

18, 300627
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**GOSIPOL: UN NUEVO ANTIFERTILIZANTE
MASCULINO**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARCO ANTONIO VAZQUEZ ZALDIVAR**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO PARA EL EXAMEN PROFESIONAL

Q. IRENE MONTALVO VELARDE (DIRECTORA DE TESIS)

M.C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

Q.F.B. MARIA LETICIA LINARES ESTUDILLO

Q.F.B. ARACELI MENDIETA RERGIS

Q.F.B. CARLOS PEREZ BRISUELA

INDICE

Introducción	1
Objetivo	2
Propiedades fisicoquímicas	3
Metabolismo	8
Acción fisiológica y toxicidad del Gosipol	13
Efecto antifertilizante	23
Pruebas clínicas con el Gosipol	23
Diferentes dosis en animales superiores	26
Ratas	26
Perros y Conejos	29
Monos	34
Humanos	39
Sitios y mecanismos de acción	40
Inhibición de lactato deshidrogenasa	40
Inhibición de otras enzimas	43
Efecto hipocalémico	49
Acción en el plasma seminal	53
Inhibición de la adenilato ciclasa	53
Inhibición de la ribonucleótido reductasa y su efecto en la síntesis de DNA	54
Efectos citotóxicos diferenciales. Acción antitumoral	55
Efectos esteroideogénicos	57
Conclusiones	59
Hemerografía	61

INDICE

Introducción	1
Objetivo	2
Propiedades fisicoquímicas	3
Metabolismo	8
Acción fisiológica y toxicidad del Gosipol	13
Efecto antifertilizante	23
Pruebas clínicas con el Gosipol	23
Diferentes dosis en animales superiores	26
Ratas	26
Perros y Conejos	29
Monos	34
Humanos	39
Sitios y mecanismos de acción	40
Inhibición de lactato deshidrogenasa	40
Inhibición de otras enzimas	43
Efecto hipocalémico	49
Acción en el plasma seminal	53
Inhibición de la adenilato ciclasa	53
Inhibición de la ribonucleótido reductasa y su efecto en la síntesis de DNA	54
Efectos citotóxicos diferenciales. Acción antitumoral	55
Efectos esteroideogénicos	57
Conclusiones	59
Hemerografía	61

INTRODUCCION

El estudio acerca de la planta de algodón se ha incrementado en los últimos años, no tanto sobre la obtención de la fibra textil, que es su principal uso, sino por su importancia en la industria alimenticia, pues de la semilla de algodón se obtiene aceite de consumo humano.

Desde hace muchos años se sabe que el goslipol, compuesto fenólico biológicamente activo aislado de diferentes parte de la planta, principalmente de su semilla, es tóxico. Sin embargo, a partir de la década anterior el estudio acerca de este agente ha sido exhaustivo en diferentes aspectos: comportamiento químico, estructura, aislamiento, metabolismo, efectos fisiológicos y antifertilizantes, destacando estos últimos.

La acción antifertilizante del goslipol se conoció en China, en donde se iniciaron interesantes estudios sobre tal efecto. Actualmente, este país asiático no es el único en el que se llevan a cabo investigaciones de esta índole con el agente, sino que su propagación ha abarcado el contorno mundial; algunos de estos países son: Estados Unidos, Gran Bretaña, México, Guatemala, Brasil, Canadá, entre otros.

Diferentes científicos aseguran que este compuesto posee un efecto antifertilizante reversible tanto en el hombre como en animales machos, siendo esto de suma importancia pues todos los estudios efectuados hasta la fecha sobre el control de la población se han enfocado hacia la mujer; y controlados, principalmente, por medios hormonales.

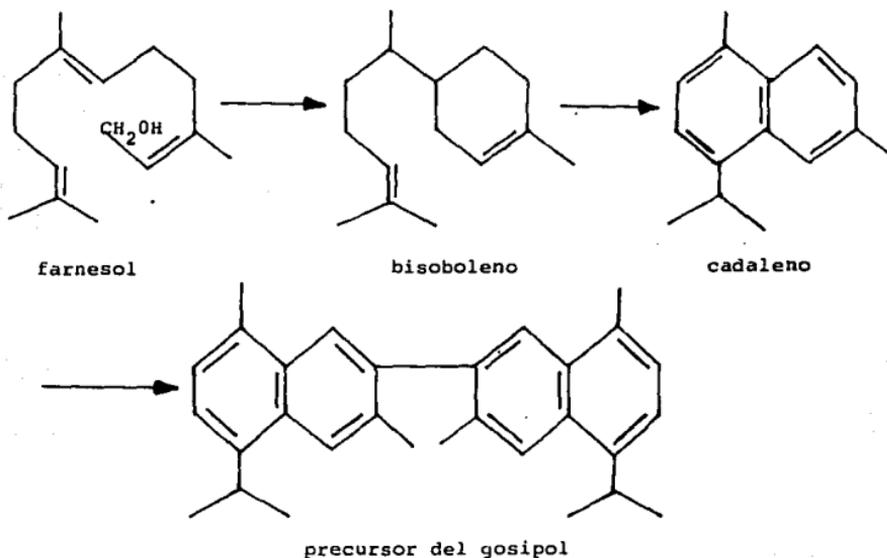
OBJETIVO

Hacer un estudio bibliográfico acerca del gopipol propuesto como un anfitriante masculino.

B) PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El gopipl ($C_{30}H_{50}O_8$) posee un peso molecular de 518.54 siendo su fórmula química: 1,1',6,6',7,7'-hexahidroxí 5,5'-diisopropil 3,3'-dimetil (2,2'-binaftaleno 8,8'-dicarboxialdehído)

Es un disesquiterpeno extraído de la planta del algodón; su biosíntesis seguramente procede de unidades isoterpénicas.



