

## **Efeito da inclusão de caroço de algodão na dieta sobre determinados parâmetros reprodutivos de touros Nelores**

**Effects on reproductive parameters of Nelore bulls by cottonseed addition in their diet**

**Efecto de la inclusión de semilla de algodón en la dieta sobre determinados parámetros reproductivos de toros Nelore**

Recebido: 24/02/2022 | Revisado: 04/03/2022 | Aceito: 10/03/2022 | Publicado: 18/03/2022

### **Rogério Rondineli Nóbrega**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5237-7614>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil  
E-mail: rogerio.nobrega@muz.suldeminas.edu.br

### **Paula Piccolo Maitan**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6677-9609>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: paula.maitan@unifenas.br

### **Adauton Vilela de Rezende**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8515-484X>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: adauton.rezende@unifenas.br

### **Délcio Bueno da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1248-5282>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil  
E-mail: delcio.silva@muz.ifsulswminas.edu.br

### **Geórgia Modé Magalhães**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0195-9817>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil  
E-mail: georgia.magalhaes@muz.ifsuldeminas.edu.br

### **Felipe Augusto Pereira Paiva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6278-2066>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil  
E-mail: felipegs97@gmail.com

### **Jackson Alípio Santos de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5689-5929>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil  
E-mail: Jackson.alipio@muz.ifsuldeminas.edu.br

### **Juan Henrique Ferreira Nóbrega**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8559-165X>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, Brasil  
E-mail: juannobrega441@gmail.com

### **Miller Pereira Palhão**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6670-4046>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: millerpalhao@gmail.com

### **Jairo Pereira Neves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7733-869X>  
Universidade José do Rosário Vellano, Brasil  
E-mail: jairo.neves@unifenas.br

## **Resumo**

Este estudo avaliou os efeitos de diferentes níveis de inclusões de gossipol livre (GL) nas dietas sobre os parâmetros reprodutivos e hormonais de touros da raça Nelore. Foram utilizados 28 animais (18 a 24 meses) dividido em 4 tratamentos, onde (T1) incluiu os animais com ausência de caroço de algodão (CA) e GL; (T2) animais que receberam 860 g de CA - 1,65g/dia GL/animal/dia; (T3) 1.720 g de CA - 3,30 g GL/animal/dia e (T4) 2.580 g de CA - 4,95 g GL/animal/dia. As coletas de sangue, sêmen e a avaliação da consistência testicular foram realizados com intervalos de 30 dias (D0, D30, D60, D90 e D120). As variáveis analisadas no ejaculado foram: volume, aspecto, pH, turbilhonamento, vigor, motilidade, concentração (/mL e /ejaculado) e morfologia espermática. Os níveis séricos de testosterona livre foram obtidos através de 6 coletas de sangue iniciadas às 7 horas, com intervalos de 2 horas. Castrações foram realizadas no D121, para exames histopatológicos do testículo. O gossipol não influenciou na testosterona livre, concentração espermática, defeitos maiores, circunferência escrotal e largura testicular. No entanto, sofreram influência dos níveis de gossipol o turbilhonamento, vigor, motilidade e defeitos menores ( $p < 0,05$ ). O

testículo apresentou diferenças na textura a partir do D60. Histologicamente, houve diferença para variáveis grânulos citoplasmáticos, picnose nuclear, fibrose e espermatozoide em túbulos seminíferos ( $p < 0,05$ ). Baseados nos resultados deste estudo, conclui-se que o gossipol altera os padrões de consistência testicular e parâmetros de mobilidade espermática, porém não interfere na testosterona livre.

**Palavras-chave:** Análise seminal; Caroço de algodão; Consistência testicular; Testosterona; Touro.

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate reproductive parameters of Nellore bulls by cottonseed (CS) addition with different concentrations of free gossypol in their diet. Twenty-eight animals (from 18 to 24 months) divided into 4 treatments were used in which (T1) was represented by animals that had no addition of CS (i.e. no free gossypol); (T2) addition of 860 g of CS - 1.65 g/of free gossypol/animal/day; (T3) addition of 1.72 g of CS - 3.30 g of free gossypol /animal day and (T4) addition of 2,580 g of CS - 4,95 g of free gossypol/animal/day. Blood samples for testosterone free evaluation, semen collection and testicular consistence were performed in 30-day intervals (D0, D30, D60, D90 and D120). Semen analysis consisted of of volume, appearance, pH, whirlpool, vigor, motility, concentration (/mL and /ejaculate) and sperm morphology. Testicular analysis consisted of of scrotal circumference, length and testicular width and testicular consistency. Sterilization were performed in day 121 for histopathological analysis. Free gossypol did not interfere in free testosterone, sperm concentration, major defects, scrotal circumference and testicular width. However, whirlpool, vigor, motility and minor defects were altered. Testicular length and consistence showed difference from day 60 ( $p < 0,05$ ). At histopathological evaluation, cytoplasmatic granules, nuclear pyknosis, fibrosis and sperm inside the seminiferous tubules showed to be different between treatments and control (T1) ( $p < 0,05$ ). Based on the results, free gossypol tends to interfere in some reproductive parameters and should be used carefully in bulls' diet.

**Keywords:** Bulls; Cottonseed; Semen analysis; Testicular consistency; Testosterone.

#### Resumen

El presente estudio evaluó los efectos de diferentes niveles de inclusión de gossipol libre (GL) en la dieta de toros Nelore sobre los parámetros reproductivos y hormonales. Fueron utilizados 28 animales (18 a 24 meses) divididos en 4 tratamientos. (T1): animales sin semilla de algodón (SA) y GL; (T2) animales que recibieron 860g de CA - 1,65g GL/animal/día; (T3) 1.720g CA - 3.30g GL/animal/día y T4 2.580g CA - 4.95g GL/animal/día. Las colectas de sangre (para evaluar testosterona libre), semen y la evaluación de la consistencia testicular se realizaron en intervalos de 30 días (D0, D30, D60, D90 y D120). Las variables analizadas en el eyaculado fueron: volumen, aspecto, pH, vigor, motilidad progresiva y en masa, concentración (/mL y /eyaculado) y morfología espermática. Se realizaron castraciones en D121 para el examen histopatológico de los testículos. El gossipol no influyó los niveles de testosterona libre, concentración espermática, defectos mayores, circunferencia escrotal y ancho testicular. Sin embargo, los niveles de gossipol influyeron en el vigor, motilidad progresiva y en masa y defectos menores. La largura testicular mostró diferencias en la textura desde D60 en Adelante ( $p < 0,05$ ). Histológicamente, hubo diferencias para las variables grânulos citoplasmáticos, picnosis nuclear, fibrosis y espermatozoides en los túbulos seminíferos ( $p < 0,05$ ). Con base en los resultados de este estudio, se concluye que el gossipol altera los patrones de consistencia testicular y los parámetros de motilidad de los espermatozoides, sin embargo, no interfiere con la testosterona libre.

