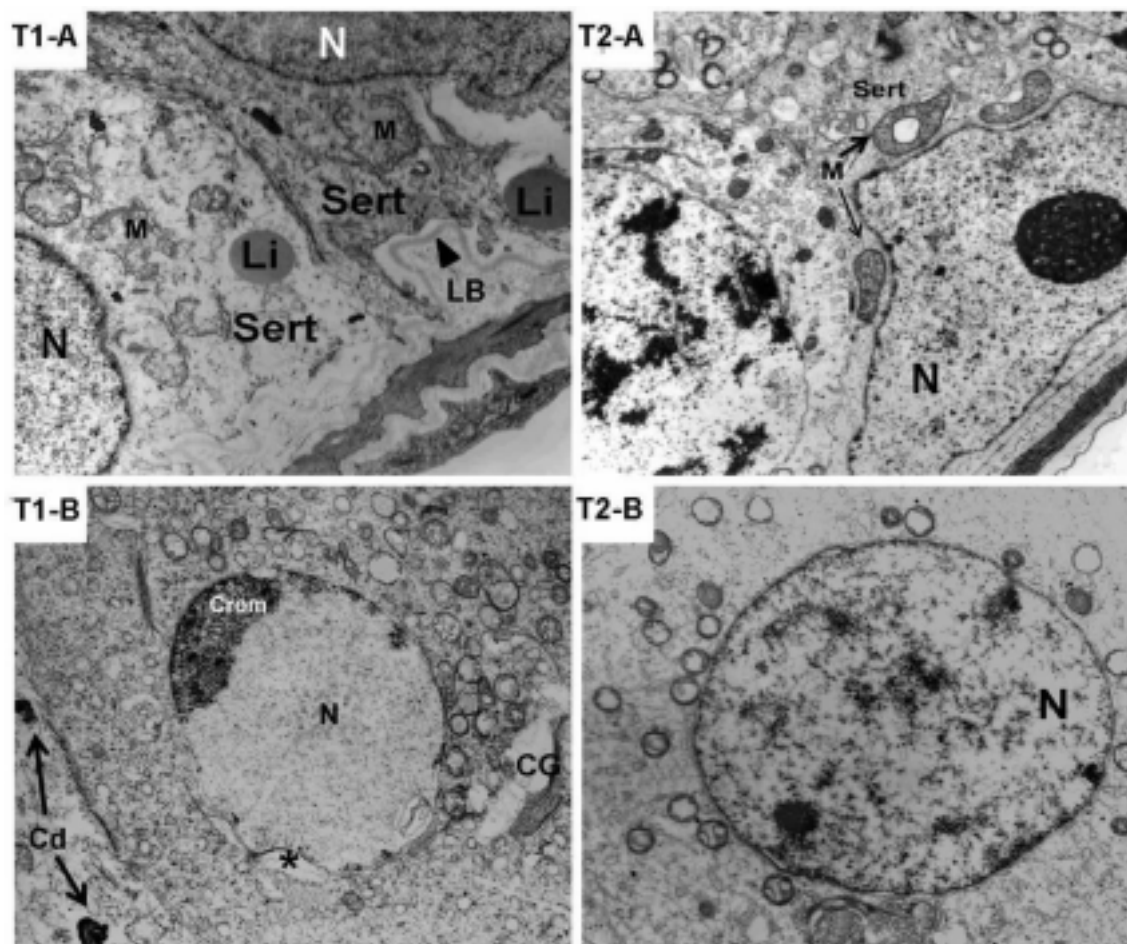


Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando parte da parede de túbulos seminíferos de touros submetidos às dietas com gossipol (T1) e sem gossipol (T2). Observar em T1-A célula de Sertoli (Sert) com gotículas lipídicas no citoplasma (Li), mitocôndrias deformadas (M) e lâmina basal com inúmeras dobras (LB – cabeça de seta). Em T1-B observar espermatídeo contendo no citoplasma grânulos densos (Cd – setas), e núcleo (N) com cromatina condensada (Crom) indicativo de processo de apoptose. Notar ainda dobras da membrana nuclear (*) e complexo de Golgi vacuolizado (CG). Em T2-A e B estruturas celulares com morfologia normal. N = núcleo; M= mitocôndrias.

Tabela 4: Valores iniciais e finais da motilidade espermática e concentração espermática, defeitos espermáticos menores, maiores e totais dos touros submetidos à dieta com caroço de algodão (T1) e sem caroço de algodão (T2)

	Inicial		Final	
	T1	T2	T1	T2
Motilidade Espermática (%)	65,0 ± 6,54	66,2 ± 5,82	52,5±11,95	73,7±4,43**
Concentração espermática (x 10 ⁶ /mL)	877,5±116,34	992,5±84,97*	612,5±139,46	1077,5±139,05**
Defeitos espermáticos menores (%)	7,4 ± 1,41	6,2 ± 1,03	10,5±2,44	8,0±1,07*
Defeitos espermáticos maiores (%)	13,4 ± 1,50	14,2 ± 2,05	16,4±1,30	12,2±1,28**
Defeitos espermáticos totais (%)	20,7 ± 1,28	20,5 ± 2,00	26,9±2,69	20,2±1,58**

* P<0,05, ** P<0,01 pelo teste F

dos referidos produtos na alimentação animal, estudos devem ser desenvolvidos para se determinar o teor de gossipol presente nos produtos do algodão e os limites máximos de sua utilização por categoria animal, evitando efeitos tóxicos para não comprometer a fertilidade dos animais e acarretar prejuízos reprodutivos e produtivos ao rebanho.