Si el gopipl se recristaliza en diferentes solventes pueden obtenerse tres compuestos con puntos de fusión distintos, a esto se le conoce como polimorfismo. Cuando se recristaliza con éter -- funde a $184^{\circ}C.$, con cloroformo a $199^{\circ}C.$ y con ligroína a $214^{\circ}C.$

Estas sustancias difieren en sus propiedades ópticas y formas cristalinas, pero no muestran cambios en sus comportamientos

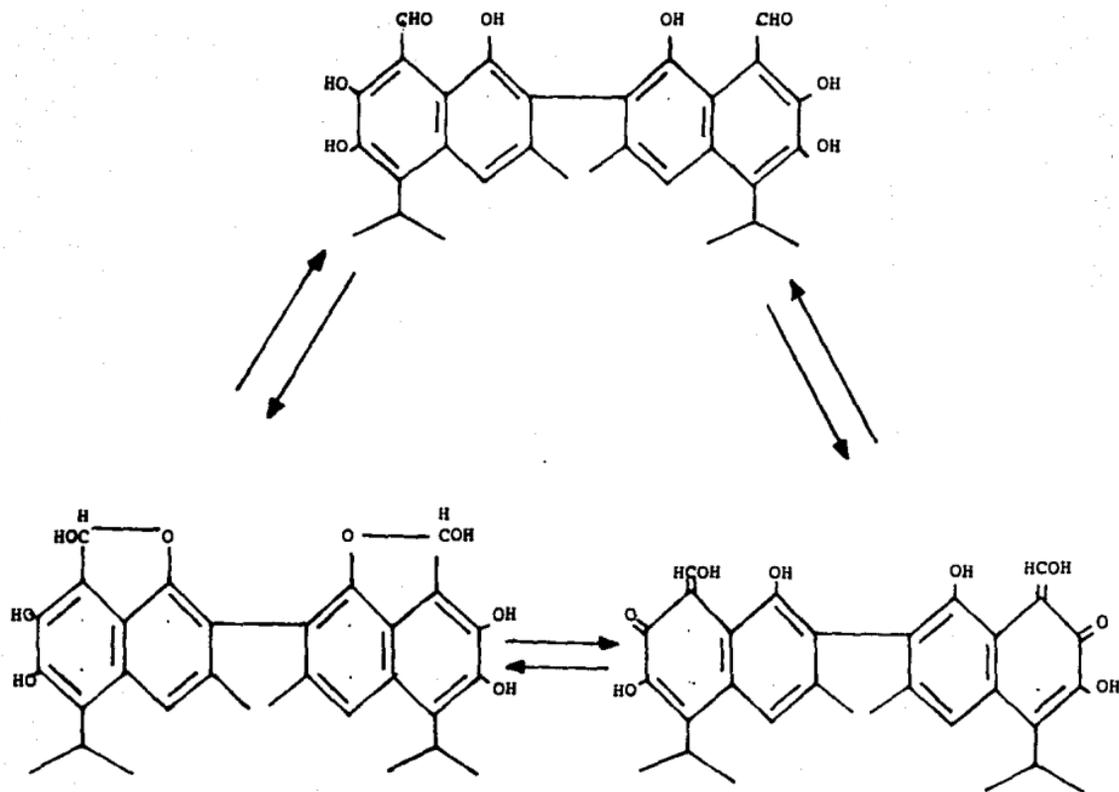


FIGURA 1. FORMAS TAUTOMERICAS DEL GOSIPOL

químico y espectral.

En un intento por esclarecer la reactividad del gopipol, los investigadores Adams y Geissman (1960) propusieron que el gopipol se encuentra en tres formas tautoméricas: aldehídica, hemiacetálica y cetónica. (15). Ver figura 1

El uso de la resonancia magnético nuclear (RMN) ha revelado cambios estructurales del gopipol en diferentes soluciones, por ejemplo, en solventes inertes se encuentra principalmente en forma de aldehído, mientras que en solventes polares, como dimetil sulfóxido (DMSO), las estructuras hemiacetálicas y aldehídicas están en equilibrio dinámico.

Existen dos isómeros ópticos del gopipol. Extracciones efectuadas a especies de Gossypium obtenían al gopipol como un racemato. Sin embargo, recientemente su (+)-isómero se separó de la especie Thespesia populnea. Las características espectrales y los puntos de fusión del (+)-isómero y del racemato son idénticos, aunque la solubilidad del primero es más evidente en compuestos orgánicos ordinarios, excepto en acetona, pues es probable que con este solvente forme diacetatos muy estables.

La estructura del gopipol muestra un isomerismo óptico debido a la rotación restringida (atropisomerismo) debido al enlace C-C existente entre los dos anillos naftaleno, así que cualquier forma no planar de la molécula está desprovista de un eje alterno o centro geométrico. Asimismo, los sustituyentes del gopipol en las posiciones orto (1,1'-dihidroxi y 3,3'-dimetil) aparte de originar un impedimento estérico generan una molécula no planar.

(81,82). Ver figura 2

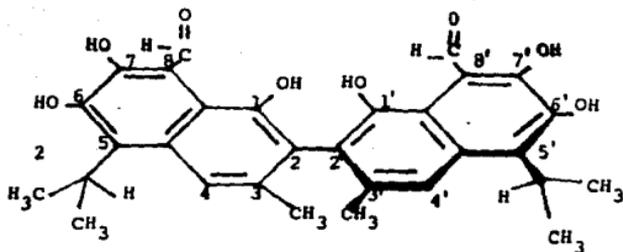


Fig. 2 Estructura del gossipol

El gossipol es soluble en álcalis, en donde forma las sales correspondientes, aunque se oxida rápidamente en dichas soluciones al contacto con el aire. Cualitativamente se identifica con un color rojo brillante al reaccionar con H_2SO_4 concentrado, mientras que, con FeCl_3 da una tonalidad verde oscuro. Forma quelatos con cationes, propiedad que posee para ser utilizado como reactivo analítico para identificar: hierro, antimonio y molibdeno. (15)

Carruth y Clark (1917) en diferentes investigaciones descubrieron tres derivados: a) Un compuesto formado por la eliminación de dos moléculas de agua por calentamiento ($\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_6$) al que posteriormente se le llamó anhidrogossipol; b) Al producto resultante de la acción de un álcali fuerte acompañado por dos moles de ácido fórmico, a éste se le designó apogossipol ($\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6$); c) El producto de la condensación entre el gossipol y dos equivalentes de anilina, con la correspondiente pérdida de dos moléculas de agua, se le denominó dianilnogossipol ($\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$). Reacciones de este tipo entre el gossipol y grupos amino libres (formación de bases de Schiff) poseen importancia fisiológica y nutricional. (6, 10, 13, 17, 46)

El gosipol libre o en cualquiera de sus formas tautoméricas es muy susceptible a los reactivos, mientras que, ligado a éteres adquiere mayor estabilidad. El tetrametil y hexametiléter fueron los primeros reportados y sirvieron como punto de referencia para la preparación de una serie de éteres mezclados, derivados de éter y productos de oxidación de los cuales se dedujeron conclusiones importantes acerca de la estructura del gosipol. (15)

El gosipol libre se encuentra distribuido a lo largo de la planta del algodón, sin embargo su concentración es significativamente más elevada en la semilla. Su distribución es la siguiente: (63)

PARTE DE LA PLANTA	GOSIPOL LIBRE
	g/100 g muestra
Raíz	0.445
Tallo	0.074
Hojas	0.297
Flores	0.397
Brotos	0.173
Semilla	0.847

C) METABOLISMO

El gopipol es absorbido a través del intestino y del epitelio estomacal.