**Palabras clave:** Análisis seminal; Semilla de algodón; Consistencia testicular; Testosterona; Toro.

## 1. Introdução

O caroço de algodão (CA) representa importante fonte energética, proteica e de fibras nas dietas de ruminantes, principalmente em sistemas intensivos de produção de bovinos (Costa, 2011). No entanto, dependendo do nível de inclusão na dieta, o teor do fator antinutricional gossipol livre pode promover envenenamento clínico, hepatotoxicidades, toxicidade reprodutiva masculina e feminina, além de comprometimento imunológico (Gadelha et. al, 2014). Fatores como fertilidade do solo, suprimento de água, adubações e crescimento vegetativo afetam a concentração de gossipol na planta (Randel et al., 1992).

Os efeitos do gossipol nos machos são dependentes da dose e do período de administração (Randel et al., 1992). A gravidade de sua manifestação depende do tipo, da severidade e da duração do insulto (Setchell, 1998). Segundo Silva et al., (2015), redução da espessura da parede dos túbulos seminíferos é observada pela administração do gossipol na dieta após 85 dias. Através de análises ultrassonográficas também provocou danos extensos ao epitélio germinativo, que pode ser responsável por redução na espermatogênese (Santos et al., 2013), na morfologia testicular e no aumento da vacuolização das camadas germinativas nos túbulos seminíferos, indicando degeneração testicular (Babashani et al., 2014).

A avaliação de parâmetros reprodutivos como a consistência testicular pode ser um dos indicativos da condição do

parênquima do testículo. A detecção de tensão superficial e elasticidade nesse órgão sugere a possibilidade de gametogênese normal (Vale Filho, 1997). O diagnóstico clínico de degeneração testicular não se limita à determinação da tonometria testicular, e depende de avaliação andrológica completa, incluindo o espermograma (Garcia, 2017).

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar a influência do gossipol nos parâmetros reprodutivos, tais como: turbilhonamento, motilidade, vigor, na biometria testicular, na histopatologia dos testículos e nos níveis séricos de testosterona livre em touros confinados com diferentes níveis de inclusão de gossipol através do caroço de algodão nas dietas.

## 2. Metodologia

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho (IFSULDEMINAS) – no período de maio a setembro/2017. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais desta instituição com parecer N°: 6A/2014. Touros da raça Nelore (n=28) com idade entre 18 e 24 meses foram confinados em baias coletivas, com de 17m<sup>2</sup> por animal. O espaço de cocho para cada animal foi de 0,50 m e, a dieta seguiu a designação de cada grupo experimental. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso a suplementação mineral e vitamínica, bem como à água.

### 2.1 Delineamento experimental

Vinte e oito touros Nelore (18 a 24 meses) aprovados no exame andrológico previamente realizado, foram randomizados, de acordo com o peso vivo inicial, em quatro tratamentos (n=7) variando quanto a concentração de gossipol livre (GL) na dieta (Tab. 1). Para tanto, o caroço de algodão (CA) incluído na dieta foi submetido a análise de cromatografia líquida (ROMERO et al., 2013) para detecção dos níveis de GL, e o resultado médio foi de 1,92mg de GL/g de CA. Desta maneira, os animais alocados no T1 (controle) receberam dieta sem adição de CA e GL; T2 (0,86kg de CA) equivalente a 1,651g de GL/animal/dia; T3 (1.720g de CA) equivalente a 3,302g de GL/animal/dia; e T4 (2.580g de CA) equivalendo a 4,954 g de GL/animal/dia. Os alimentos incluídos na dieta e as respectivas quantidades consumidas pelos animais em cada tratamento estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Peso vivo inicial (média e desvio padrão), alimentos presentes na dieta e respectivas quantidades consumidas diariamente pelos animais incluídos nos tratamentos controle (T1) e em cada um dos níveis crescentes de inclusão de CA (T2, T3 e T4).

Alimentos (MS)	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
	<b>Consumo (Kg MS/animal/dia)</b>			
Silagem de milho (MV)	17,97	15,8	13,6	11,4
Caroço de algodão	-	0,76	1,51	2,27
Fubá de milho	1,60	1,60	1,60	1,60
Farelo de Soja	0,30	0,30	0,30	0,30
Ureia Pecuária	0,02	0,02	0,02	0,02
Sal Mineral	0,06	0,06	0,06	0,06
Sal Comum	0,02	0,02	0,02	0,02
Poupa cítrica	1,80	1,80	1,80	1,80
Kg MS/animal/dia	10,00	10,00	10,00	10,00
Peso vivo inicial (PVI)	380.0±51.2	364.3±40.1	373.6±52.7	377.9±50.8

Dieta fornecida aos touros no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho (IFSULDEMINAS), com alteração nas concentrações do caroço de algodão para o ajuste de cada tratamento. Fonte: Autores.

A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, às 07h (40% da matéria seca -MS) e às 16h (60% MS), sendo o consumo ajustado com silagem de milho (MV) (Tabela 1), mediante pesagem diária das sobras. O objetivo foi verificar os efeitos dos maiores níveis de GL sobre parâmetros reprodutivos de machos bovinos inteiros confinados. As dietas não foram consideradas isoproteicas ou isoenergéticas (8,9, 10,1, 11,4 e 12,8% de PB; 1,5, 1,6, 1,6 e 1,7 Mcal de Energia Líquida nas dietas respectivamente em T1, T2, T3 e T4), variando também os percentuais de FDN (43,4 a 40,0%, com o aumento de CA na dieta) e estrato etéreo (3,4 a 7,1%, com o aumento de CA), conforme cálculos baseados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos para ruminantes (Valadares Filho, et al., 2015).

O experimento teve duração de 120 dias e os animais foram analisados a cada 30 dias, sendo considerados 5 períodos de coleta e denominados como D0, D30, D60, D90 e D120. Nestes períodos, foram analisados o desenvolvimento corporal (pesagem) e os parâmetros reprodutivos, aferidos através de exames de biometria testicular, parâmetros seminais e dosagem de testosterona. Após o final do período amostral (D121), os animais foram submetidos a orquiectomia unilateral direita para realização de exames histopatológicos.