Conclusões

O consumo de caroço de algodão acarretou alterações na morfologia dos testículos e reduziu a qualidade espermática de touros da raça Nelore.

Referências

- ANDREAZZI, M.A. Considerações sobre a influência do gossipol no desempenho e reprodução de fêmeas. *Arquivo Ciência da Saúde Unipar*, v. 2, n. 1, p. 89-94, 1998.
- APPER-BOSSARD, E.; PEYRAUD, J.L.; FAVERDIN, P.; MESCHY F. Changing dietary cation-anion difference for dairy cows fed with two contrasting levels of concentrate in diets. *Journal Dairy Science*. v. 89, p. 749-760, 2006.
- ARSHAMI, J.; RUTTLE, J.L. Effects of diets containing gossypol on spermatogenic tissues of young bulls. *Theriogenology*, v. 30, n. 3, p. 507-516, 1988.
- BARACAT, E.C.; SIMÕES, M.J.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; LIMA, G.R.; LIMA, F.O.A.; KULAY, J.L. Morphologic and morphometric aspects of the uterine tube epithelium during the menstrual cycle. *Revista Paulista de Medicina*, v. 109, n. 5, p. 204-212, 1991.
- CHENOWETH, P.J.; RISCO, C.A.; LARSEN, R.E.; VELEZ, J.; TRAN, T.; CHASE, C.C. Effects of dietary gossypol on aspects of semen quality, sperm morphology and sperm production in young Brahman bulls. *Theriogenology*, v. 42, n. 1, p. 1-13, 1994.
- DEGARIS, P.J.; LEAN, I.J.; RABIEE, A.R.; HEUER, C. Effects of increasing days of exposure to prepartum transition diets on milk production and milk composition in dairy cows. *Australian Veterinary Journal*, v. 86, p. 341-351, 2008.
- FERNANDES, J.J.R.; PIRES, A.V.; SANTOS, F.A.P.; SUSIN, I.; SIMAS, J.M.C. Teores de caroço de algodão em dietas contendo silagem de milho para vacas em lactação. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 4, p. 1071-1077, 2002.
- FORNÉS, M.W.; BARBIERI, A.M.; BURGOS, M.H. Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production. *biochemistry and biophysics Reser. Commun*, v. 195, n. 3, p. 1289-1293, 1993.
- HAHN, D.W.; RUSTICUS, C.; PROBST, A.; HOMM, R.; JOHNSON, A.N. Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents. *Contraception*, n. 24, p. 97-105, 1981.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. [2007] *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200707_4.shtm > acesso em 29/08/2007.
- LIN, Y.C.; PATHMANAYAKI, R.; RIKIHISA, Y. Inhibition of embryo implantation in the unilaterally gossypol-treated uterine horn of pregnant rats. *Biology Reproduction*. v. 32 (suppl. 1), p. 131, 1985b.
- MELO, A.A.S.; FERREIRA, M.A.F.; VÉRAS, A.S.C.; LIRA, M.A.; LIMA, L.E.; PESSOA, R.A.S.; BISPO, S.V.; CABRAL, A.M.D.; AZEVEDO, M. Inclusão do caroço de algodão em dietas à base de palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill.), sobre o desempenho de vacas da raça Holandesa em lactação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 7, p. 1165-1171, 2006.
- NRC – National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*, 6 nd. Washington, NRC/National Academy Press. 158 p, 1989.
- PALMQUIST, D.L. The role of dietary fats in efficiency of ruminants. *Journal Nutrition*, v. 124, n.11, p. 1377S-1382S, 1994.
- POORE, M.H.; ROGERS, G. Feeding whole cottonseed and other cotton by-products to beef cattle. *Veterinary Medicine*, v. 90, n. 11, p. 1077-1087, 1995.
- RANDEL, R.D.; CHASE, C.C.; WYSE, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. *Journal Animal Science*, v. 70, n. 5, p. 1628-1638, 1992.
- ROGÉRIO, M.C.P.; BORGES, I.; SANTIAGO, G.S.; TEIXEIRA, D.A.B. Uso do caroço de algodão na alimentação de ruminantes. *Arquivos Ciências Veterinária e Zoologia UNIPAR*, v. 6, n. 1, p. 85-90, 2003.
- SANTOS, R.L. Efeitos do gossipol sobre a reprodução. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, n. 21, p. 73-82, 1997.