En general, la excreción fecal es la ruta más viable por la que el gopipol, administrado oral o parenteralmente, es eliminado. Sin embargo, los mecanismos de detoxificación pueden variar en cada especie, asimismo, es posible que la susceptibilidad tóxica del gopipol difiera con la cantidad absorbida por el animal a través del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, en puercos y gallinas, la cantidad de gopipol absorbido en tejidos fue de 32.9 y 16% respectivamente. En cambio, dosis administradas oralmente a ratas con (^{14}C) gopipol durante 13 días, el 77.4% del compuesto ingerido se recuperó mediante vía fecal, mientras que el 12.1% fue expirado como bióxido de carbono y 3.1% excretado por medio de la orina. La acumulación de la radioactividad en tejidos fue relativamente baja, totalizando un 12.5% de la dosis administrada después de un día de tratamiento. La actividad específica en orden decreciente fue el siguiente: tracto gastrointestinal, hígado, corazón, riñón, bazo, pulmón, sangre, músculo, tejido adiposo, testículos y cerebro. Después de 24 horas, la actividad en todos los tejidos fue de 0.28% de la dosis administrada. (1, 5, 31, 55)

Investigaciones realizadas por científicos chinos revelaron que las ratas requirieron solamente de 19 días para eliminar el 97% de gopipol de la dosis suministrada. Algunos peces fueron alimentados durante 18 meses con una dieta provista de gopipol, seguida de otra libre del agente por un lapso de 10

semanas. Durante este período los niveles de gosipol libre disminuyeron considerablemente en todos los tejidos, sin embargo, la cantidad de gosipol ligado al término del tratamiento presentó cambios considerables. Estos estudios indican que el gosipol puede acumularse en los órganos corporales durante un tiempo prolongado. (58)

La acumulación del gosipol en el corazón causa degeneraciones histológicas del músculo cardíaco induciendo hipocalcemia, lo cual sugiere que dicho compuesto es potencialmente causante de aberraciones eléctricas en dicho órgano.

Los testículos poseen una elevada susceptibilidad para la acumulación del agente. Existen incrementos significativos en las cantidades de gosipol libre y ligado durante las primeras 4 semanas de iniciado el tratamiento; la concentración del segundo fue consistentemente menor comparada con la del primero, comprobándose con esto su efecto antifertilizante. (58)

Datos experimentales indican que la vía biliar es la ruta más obvia por la que el gosipol se transporta a través del cuerpo. Después de 1, 2, 4 y 8 días de suministrada la dosis a pollos; su presencia en la bilis fue mucho más elevada que en cualquier otro tejido u órgano del cuerpo, incluyendo el hígado. Estas evidencias sugieren que el gosipol es transferido de la sangre a la bilis, de donde fluye a través de un sistema de intercambio aniónico hepático. (12, 57)

El gosipol en circulación entra al hígado, donde se producirán glucorónidos o ésteres de gosipol, de aquí junto con la bilis, pasará a la vesícula biliar. Posteriormente, la bilis sale de dicha vesícula a través de un ducto biliar conduciéndola al intestino.

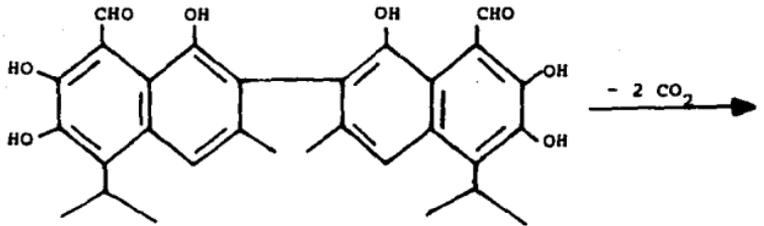
Una ruta metabólica alterna en las gallinas es por medio del huevo, el cual es muy rico en proteína. El gósipol se deposita en la yema como: gósipol-cefalina, complejos de gósipol-proteína, principalmente albúmina, o bien, unido a alguna vitamina liposoluble como la A.

La acumulación del gósipol en el huevo se efectúa en el ovario a través del torrente sanguíneo, antes de la formación del cascarón. La presencia de este compuesto ocasiona la decoloración de las yemas. (31)

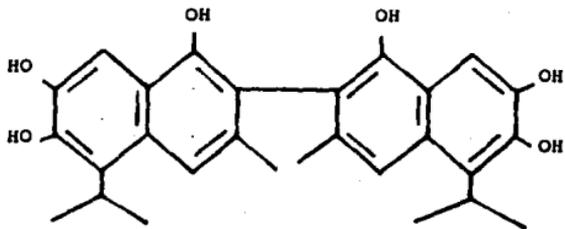
En general, para que un compuesto se excrete biliarmente en cantidades apreciables debe poseer un grupo polar aniónico fuerte y tener, además, un peso molecular mayor a 300. (30)

Análogamente, la preferencia de dicha vía ante otras rutas alternas se favorece debido a los siguientes factores: a) La carga neta del gósipol en la bilis (pH 5.88); en donde el 97% se encuentra ionizado, y b) La capacidad lipofílica del gósipol.

La descarboxilación del gósipol no es la mejor ruta metabólica en gallinas y puercos, pues de la dosis radiactiva suministrada solo el 3.3% y el 2.1%, respectivamente, se detectaron en el aire expirado, asimismo, se comprobó que el núcleo de binaftaleno no sufrió cambio alguno, solamente el grupo formilo se metabolizó a CO_2 (1,5)



GOSIPOL



APOGOSIPOL

El hierro quelatado con el gosipol, así como, los complejos gosipol-proteína son formas no absorbidas en el tracto gastrointestinal, por consiguiente, ambas se utilizan para eliminar al gosipol presente en la semilla de algodón, cuya harina se usa como alimento para ganado.

El gosipol produce anemia por su unión al hierro. La adición de sales de hierro a dietas con gosipol libre disminuye su toxicidad, aumenta la proporción de gosipol encontrada en las heces; niveles elevados de este último pueden acelerar su eliminación del cuerpo y producir hematología normal.