## **2.2 Ganho médio de peso (GMD)**

As pesagens corporais foram realizadas em todos os períodos amostrais (D0, D30, D60, D90 e D120) e, obtidas em balança eletrônica (COIMMA®) de maneira individual, com os animais respeitando jejum alimentar de 12h. As medidas foram utilizadas para determinar o ganho médio diário de peso dos animais GMD (peso final – peso inicial) /120) e o GMDp, considerado o ganho médio em cada período.

## **2.3 Parâmetros reprodutivos**

### **2.3.1 Biometria testicular**

A medida da circunferência escrotal (CE) em centímetros, foi obtida através do posicionamento de uma fita escrotal (Walmur®) na região de maior diâmetro da bolsa escrotal. Para corrigir a variação inicial da CE e controlar diferenças individuais, as medidas foram transformadas em percentual relativo à primeira mensuração. Adicionalmente, a verificação da consistência testicular (CT) foi por palpação, adotando o escore de 1 a 5, onde o escore 1 é atribuído a testículos bastante flácidos e 5 a testículos muito rígidos.

### **2.3.2 Parâmetros seminais**

A coleta de sêmen foi realizada por meio de eletroejaculador (modelo AUTOJAC V3, Neovet®), seguindo normas do CBRA (2013), onde após a coleta, o sêmen foi imediatamente inspecionado quanto ao volume, aspecto e pH. Uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina para avaliação do turbilhonamento em microscópio óptico em um aumento de 10x (Olympus, CBA). Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre a gota de sêmen e o vigor (escore 1 a 5) e motilidade (%) foram registrados (40x). Para a concentração espermática o sêmen foi diluído em solução formol/salina tamponada concentração 1:200 e a contagem realizada em câmara de Neubauer. Para a avaliação da morfologia espermática, foram preparados esfregaços corados eosina/nigrosina, posteriormente analisados em microscopia de imersão, com a classificação dos defeitos seguindo as instruções contidas no manual de andrologia do CBRA (2013). Todas as análises foram repetidas em todos os períodos amostrais.

### **2.3.2 Dosagem de testosterona**

Em cada período amostral (D0, D30, D60, D90 e D120), com objetivo de traçar o perfil diário de testosterona dos animais, seis amostras de sangue foram obtidas a cada duas horas (07:00, 09:00, 11:00, 13:00, 15:00 e 17:00). O sangue foi

coletado em tubos sem anticoagulante (10mL) através da punção da veia jugular. Após a centrifugação (3000rpm/8min), o soro foi identificado e armazenado em eppendorfs a -20°C. A dosagem de testosterona livre (TL) nas amostras foi obtida pelo procedimento de eletroquimioluminescência. Para tanto utilizou-se kit comercial (Elecsys Testosterona Kit) e todas as etapas de calibrações seguiram as recomendações do fabricante (Roche®). A leitura foi realizada em equipamento automatizado (COBAS e411-ROCHE®). Os limites mínimos e máximos de detecção de testosterona indicados pelo fabricante foram de 0,025 e 15 ng/mL de TL (bovina), respectivamente.

#### **2.4 Histopatologia testicular**

Foram realizadas orquiectomias unilaterais direitas de cada animal ao final do experimento (D121). Os testículos retirados foram então seccionados em três fragmentos de 10 mm de largura perpendicularmente ao seu comprimento das porções capitata, medial e caudata. Após esse processo, os fragmentos testiculares foram fixados em solução de formol a 10% foram enviados ao laboratório de Patologia da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) para confecção de lâminas. Os fragmentos testiculares foram embutidos em parafina, seccionados em micrótomo do tipo Minot ajustado para 3mm espessura, fixados em lâmina e posteriormente corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) conforme Lillie, (1965). Os cortes histológicos dos testículos foram analisados e escores de lesões foram estabelecidos de acordo com a sua intensidade considerando-se vacuolização nas células dos túbulos seminíferos, grânulos citoplasmáticos, picnose, fibrose, espermatozoides em túbulos seminíferos. As lâminas provenientes de cada porção foram avaliadas em cinco campos, pontuado por escores (0 a 3), sendo (0) ausente, (1) discreta, (2) moderada e (3) acentuada para as características mencionadas.

#### **2.5 Análises estatísticas**

O modelo experimental foi composto pelos efeitos principais de tratamento, peso inicial e período de coleta, além da interação tratamento\*período. Variáveis com distribuição normal foram analisadas pelo procedimento Proc Mixed dos SAS e, em caso de efeitos individuais de tratamento e período, o teste de Tukey foi utilizado para verificar a diferença entre tratamentos e períodos. Em caso de interação significativa, os tratamentos foram comparados nos diferentes períodos. O modelo para análise de TL incluiu o efeito de horário de coleta além dos acima mencionados. As variáveis relacionadas aos defeitos espermáticos foram analisadas pelo procedimento não paramétrico de Kruskal-Wallis. Variáveis discretas (CT, aspecto do sêmen, turbilhamento e vigor espermático) foram analisadas em tabelas de frequência de distribuição no procedimento Proc Freq do SAS, onde as diferenças estatísticas são reconhecidas pelo teste de Qui-quadrado. Os resultados são demonstrados em tabelas contendo médias e desvios-padrões, gráficos do tipo histograma, gráfico de linhas e gráficos de frequência. As variáveis obtidas do exame histopatológico foram analisadas pelo programa GraphPad Prism Versão 6, com teste estatístico ANOVA, seguidas de correção pelo Bartlett's teste. Probabilidades menores que 5% foram consideradas significativas e probabilidades entre 5 e 10% foram consideradas aproximações estatísticas.

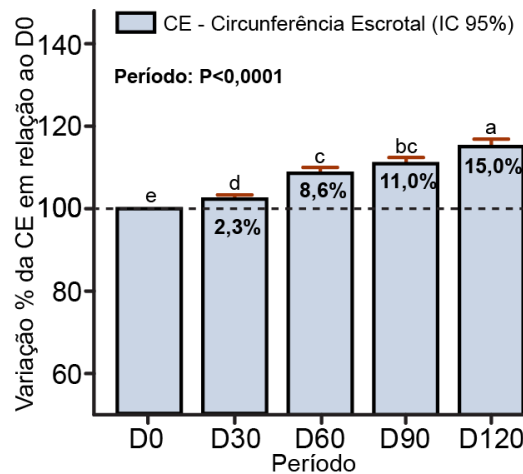
### **3. Resultados**

O peso final (D120) dos animais ( $511,3 \pm 62,6$  kg) e o ganho médio diário de peso, considerando os 120 dias de confinamento, não foram afetados ( $p > 0,05$ ) pelo tratamento. Desta forma, as dietas não influenciaram o desempenho dos animais e promoveram GMDs entre 1,1 e 1,3 kg/d. No entanto, foi observado efeito de período ( $p < 0,0001$ ) sobre o GMDp e o ganho diário foi menor ( $0,6 \pm 0,5$  kg/d) no primeiro intervalo de 30 dias, comparado ao último ( $1,7 \pm 0,6$ kg/d).