Un gran número de Instituciones ha estudiado el uso de la harina de algodón en alimentos para humanos, específicamente, el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), la cual desarrolló la "Incaparina" un alimento con 38% de harina de semilla de algodón, 58% maíz, 3% levadura torula y 1% carbonato cálcico. (83)

Diferentes estudios realizados en cerdos comprobaron que la adición de las sales: Ca(OH)_2 al 1% y $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ al 0.1% (sustituyendo al carbonato de la formulación anterior) llevan a cabo un efecto sinergista en la disminución del gósipol libre; esto se debe a que el tóxico forma un compuesto insoluble con el hierro, paralelamente, el pH alcalino originado por la adición de estas sales probablemente destruye al gósipol. Por consiguiente, este procedimiento debe utilizarse en la producción de harina para reducir el contenido de este pigmento. (10)

La cantidad de hierro por unidad de gósipol fue establecida de acuerdo a las investigaciones realizadas; por tanto, 5 moles de hierro por 1 mol de gósipol eliminarán el efecto tóxico del agente. (84)

En ratas, la adición de sales de hierro en la dieta reduce la acumulación de gósipol en los tejidos, acelerando su excreción fecal y, por consiguiente la vida media de su actividad corporal (^{14}C) disminuyó considerablemente. Paralelamente, la eliminación respiratoria (^{14}C) aumentó, para explicar esto se postuló al hierro como agente catalizador en el proceso de descarboxilación.

D) ACCION FISIOLOGICA Y TOXICIDAD DEL GOSIPOL

A fines del siglo pasado, el gosipol fue considerado como un desecho tóxico en el procesamiento de la semilla de algodón, sin embargo, la utilización de su pasta residual en la alimentación de ganado ha sido uno de sus principales usos.

Los primeros investigadores atribuyeron el efecto tóxico de la semilla de algodón a la presencia de: colina, betaína o bases nitrogenadas del tipo de la ptomaína y a pirofosfatos.

En 1915 se identificó al gosipol como la causa del problema, pues es definitivamente tóxico en: aves, conejos y puercos. Sin embargo, posteriormente se comprobó que el gosipol no fue el único causante del daño ocasionado, sino que también se debió al bajo contenido de vitamina A en la harina de algodón.

Gallup (1953) detectó que las ratas son más susceptibles al gosipol en dietas que poseen niveles bajos de vitamina A comparadas con dietas deficientes en otra vitamina, o en su caso completas. (15)

Mucho se ha especulado acerca de los posibles mecanismos de acción y sobre la naturaleza acumulativa tóxica del gosipol, algunos autores atribuyen este hecho al efecto inhibitorio que presenta en la conversión de oxihemoglobina a hemoglobina en la sangre, pues reduce la capacidad en el transporte de oxígeno causando efectos hemolíticos en eritrocitos sobre animales no rumiantes. Por otra parte, el gosipol interactúa con ciertas enzimas o complejos enzimáticos asociados con el ciclo de ácidos tricarboxílicos, así como, en la cadena respiratoria. Concentraciones de gosipol $7.5 \times 10^{-3}M$ y $2.0 \times 10^{-3}M$ fueron

suficientes para inhibir la actividad de la deshidrogenasa succínica y citocromo oxidasa en el hígado de pollo in vivo, respectivamente. Análogamente, el efecto del gosisol dentro de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa depende de la concentración del agente, por ejemplo: a) estimula la respiración mitocondrial a bajas concentraciones, pero a concentraciones más elevadas la inhibe, condiciones similares se presentan con la enzima adenosín trifosfatasa; b) invierte la inhibición causada por la oligomicina.¹ (13, 16, 19, 47). Ver tabla 1

Parece razonable suponer que la distribución intracelular del gosisol se debe a la afinidad que presenta con las proteínas. Cater (1968) demostró que los complejos formados se llevaban a cabo entre ciertas porciones de la proteína con el gosisol, esto es, la ruptura de las primeras es evidente dando como resultado uniones "gosisol-péptidos", compuestos altamente liposolubles. Por consiguiente, el gosisol se une preferentemente a grupos hidrofóbicos del medio celular. La actividad específica en la fracción microsomal se atribuye a la naturaleza lipofílica del gosisol-ligado, cuyo enlace es necesario para la penetración en la fase lipídica y a su vez, la correspondiente distribución en el sistema enzimático microsomal; este hecho se ha comprobado en el antibiótico desacoplante de la fosforilación oxidativa.

Tabla 1. Efecto del gosirol en la actividad de Adenosín Trifosfatasa

Concentración μM	Actividad de Adenosín Trifosfatasa ($\mu\text{moles/mg de proteína/h}$)
0	11 ± 0.3
1	14 ± 0.4
10	23 ± 0.5
20	21 ± 0.3
50	19 ± 0.2
100	17 ± 0.3
200	15 ± 0.4
300	13 ± 0.2
400	10 ± 0.3
500	0.00

fracciones celulares que contienen membranas lipoprotéicas, tales como: mitocondrias, lisosomas y microsomas. (56)

Los efectos tóxicos se llevan a cabo en la membrana celular y pueden atribuirse a interacciones específicas con proteínas, o bien, a enlaces que modifican las propiedades en la bicapa lipídica de la matriz. Asimismo, se ha demostrado que el gosipol se une fuertemente a la monocapa con diferentes composiciones lipídicas. Esta unión a mono y bicapas lipídicas disminuye el potencial de interfase en estas membranas. Para evaluar el papel del gosipol como agente químico es conveniente citar los siguientes puntos:

a) Equilibrio ácido-base y unión del gosipol con los lípidos. El gosipol presenta un equilibrio ácido-base en solución acuosa ($\text{pH} \sim 6$). Las formas cargadas y neutras del gosipol tienen diferentes efectos en las monocapas lipídicas. Las formas que modifican significativamente el potencial de interfase en las monocapas lipídicas son las que poseen carga negativa ($\text{pH} \geq 6$). Particularmente, la unión del gosipol cargado negativamente con la fosfatidilcolina vesicular es función del pH, por lo que se aseguran a pH fisiológico cambios en la interfase de las membranas inducidos por el agente.

b) Cambios potenciales inducidos por el gosipol en membranas lipídicas. Muchos de los efectos biológicos del gosipol se observan cuando se encuentra en concentraciones micromolares en fase acuosa.

Puesto que se une a los lípidos modificando el potencial de interfase de las monocapas lipídicas, análogamente se han

detectado cambios en bicapas fosfolipídicas, principalmente con fosfatidiletanolamina. Estos cambios producidos por el gosipol están relacionados con la presencia de cargas negativas de la molécula, produciéndose así un fenómeno electrostático.

La unión del gosipol con dicho fosfolípido se efectúa en una interfase solución/membrana. Los efectos del gosipol en monocapas lipídicas están relacionados con la deprotonación de éste; pudiéndose explicar esto con la interacción en la interfase monocapa/solución, debido a esto y a la conductancia que presenta el gosipol cargado negativamente, el agente es capaz de penetrar la bicapa fosfolipídica y lograr así, la permeabilidad a través de la membrana.

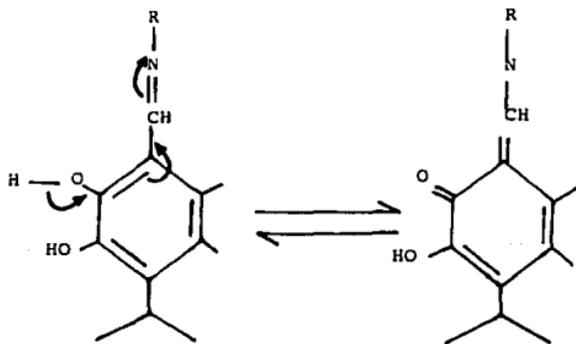
c) Posibles cambios biológicos en la membrana inducidos por el gosipol. Es posible que la membrana proteica sufra cambios ante la presencia del gosipol, pues se une, ya sea, en la interfase solución/lípido, lípido/proteína o hidrofílica/hidrofóbica. Es conveniente citar que el gosipol por medio de una interfase polar/apolar puede modificar el potencial electrostático produciendo cambios enzimáticos, o bien, en las propiedades biológicas de las membranas.

d) Acción desacoplante del gosipol. Esta acción se debe a que interactúa con una afinidad extraordinaria con los sitios activos de la membrana mitocondrial interna. El gosipol posee diferentes propiedades que sugieren que la molécula actúa como un acarreador protónico a través de la bicapa lipídica en la membrana mencionada anteriormente. (21)

Todos los cambios inducidos por el gosipol en membranas

pueden explicar los efectos de éste como desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial, asimismo, puede ser el responsable de los efectos inhibitorios de varios sistemas de transporte celular (por ejemplo, transporte aniónico en eritrocitos; $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa).

Paralelamente, se ha demostrado que el gosipol interfiere en una incompleta digestión animal debido a que inhibe ciertas enzimas gástricas. El pepsinógeno reacciona con el gosipol para formar gosipol-pepsinógeno, un zimógeno que no puede transformarse a pepsina; para lograr la activación de ésta última es necesario que el pepsinógeno separe un polipéptido de 41 aminoácidos, acción que inhibe el gosipol pues reacciona con los restos de lisina pertenecientes a dicho precursor. Por medio de una digestión ácida (0.03 M HCl a 110°C ; 40 h.) se identificaron los grupos ϵ - NH_2 libres con que interactuó el gosipol, siendo estos: Lys_{18} y Lys_{358} ; su mecanismo de reacción, probablemente fue mediante bases de Schiff. (6, 17, 42)



La inhibición completa de activación se lleva a cabo con mezclas 2:1 y 3:1 molar de gosipol-pepsinógeno en presencia de etanol al 10%; el papel de este último es de suma importancia debido a que el cambio conformacional requerido por el zimógeno se realiza más rápidamente en dicho solvente.

Las proteínas reaccionan con el gosipol en un sistema de dos fases, como se sabe, éste último es insoluble en agua mientras que las proteínas lo son en solventes orgánicos. Su interacción es dependiente del pH, llevándose a cabo a un pH de 7 o menor, ya que en soluciones alcalinas el gosipol es inestable. Estas condiciones se comprobaron con albúmina bovina (BPA) que contiene 47 restos de lisina libres (10.48%). Debido a que el gosipol posee dos grupos carbonilos libres existe la posibilidad de que uno, o ambos, estén involucrados en la reacción gosipol-proteína. Si ambos grupos interactúan con los ϵ -amino pertenecientes a la lisina pueden presentarse las siguientes alternativas: a) Un enlace que involucre una sólo molécula de proteína, y b) Dos moléculas de proteína unidas a una sólo de gosipol. Prácticamente se presentan ambos casos, las condiciones dependen de las concentraciones de cada reactivo. Por lo general, el segundo caso se presenta a concentraciones bajas de gosipol ($6 \times 10^{-3} \text{ M} - 8.8 \times 10^{-3} \text{ M}$), a concentraciones mayores de éste, se genera la formación de: dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. entre el gosipol y BPA. (46)

Bressani y colaboradores (1976) propusieron que la toxicidad del gosipol posee efectos antifisiológicos, los cuales no se pueden explicar en base al nivel de la actividad metabólica del gosipol.

En el cuadro sinóptico se puede apreciar que después de haber

ingerido el gosipol en dietas, durante varias semanas y a concentraciones elevadas; las consecuencias de la toxicidad en el organismo de la rata serían los siguientes: la penetración del gosipol libre y total y su consecuente acumulación en la bilis, donde el gosipol total se transforma a gosipol libre e hidrolizado; parte de este gosipol es excretado mediante vía fecal el restante se deposita en diversos órganos como: hígado, riñón y varios tejidos adiposos o a través de la sangre. En el hígado baja la actividad del hierro debido a la formación de quelatos causando anemia, la cual provoca una reducción en el transporte de oxígeno, teniendo como consecuencias deficiencias cardiacas y pulmonares por la obstrucción de vasos linfáticos y formación de quelatos. Debido a que el gosipol se une con los grupos amino de la lisina se produce una deficiencia en las proteínas, por lo cual baja el nivel de este aminoácido, ocasionando pérdida de nitrógeno en la orina. La acumulación de estos daños, la reducción en la síntesis de proteína; provocan fallas en el corazón, pulmón, y finalmente, llega a ocasionar la muerte.

La susceptibilidad del gosipol varía dependiendo de las especies. Por ejemplo: entre ratones, conejos, perros, cerdos, monos y ratas; los dos últimos parecen ser los más tolerantes, mientras que perros y conejos los más susceptibles. Este hecho puede apreciarse en el siguiente cuadro

LD₅₀ de gosipol (mg/Kg) en varias especies (dosis oral)

RATA	RATON	CONEJO	AVES	CERDO
2400 - 3340	500 - 950	350 - 600	280 - 300	550

El mecanismo de toxicidad del gosipol se muestra en el siguiente cuadro sinóptico.

ACCION FISIOLÓGICA TOXICA DEL GOSIPOL



E) EFECTO ANTIFERTILIZANTE

a) Pruebas clínicas con el gosipol

El efecto antifertilizante de esta sustancia se conoció por primera ocasión en una aldea de la provincia de Jiangsú en la República Popular China. En dicha población el índice de natalidad fue nulo a lo largo de 10 años (1930 - 1940); sabiendo de antemano que, la fertilidad de los habitantes de dicha villa en períodos priori y posteriori era normal. En dicha región se utilizaba el aceite de soya para propósitos culinarios, sin embargo, debido a razones económicas el uso del aceite crudo de semilla de algodón se incrementó; ante tal evidencia se propuso al gosipol, compuesto biológicamente activo de tal semilla, como la causa de la antifertilidad presentada.