Os níveis crescentes de CA nas dietas não alteraram o padrão de crescimento testicular dos touros Nelore ( $p > 0,05$ ). A CE inicial (D0) foi semelhante ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos ( $30,8 \pm 2,3$ cm) e, o efeito de coleta ( $p < 0,0001$ ) permite verificar o

contínuo desenvolvimento testicular (Figura 1). Durante todo o período foi observado um acréscimo de 15% na circunferência testicular em relação ao D0, e a CE média no D120 foi de  $35,3 \pm 2,4$ ).

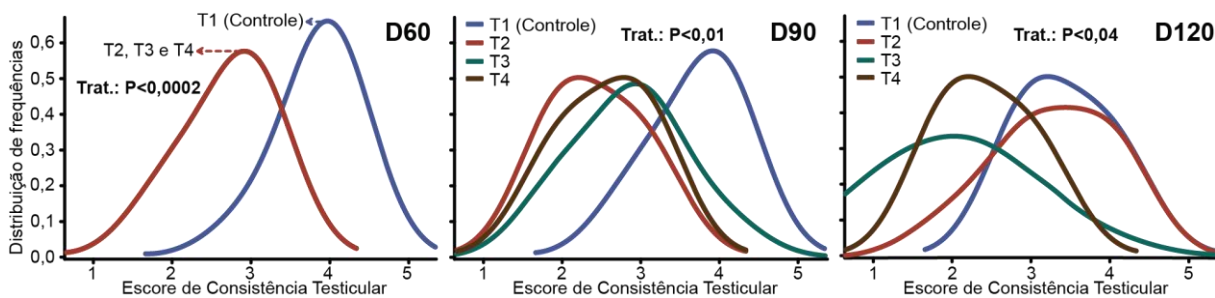
**Figura 1** - Variação percentual média da circunferência escrotal (CE) em relação aos períodos de coleta após o início do tratamento baseado em dietas contendo diferentes níveis de inclusão do caroço de algodão. O efeito do período de coleta ( $p < 0,0001$ ) mostra a variação percentual da CE em cada coleta em relação referência (100%, linha tracejada) primeira coleta. As barras superiores indicam o intervalo de confiança da média à 95% de probabilidade. Letras diferentes entre as colunas do histograma mostram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Autores.

Ao longo do experimento, a CT diferiu entre os tratamentos. Nos primeiros 30 dias (coletas D<sub>0</sub> e D<sub>30</sub>), os grupos tratados com diferentes níveis de GL apresentaram CT semelhante aos animais do grupo controle ( $p < 0,9$  e  $p < 0,4$ , respectivamente), com 70 a 80% dos animais apresentando escore 4. Aos 60 dias de tratamento (D<sub>60</sub>), os grupos tratados com GL apresentaram com maior frequência ( $p < 0,0002$ ) escores de menor consistência (3), ao passo que o maior percentual de animais do grupo controle permaneceu com escore 4 (Fig. 2). Essas diferenças persistiram até o final do experimento (D<sub>120</sub>), com exceção do T2 (menor inclusão de GL), cuja consistência testicular se assemelhou ao controle no último exame (D<sub>120</sub>, Figura 2).

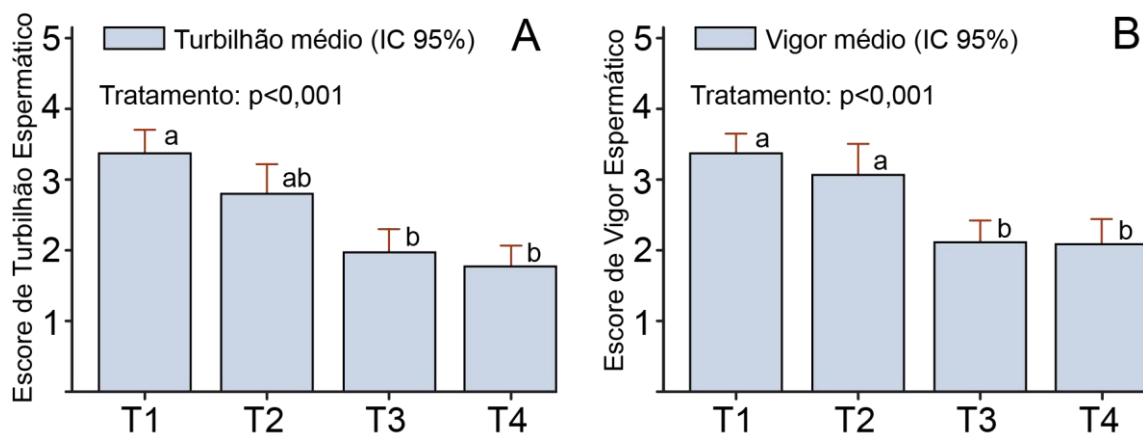
**Figura 2** - Frequência de distribuição dos escores (1 a 5) de CT em animais tratados nos grupos controle ou diferentes níveis de caroço de algodão incluídos na dieta (T2, T3 e T4). Os três gráficos representam esta variável nas coletas realizadas ao 60, 90 e 120 dias (D<sub>60</sub>, D<sub>90</sub> e D<sub>120</sub>).



Fonte: Autores.

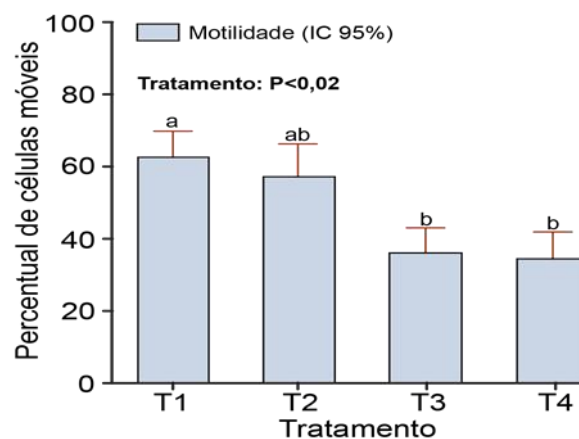
Os parâmetros seminais avaliados imediatamente após a coleta (volume, aspecto e pH), bem como as concentrações de espermatozoide/mL e por ejaculado não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). No entanto, a atividade da célula espermática (turbilhonamento, vigor e motilidade) foi influenciada pelos tratamentos ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,02$ , respectivamente). Na Figura 3, o gráfico A mostra o turbilhonamento e o vigor é apresentado em B, sendo possível observar escores médios maiores ( $p < 0,001$ ) nos animais tratados no T1 (Controle) e T2, quando comparados com T3 e T4. A motilidade espermática também foi maior ( $p < 0,02$ ) no grupo controle em relação ao T3 e T4 (Figure 4). Os efeitos de período e interação (tratamento\*período) não foram significativos para os dados de turbilhão, vigor e motilidade.