Posteriormente, en la provincia de Hubei, se confirmaron los efectos antiespermatogénicos del aceite crudo de algodón en ratas y monos, desde entonces un sin número de científicos han investigado el principio activo de dicho Género. (1)

Investigaciones efectuadas en los años 60's revelaron que los machos son más susceptibles que las hembras al efecto antifertilizante. A partir de 1972 se han estado llevando a cabo estudios sobre este efecto, lugar y mecanismo de acción, farmacocinética, toxicidad y pruebas clínicas, así como estudios sobre métodos de extracción y purificación para conocer su efecto antifertilizante.

Desde la década pasada más de 10 000 hombres han sido examinados, principalmente en China. Cada uno recibieron diariamente dosis de 20 mg. hasta reducir considerablemente la cuenta espermática, lo cual se consiguió dos meses después de

iniciado el tratamiento. Subsecuentemente se mantuvo la dosis con 75 a 100 mg. suministrados dos veces al mes. Entre los primeros 4 4 000 hombres tratados en períodos comprendidos entre 6 meses y 4 años, el 99.8% presentó un marcado efecto antifertilizante, exento de evidencias toxicológicas; cerca del 13% del total de los pacientes sujetos a prueba padecieron efectos laterales comunes como: ligera debilidad, resequedad oral, fatiga y diarrea, en los primeros días del tratamiento, el 3% sufrió disminución en su apetito, mientras que, igual número presentó incremento de éste. Los niveles espermáticos volvieron a la normalidad al cabo de pocos meses después de suspendida la ingestión del agente. Los descendientes de pacientes tratados han nacido aparentemente sanos. (1, 11, 26, 71)

Una vez realizados diferentes estudios toxicológicos al gosipol, el número de voluntarios ascendió considerablemente (8806 personas hasta 1980); la dosis óptima se estipuló en 20 mg/Kg/día durante 60 - 70 días, seguido de 60 mg/semana. Después de 3 meses el éxito antifertilizante fue de 99%. Aun ingiriendo dosis mayores (60 - 70 mg/Kg/día) los pacientes sufrieron cambios en las cuentas espermáticas que, evidentemente presentaron necrospemia y azoospermia durante períodos más prolongados. Por supuesto que la mayoría de los sujetos recobraron la fertilidad una vez cesada la ingesta del gosipol, aunque el 10% de los voluntarios mantuvo la azoospermia por 6 meses, e incluso, hasta 4.5 años post-régimen; presentándose así una ligera posibilidad de irreversibilidad. Es importante mencionar que si la duración del tratamiento es superior a los 2 años, el porcentaje anteriormente citado puede aumentar considerablemente. Asimismo, estudios histológicos

cuantitativos de biopsias testiculares revelaron una latente irreversibilidad espermatogénica siempre y cuando la ingesta del aceite crudo de algodón fuese excesiva. (1)

Entre todas las especies animales existen diferencias considerables a la acción antifertilizante del gosisol. Los hamsters parecen ser los más susceptibles a este efecto seguidos de: ratas, monos y perros en orden decreciente, mientras que, conejos y ratones parecen ser menos sensibles.

Para comprobar tal susceptibilidad se ha detectado que elevadas dosis de gosisol (gosisol ácido acético 20 mg/Kg/día) causa severos daños en ratas tales como: degeneración tubular, crecimiento corporal retardado, marcada reducción en la concentración de testosterona, involuciones en la próstata, vesícula seminal, así como disturbancias gastrointestinales. (74)

b) Diferentes dosis en animales superiores.**i) Ratas**

La infertilidad en ratas se logra con dosis de 10 a 30 mg/Kg/día suministrados de 3 a 10 semanas, la recuperación de la fertilidad está relacionada con la dosis, normalmente ocurre de 3 a 12 semanas después de suspendido el suministro del gosipol. Mientras que, dosis de 7.5 mg/Kg/día administrados durante períodos de tiempo más prolongados puede inducir el efecto antifertilizante en ratas. Dosis de 3 mg/Kg/día suministrados durante una semana no genera efecto alguno.

Es difícil establecer una dosis mínima eficaz, sin embargo, con 5 mg/Kg/día durante 6 semanas es casi un hecho el logro del efecto antiespermatogénico, aunque suministrando 6 mg/Kg/día a lo largo de 5 semanas puede afirmarse que no presenta efecto alguno. La susceptibilidad de las ratas hacia el gosipol presenta una variación individual marcada; tratamientos largos pueden ocasionar atropía completa en los túbulos seminíferos, siendo la esterilidad consecuencia de esta condición. (1, 39, 76)

Esto puede esquematizarse en la siguiente tabla:

TABLA 2. DOSIS ORALES TOXICAS DE GOSIPOL EN RATAS

Dosis (mg/Kg/día)	Semanas	Manifestaciones
7.5	52	Histología normal de: corazón, hígado, riñón. Médula ósea y cuadro sanguíneo normales. Supresión de fertilidad, apareamiento normal; -afecciones al epitelio germinal -sin degeneraciones severas. Células Leydig sin alteraciones.
7.5	12	Histología de órganos normal; infertilidad severa; apareamiento normal.
10	12	Pequeño incremento de γ -globulina, aunque se normaliza después de suprimida la incorporación del agente. Necrosis focal de hígado; histología del riñón y corazón normal. Infertilidad severa, células Leydig sin alteraciones.
10	26	Médula ósea y cuadro sanguíneo normales; histología de órganos vitales normales. G6PDH, G6Pasa, ATPasa, AKPasa, ACPasa, RNA Y DNA del riñón sin alteraciones. Infertilidad marcada, apareamiento normal.

Dosis (mg/Kg/día)	Semanas	Manifestaciones
15	10	Histología normal de corazón, <u>pu</u> <u>m</u> ón, riñón, hígado, bazo, estóma- go e intestino delgado. Médula ó- sea normal.
20	39	Histología hepática normal, aun-- que algunos animales mostraron <u>li</u> geros cambios degenerativos en - las células hepáticas e incremen- to en la actividad de SDH.
30	10	Sin cambios en el peso corporal y peso de las glándulas sexuales. SDH y ATPasa testiculares e híga- do normales. Infertilidad; epite- lio germinal dañado en algunos a- nemales.
30	16	Sin cambios en el peso corporal y peso de las glándulas sexuales. Histología normal de: corazón, hí- gado, pulmón, riñón y bazo. Infla- maciones ocasionales de diferen-- tes órganos. Infertilidad desde - la decimoquinta semana. Afección a epitelio germinal iniciada a - partir de la segunda semana. Células Leydig sin alteración <u>vis</u> to bajo el microscopio electróni- co.

ii) Perros y conejos

La susceptibilidad de los perros al efecto antifertilizante es menor, pues dosis que son tóxicas para otros animales pueden más o menos inhibir la espermatogénesis. En conejos, el gosipol no induce infertilidad, 10 mg/kg/día administrados durante 14 semanas afectaron la concentración espermática y motilidad en la eyaculación, sin embargo, conejos hembras inseminadas con espermatozoides de machos bajo tratamiento fueron fecundadas sin diferencias significativas comparadas con el control. Al aumentarse la administración de gosipol a razón de 10 mg/Kg/día durante 77 a 250 días, los animales no presentaron cambios significativos en la motilidad espermática, morfología y cantidad, no obstante la muerte sobrevino debido al efecto tóxico generado por el gosipol, esto significa que: hígado, pulmones y tracto gastrointestinal son sitios de acción primarios de este compuesto en conejos. (68, 78).