**Figura 3** - Escores médios de turbilhão (A) e vigor espermático (B) obtidos após a observação do sêmen coletado de touros tratados no grupo controle (T1) ou com níveis crescentes de gossipol livre (T2, T3). Letras diferentes entre as colunas do mesmo histograma mostram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Autores.

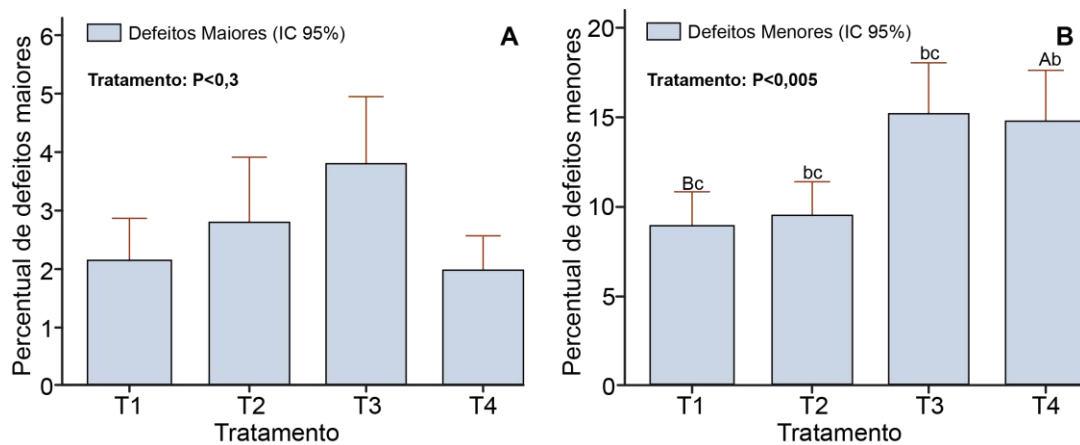
**Figura 4** - Percentual de espermatozoides móveis no ejaculado de animais tratados no grupo controle ou com diferentes níveis de inclusão de caroço de algodão na dieta. As barras superiores indicam o intervalo de confiança da média à 95% de probabilidade. Letras diferentes entre as colunas do histograma mostram diferenças ( $p < 0,05$ ) no percentual de células móveis entre os tratamentos.



Fonte: Autores.

O total de defeitos observados foram agrupados em duas categorias, maiores e menores (BLOM, 1971) e representado na forma de percentual em que foram identificados. O efeito dos tratamentos foi significativo ( $p < 0,005$ ) somente para os defeitos menores (Figura 5B), o que refletiu em uma aproximação ( $p < 0,08$ ) da diferença entre os tratamentos controle (T1) e T4.

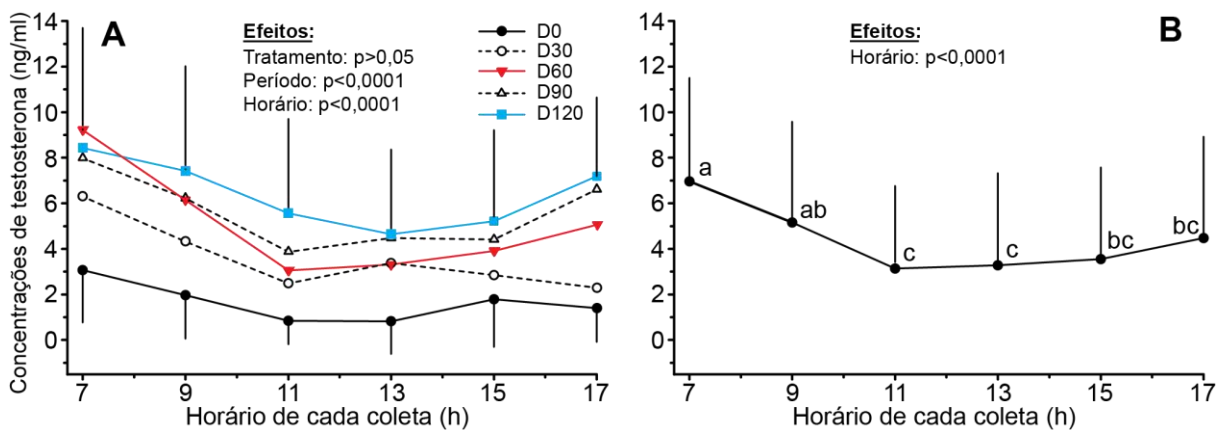
**Figura 5** - Percentual de defeitos maiores (A) e de defeitos menores (B) em ejaculados recuperados de animais tratados no grupo controle (T1) ou com diferentes níveis de inclusão de caroço de algodão na dieta (T2, T3 e T4, respectivamente). As barras superiores indicam o intervalo de confiança da média à 95% de probabilidade. Letras maiúsculas entre as colunas demonstra aproximação estatística ( $p < 0,1$ ) entre as médias dos tratamentos.



Fonte: Autores.

As concentrações plasmáticas de testosterona não diferiram ( $p < 0,05$ ) entre os animais tratados ou não com gossipol livre em diferentes concentrações. Foi observado somente efeito do período de coleta ( $p < 0,0001$ ), onde observa-se um aumento das concentrações de acordo com o período de coleta (Fig. 6A). Por outro lado, dentro de um mesmo período de coleta, as concentrações de testosterona foram maiores no período da manhã, caindo no período da tarde (Fig. 6B).

**Figura 6** - Concentrações plasmáticas de testosterona nos diferentes períodos (A) estudados (D0, D30, D60, D90 e D120) e a média dos horários de coleta (B). No gráfico B, letras diferentes indicam diferenças nas concentrações de testosterona ao longo do dia (Tukey,  $p < 0,01$ ).