Esto puede esquematizarse en las siguientes tablas:

TABLA 3. DOSIS ORALES TOXICAS DE GOSIPOL EN CONEJOS

Dosis (mg/Kg/día)	Días	Manifestaciones
16	14 - 140	Cuadro sanguíneo normal, bradicardia en algunos animales. El 60% de los animales murieron.
80	8 - 17	Pérdida de apetito y peso, disnea, parálisis corporal parcial, colapso. Muerte después de 8 - 17 días de iniciada la dosis. Autopsia: congestión hepática y pulmonar. Fertilidad y semen espermático normales poco antes de la muerte.
40	23 - 35	Similar al anterior. Muerte después de 23 a 35 días de iniciada la dosis.
20	35 - 84	Similar al anterior. Muerte después de 35 a 84 días de iniciada la dosis.
10	77 - 250	Similar al anterior. Muerte después de 77 a 250 días de iniciada la dosis.

Dosis (mg/Kg/día)	Días	Nº. de animales	Manifestaciones
1.5	60 - 141	4	Pérdida de apetito y peso, debilidad, diarrea, disnea. Repentina muerte de todos los animales de 60 a 141 días de iniciado el tratamiento. Autopsia: dilatación cardíaca, edema, lisis y atropía del miocardio; congestión hepática. Inflamación y degeneración de los túbulos renales. Congestión pulmonar y edema. Causa de muerte: lesiones cardíacas. Epitelio germinal: ligera afección.
3.0	51 - 64	4	Similar al anterior, exceptuando al hígado que presenta degeneración lipídica; epitelio germinal ligeramente dañado.
3.0	18 - 28	4	Anorexia severa, pérdida de peso, debilidad, náuseas, vómito, diarrea, anemia, caquexia; muerte de 18 a 28 días después de iniciado el tratamiento. Autopsia: similar al anterior, exceptuando al hígado que presenta degeneración lipídica, así como necrosis. Causa de muerte: caquexia. Alteraciones en epite--

Dosis (mg/Kg/día)	Días	Nº. de animales	Manifestaciones
3.0	18 - 28	4	Anorexia severa, pérdida de peso, debilidad, náuseas, vómito, diarrea, anemia, caquexia; muerte de 18 a 28 días después de <u>i</u> niciado el tratamiento. Autop-- sia: similar al anterior, excep- tuando al hígado que presenta - moderada degeneración lipídica, así como necrosis. Causa de - muerte: caquexia. Alteraciones en epitelio germinal: ligero a moderado.
1.0	129-130	2	Anorexia, pérdida de peso, debi- lidad, taquicardia. Muerte re-- pentina después de 129 y 130 - días después de iniciada la do- sis. Autopsia: miocarditis y en- docarditis.
5.0	73	2	Un perro murió en el día 73 de iniciado el tratamiento. Mani-- festaciones similares al ante-- rior.
1.0 - 3.0	25 - 131	12	Anorexia, vómito, diarrea, debi- lidad, braquicardia. Algunos pe- rros murieron en los días: 25, 43, 60, 63 y 131 de iniciada la dosis. Autopsia: dilatación car- diaca e hipertropía, endocardi-

Dosis (mg/Kg/día)	Días	Nº. de animales	Manifestaciones
			lio germinal: ligero a moderado.
1.0	129 - 130	2	Anorexia, pérdida de peso, debilidad, taquicardia. Muerte - repentina después de 129 y 130 días después de iniciada la <u>do</u> sis. Autopsia: miocarditis y - endocarditis.
5.0	73	2	Un perro murió en el día 73 de iniciado el tratamiento. Manifestaciones similares al anterior.
1.0 - 3.0	25 - 131	12	Anorexia, vómito, diarrea, debilidad, bradicardia. Algunos perros murieron en los días: - 25, 43, 60, 63 y 131 de <u>inicia</u> da la dosis. Autopsia: dilatación cardíaca e hipertropía, endocarditis, congestión de <u>ri</u> ñón y bazo; degeneración lipídica y necrosis hepática, edema y hemorragia pulmonar. <u>Inhi</u> bición espermatogénica: no -- obvia.

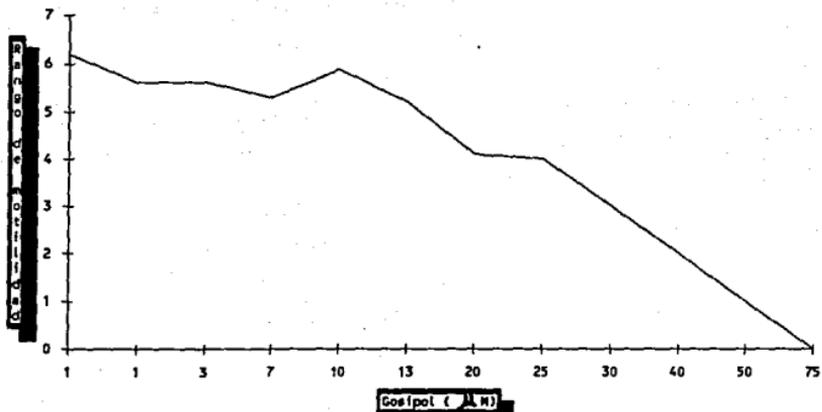
iii) Monos

Los monos son moderadamente susceptibles al efecto antiespermatogénico del gopipol, esto es, monos rhesus al ser tratados con dosis de 4 mg/Kg/día durante 2 años, la espermatogénesis fue completamente inhibida en 2 de 3 animales, en el tercer animal algunas espermátidas y espermatozoides fueron encontrados en los túbulos seminíferos. Asimismo, se ha comprobado que el gopipol inhibe la motilidad espermática en rhesus, resultado de la unión del agente en el espermatozoide de una manera irreversible; esta interacción esta relacionada con la inhibición glicolítica y dependerá, desde luego, de la cantidad de espermatozoides y concentración de gopipol administrado. (61)

En monos Cynomolgus tratados con 10 mg/Kg/día durante 6 meses presentaron una disminución significativa en la concentración espermática, así como alteraciones en su motilidad. Análisis efectuados al semen eyaculado demostraron que no hubo variaciones considerables en los niveles plasmáticos, hormona luteinizante, testosterona y células Leydig. (36). Gráficas 3 y 4.