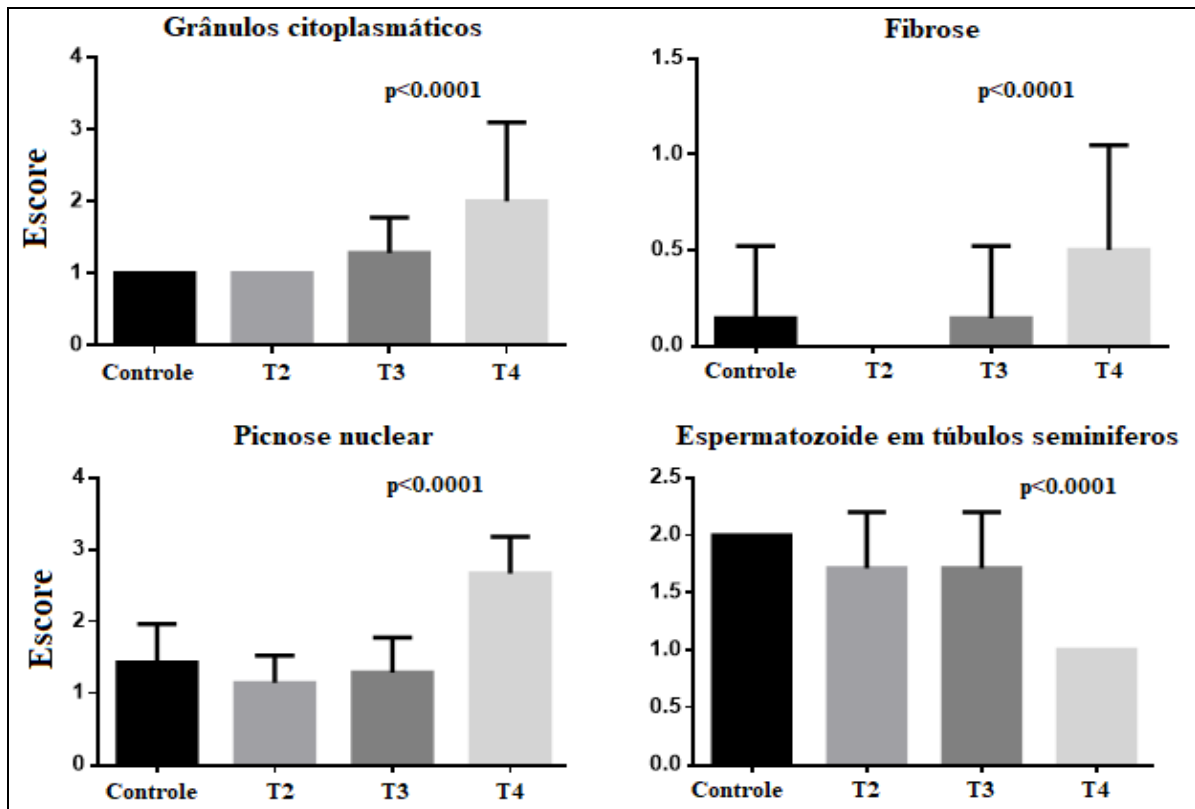


Fonte: Autores.



Nas avaliações histopatológicas ocorridas nos testículos dos touros (Fig. 7), dentro da variável grânulos citoplasmáticos o T4 e T3 demonstraram maior incidência ( $p < 0.001$ ) ao grupo controle e T2. A fibrose o T4 foi superior aos demais tratamentos ( $p < 0.001$ ). No entanto, vacúolos citoplasmáticos ( $p > 0,05$ ) pelas dietas com níveis crescentes de GL. Porém, a presença de grânulos citoplasmáticos, fibrose e picnose foram significativas ( $p < 0,0001$ ), em que o T3 e T4 diferiram dos demais tratamentos. Além disso, houve diminuição na variável espermatozoide em túbulos seminíferos ( $p < 0,0001$ ) apenas no T4.

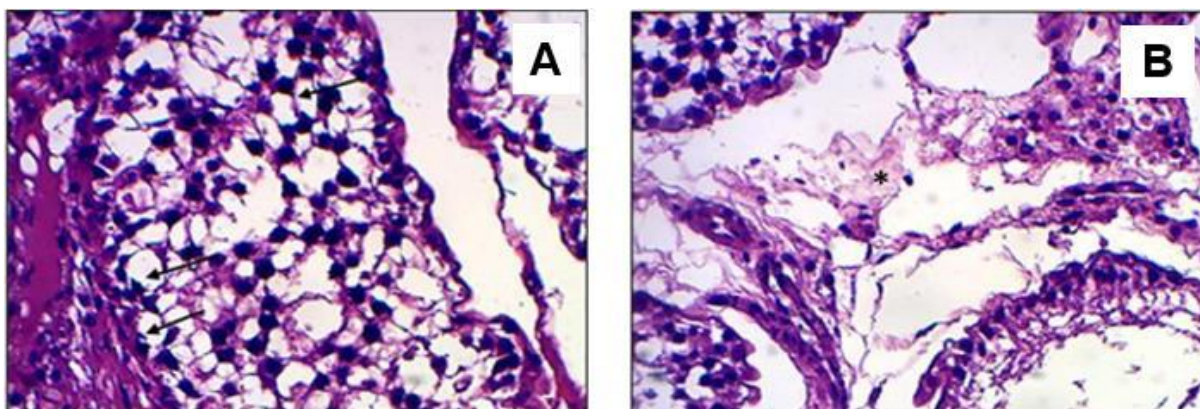
**Figura 7** - Alterações histopatológicas das variáveis analisadas nos testículos ocorridas ao final das avaliações, em touros do grupo controle ou tratados com níveis crescentes de gossipol livre.



Fonte: Autores.

As Figuras 8A e 8B apresentam as lesões nos tecidos do parênquima testiculares de touros alimentados com caroço de algodão contendo diferentes níveis de gossipol nas dietas, o que teve como consequência degeneração testicular alterando a consistência nos testículos.

**Figura 8** - Fotomicrografia de testículo bovino, mostrando as espermatogônias com vacúolos no citoplasma e deslocando o núcleo para a periferia (setas). HE, aumento de 400x. Figura B- Fotomicrografia de testículo bovino, Notar área de fibrose entremeada aos túbulos seminíferos (\*). HE, aumento de 400x.



Fonte: Autores.

#### 4. Discussão

O nível nutricional das dietas promoveu ganhos satisfatórios acima de um quilo por dia. Houve correlação positiva entre GMD nos períodos, CE e TL nos touros ( $p < 0.01$ , dados não publicados). O aumento na CE tem como consequência maior síntese de testosterona (Chacur et al., 2017), pelas células de Leydig (Assumpção et al., 2013).

Os níveis séricos de TL não alteraram entre os tratamentos com GL presente no CA. Santos et al., (2008), utilizando dieta contendo 20% de CA e outra isenta (CA), observaram também que o gossipol não causou alterações aparente nas células de Leydig e na produção de testosterona. O mesmo achado foi observado por Chase et al. (1994), em relação aos diâmetros das células de Sertoli e Leydig com dietas isenta, com 6 mg e 60 mg de GL/kg<sup>1</sup>. Nesse experimento a TL aumentou com a idade, assim como observados nesse estudo (Figura 6A e 6B). A concentração circulante de TL sofreu variações das sete às dezenove horas, mantendo níveis basais com o transcorrer do dia. O mesmo comportamento foi observado por Dias et al., (2008) com touros jovens. Dias et al. (2014), estudando animais zebuínos da raça Guzera, observaram um único pico (12,84 ng/mL) às sete horas da manhã, com estabilização na concentração sérica basal ocorrendo a partir das treze horas. Similaridades foram encontradas neste estudo, onde aumento na concentração sérica de TL também ocorreu às sete horas do dia ( $7,00 \pm 4,53$  ng/mL), com estabilização basal a partir das onze horas até as quinze horas, porém em zebuínos da raça Nelore. Em relação ao aumento de TL com o avançar da idade (Figura 6A). Assumpção et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes analisando machos da raça Nelore dos 12 aos 24 meses de idade, onde as variações cíclicas da testosterona entre as idades e concentração sérica média de testosterona atingiu níveis séricos de  $10,31 \pm 3,15$  ng/mL.

No primeiro período de avaliação ( $D_0$ ) da consistência testicular (CT), os touros apresentaram escores médios ( $3,75 \pm 0,44$ ) indicando padrões semelhantes de tonometria testicular dos animais tratados ou não com GL. No entanto, era de se esperar o mesmo comportamento de variação entre os animais, pois  $D_0$  não havia nenhuma interferência ocorrida pela ingestão do GL. Segundo Reichenbach et al. (2008), touros em idade reprodutiva devem apresentar CT elástica e firme, condizendo, assim, com os valores obtidos para esta variável no primeiro período. Pouquíssimas alterações do GL na CT foram visualizadas no segundo período ( $D_{30}$ ) com escores médios ( $3,32 \pm 0,48$ ). No terceiro período ( $D_{60}$ ) alterações na CT foram evidenciadas, de modo que no grupo controle (T1) ocorreu maior resistência a palpação sobre os demais (Fig.2). Do quarto período ( $D_{90}$ ) ao quinto período ( $D_{120}$ ) pouca alteração nos escores foram observadas. Somente os touros do T2 sofreram incrementos nas médias dos escores ( $3,29 \pm 0,76$ ). Este fato pode estar relacionado pela alta variação entre indivíduos e também em um mesmo indivíduo nas avaliações seguintes. As alterações ocorridas na CT a partir do terceiro ( $D_{60}$ ) até o quinto período

(D<sub>120</sub>) podem ser explicadas pela ação deletéria do GL sobre o parênquima testicular, em que a ação do GL foi depende da dose e do tempo de administração (Randel et al. 1992), podendo alterar a funcionalidade testicular. Para Santos et al., (2008, 2013) o GL interfere na diminuição da parede dos túbulos seminíferos, apresentando desorganização celular da parte interna dos destes, aumentando a sua luz, provavelmente contribuindo para a maior flacidez testicular, o que explica as alterações decorrentes nos animais dos tratamentos T3 e T4. As alterações da CT apresentadas neste estudo também podem ser explicadas pelos achados histopatológicos (Fig.7).

O turbilhonamento, o vigor e a motilidade são variáveis dependentes da mobilidade das células espermáticas, moduladas pela vibração do flagelo. A função do flagelo é de impulsionar os espermatozoides pelo aparelho reprodutor feminino. A energia demandada pela cauda para a vibração vem da mitocôndria contida na peça intermediária, que produz Adenosina Trifosfato (ATP), essencial para o movimento flagelar (Hafez & Hafez, 2004). No grupo controle (isenta de GL) observamos valores próximos (3,5 a 4,5, 3,5 a 4,5 e 60 a 70%) aos achados por Santos et al., (2004) com escores de 3,4, 3,6 e 75% para escores de turbilhonamento, vigor e motilidade (respectivamente). No entanto, quando avaliamos os animais tratados com GL a partir de 1.72kg de CA/touro/dia (3,3g/dia de GL), notadamente verificamos uma diminuição do turbilhão, vigor e motilidade (Figura 3 e 4). Esses achados são semelhantes aos resultados de Santos et al., (2008) com dietas de 1,71kg de CA/animal, que também encontrou decréscimo em relação a motilidade ( $66,2 \pm 5,82$ ) comparado o controle ( $73,7 \pm 4,43$ ) ( $p < 0,01$ ). Essas alterações ocorridas na mobilidade das células espermáticas pelo flagelo podem ter sido influenciadas pela diminuição da produção e pela utilização de ATP causadas pelo GL (Ueno, 1988; Santana et al., 2014). Além disso, a ingestão de determinada concentração de GL também pode inibir o influxo de cálcio e as atividades de enzimas (Mg-ATPase e CaMg-ATPase) nas membranas plasmáticas dos espermatozoides (Gadelha et al., 2011).

Uma maior percentagem de espermatozoides com defeitos foi verificada nos animais expostos ao GL em nosso experimento, provavelmente em decorrência de anormalidades ultra estruturais na membrana nuclear, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (Arshami & Ruttle, 1988). A morfologia espermática foi influenciada pelo uso de GL nas dietas de touros Nelore, sendo que o percentual de defeitos menores foi superior nos lotes com maior inclusão de gossipol no T3 e T4, com 3,3g e 4,95g de GL, respectivamente, a partir do D<sub>60</sub>. Silva et al., (2015) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de ingestão GL (0, 1,08, 2,07, 3,2, 3,84, e 5,08g GL/ touro/dia) e observaram diminuição nos valores percentuais dos defeitos menores somente no T5 (5,08 g de GL/touro/dia.). Porém, Hassan et al., (2004) concluíram que o uso de GL resultou em aumento nos defeitos maiores e menores dos espermatozoides no segundo e no terceiro períodos de coleta (dias 28 e 56). Em contrapartida, Tsuneda et al., (2015) não observaram nenhuma influência na morfologia espermática suplementando touros Nelores com CA (50g GL/touro/dia). Essas diferenças nos resultados obtidos em nosso experimento podem ter ocorrido em função de um período menor de suplementação (84 dias) em relação a deste estudo (120 dias).

Histologicamente, a degeneração testicular se manifesta inicialmente por perda ou vacuolização das células germinativas. Conforme o processo avança, a perda de células germinativas se intensifica, com possível acúmulo celular na luz dos túbulos e consequente redução na espessura do epitélio seminífero (Garcia, 2017). Neste estudo maiores lesões nos testículos foram observadas mais precisamente nos touros com inclusão de 4,95g de GL/touro/dia com a presença grânulos citoplasmáticos, fibrose, picnose nuclear e diminuição dos espermatozoides em túbulos seminíferos, além de vacuolização das células germinativas (aspecto característico de degeneração testicular) (figuras 8A e 8B). Provavelmente, a ocorrência de fibrose tenha ocorrido devido à destruição do epitélio seminífero e à reparação por tecido conjuntivo fibroso, principalmente em estádios mais avançados de degradação do epitélio testicular (Nascimento & Santos, 2003). Tais achados possivelmente estão também relacionados com a maior flacidez encontrada nos testículos (Figura 2)

## 5. Conclusão

Conclui-se que o gossipol altera os padrões de consistência testicular pela degeneração, parâmetros de mobilidade espermática (motilidade, vigor, turbilhão), e não interfere na testosterona livre. Isso indica que esse elemento deve ser utilizado na dieta com mais cautela quando se trata de futuros reprodutores em um rebanho. Estudos futuros podem verificar se a retirada do gossipol da dieta pode reverter os efeitos deletérios causados por esse elemento em determinadas características reprodutivas, indicando se essas alterações são permanentes ou transitórias.

## Referências

- Arshami, J. & Ruttle, J. L. (1988) Effects of diets containing gossypol on spermatogenic tissues of young bulls. *Theriogenology*, 30(3), 507-516.
- Assumpção, T. I., Souza, M. A., Alberton, C., Pallaoro, R., Kitagawa, C., & Silva, N. A. M. (2013). Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. *R. bras. Ci. Vet.*, 20(3), 148-154.
- Babashani, M., Lawal, M., Njoku, C.O., Ate, I. U., & Rekwot, P. I. (2014) Effects of Dietary Gossypol on Testicular Histology and Ultrasonograms of Yankasa Rams. *J. Vet. Adv.*, 4(7), 616-622.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. (2013). Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, 3 ed, Belo Horizonte, 104p.
- Chacur, M. G. M., Miyasaki, A. A., Oba, E., Souza, C. D., & Gabriel Filho, L. R. A. (2017). Body and testicular development and serum testosterone concentrations in Brahman males. *Ciências Agrárias*, 38(4), 2561-2580.
- Chase, C. C., Bastidas, P., Ruttle, J. L. Long, C. R., & Randel, R. D. (1994). Growth and reproductive development in Brahman bulls fed diets containing gossypol. *J. Anim. Sci.*, 72, 445- 452.
- Costa, Q. P. B., Wechsler, F. S., Costa, D. P. B., Polizel Neto, A., Roça, R. O., & Brito, T. P. (2011). Desempenho e características da carcaça de bovinos alimentados com dietas com caroço de algodão. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(3), 729- 735.
- Dias, J. C., Andrade, V. J., Martins, J. A. M., Emerick, L. L., & Vale Filho, V. R. (2008). Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43, 53-59.
- Dias, J. C., Emerick, L. L., Andrade, V. J., Martins, J. A. M., & Vale Filho, V. R. (2014). Concentrações séricas de testosterona em touros jovens guzerá e suas associações com características reprodutivas. *Arch. of Vet. Sci.*, 19(1), 24-31.
- Gadelha, I. C. N., Rangel, A. H. N., Silva, A. R., & Soto-Blanco, B. (2011). Efeitos do gossipol na reprodução animal. *Acta Vet. Bras.*, 5(2), 129-135.
- Gadelha, I. C. N., Fonseca, N. B. S., Oloris, S. C. S., Melo, M. M., & Soto-Blanco, B. (2014). Gossypol Toxicity from Cottonseed Products. *ScientificWorldJournal*. 2014, 231635.
- Garcia, A. R. (2017). Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 41(1), 33-39.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2004). Reprodução animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 513 p.
- Hassan, M. E., Smith, G. W., Randall, S. O., Faulkner, D. B., Firkins, L. D., Ehrharte, E. J., & Schaeffer, D. J. (2004). Reversibility of the reproductive toxicity of gossypol in peripubertal bulls. *Theriogenology*, 61, 1171-1179.
- Lilie, R. D. (1965). Histopathological technique and practical histochemistry, (3rd ed.), Published by the Blakistar Division of McGraw-Hill Book Co. New York, Toronto, London.
- Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2003). Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 93-104.
- Randel, R. D., Chase, C. C., & Wyse, S. J. (1992). Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. *J. Anim. Sci.*, 70(5), 1628-1638.
- Reichenbach, H. D., Moraes, J. C. F., & Neves, J. P. (2008). Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. (Eds.) Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo, Roca, p.57-82.
- Romero, A. C. (2013). Resíduos da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal. 2013. 113 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Santana, A. T. (2014). Mecanismos da infertilidade causada por Gossipol em ratos e efeito protetor da vitamina E / Andréia Tieme de Santana. – Dracena: [s.n.], 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Dracena/Campus de Ilha Solteira. Dracena/Ilha Solteira, SP.
- Santos, M. D., Portilho, F. K. B. C., Ruas, J. R. M., Freitas, S. H., Costa, D. S., & Simões, M. J. (2008). Morfologia testicular e qualidade espermática de touros da raça Nelore, submetidos à dieta contendo gossipol. *Rev. Bras. de Ciên. Vet.*, 15(3), 134-9.
- Santos, M. D., Rodrigues, R. S., Freitas, S. H., Costa, D. S., Ruas, J. R. M., Miranda, E. J., & Simões, M. J. (2013). Qualidade seminal, morfologia dos testículos e epidídimos de touros submetidos à dieta contendo gossipol. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo.*, 65(4), 975-80.

Santos, M. D., Torres, C. A. A., Ruas, J. R. M., Guimarães, J. D., & Silva Filho, J. M. (2004). Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro:vaca. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 56(4), 497-503.

Setchell, B. P. (1998). The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J. Reprod. Fertil.*, 114(2), 179-194.

Silva, J. M. (2015). Efeito de diferentes concentrações de ingestão de gossipol livre sobre morfometria testicular e qualidade seminal de touros da raça nelore / Josete Maria da Silva. – Cuiabá, 2015. 41 f.: il., 30 cm. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá, Cuiabá.

Tsuneda, P. P. (2015) Análise espermática e histopatologia testicular de touros Nelore suplementados com glicerina e caroço de algodão. Dissertação (mestrado)- Universidade federal de Mato Grosso, faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Cuiabá.

Ueno, H. (1988). Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. *Contraception*, 3, 333-341.

Valadares Filho, S. C., Machado, P. A. S., Furtado, T., Chizzoti, M. L., & Amaral, H. F. (2015). Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes. Editora UFV, p.473.

Vale Filho, V. R. (1997). Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 21(3), 7-13.