Asimismo se esquematiza en la tabla 5

Gráfica 3. Inhibición de la actividad espermática en monos.



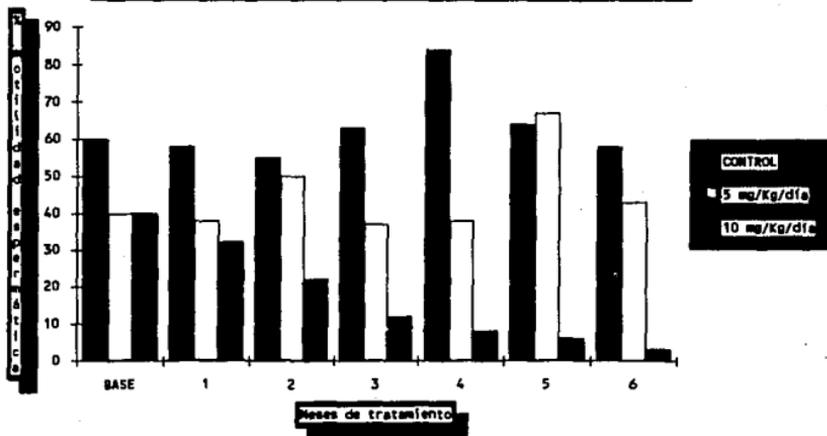
Gráfica 4. Efecto del gosipol en la motilidad espermática en monos *Cynomolgus*

TABLA 5. DOSIS ORALES TOXICAS DE GOSIPOL EN MONOS.

Dosis (mg/Kg/día)	Meses	Nº. de animales	Manifestaciones
1 - 2	14	3	Función renal, histología de corazón y riñón, LDH y ATPasa renal normales. Cambios hepáticos ultraestructurales temporales. (Distensión del retículo endoplasmático, incremento de lisosomas).
4.0	24	3	Plasma: Na, K, Mg, Cl, creatinina y LDH normales. Na, K, Mg, Cl, creatinina, LDH y AKP urinarios normales. K celular normal, incremento Na celular. Miocardio: congestión ligera, disminución de LDH-1,2, aumento de LDH-3,4,5. - ATPasa sin alteración. SDH sin cambio o con ligero incremento. Ultraestructura esencialmente normal. Hígado: ligera distensión; vacuolización parcial en la zona central del lóbulo. Cambios ultraestructurales temporales (distensión y vacuolización del retículo endoplasmático, aumento de lisosomas, disminución de ribosomas, daños mitocondriales) LDH, G6PDH, ATPasa y RNA sin cambios.

Dosis (mg/Kg/día)	Meses	Nº. de animales	Manifestaciones
8.0	4	2	<p>Riñón: inflamación de los tubulos proximales; alteraciones mitocondriales; disminución de ATPasa y ACPasa; gránulos yuxtglomerulares y G6PDH sin cambios. Histología de: bazo, estómago, intestino y suprarrenales normales. Epitelio germinal marcadamente dañado en 2 animales, aunque en el tercero unas cuantas espermátidas y espermatozoides se mantuvieron presentes.</p> <p>Miocardio estriado con ocasional inflamación y acidocitosis. Hígado: ligera inflamación, infiltración lipídica, inflamación focal y acidocitosis. Asimismo inflamación del túbulo renal.</p>
5 - 10	6		<p>Efectos laterales sin consideraciones clínico - patológicas. Disminución en la cuenta espermática así como en la motilidad.</p>

iv) Humanos.

Dosis continuas de gopipol suministradas a hombres generan células exfoliadas en el semen humano, principalmente en las fases intermedia y terminal de las espermátidas. Asimismo se detectaron pequeñas cantidades de células dobles y multinucleadas al término del primer mes, seguido por un incremento gradual de espermaticitos y espermatogonias primarias. Después del quinto mes, el semen presentó amplias variaciones individuales. En general, tres aspectos pueden diferenciarse:

- a) Semen carente de células.
- b) Semen con predominio de espermátidas.
- c) Semen con predominio de espermaticitos.

El primer punto se acentúa cuando el tratamiento se extiende por largos períodos.

Con respecto al segundo aspecto, las espermatogonias y espermaticitos mantuvieron su capacidad de división dando lugar con esto a la formación de un incesante número de nuevas espermátidas.

La actividad normal del epidídimo es prerequisite para una maduración y motilidad adecuadas del espermatozoide, y este sitio parece más específico y susceptible en ratas que para cualquier otro animal, por tanto, alteraciones en esta región generan cambios bioquímicos significativos tales como: disminución de la secreción de inositol y carnitina, cambios ultraestructurales en las células epiteliales con pinocitosis (engolfado de materiales externos sólidos y líquidos, respectivamente, por parte de la membrana celular) generada por una vacuolización del citoplasma

ocasionando alteraciones como: ruptura de caudas y cabezas espermáticas, defectos flagelares, pérdida de la membrana celular, cabezas de espermatozoides deformadas, etc. (1, 2, 14, 78)

c) Sitios y mecanismos de acción.

Muchos investigadores han postulado que las células mitocondriales espermáticas son el sitio de acción del gosispol, puesto que la presencia de este agente inhibe la actividad de las enzimas Na-K-ATPasa y lactato deshidrogenasa X (LDH X), la primera está relacionada con el efecto hipocalémico mientras que la segunda puede ocasionar antifertilidad. Ambas enzimas se encuentran en la mitocondria, indicando que este es un sitio preponderante de la acción del gosispol, también se ha demostrado que este agente puede inhibir otras enzimas mitocondriales como piruvato deshidrogenasa.

i) Inhibición de lactato deshidrogenasa.

Gran cantidad de lactato deshidrogenasas son encontradas a lo largo del cuerpo, diversas isozimas originadas por una asociación de distintos polipéptidos forman moléculas que poseen propiedades: físicas, químicas y catalíticas. El gosispol posee un efecto inhibitorio sobre cada una de ellas.

El efecto inhibitorio más grande del gosispol es sobre la enzima lactato deshidrogenasa isozima X o C_4 (E.C. 1.1.1.27) que juega un papel importantísimo en el metabolismo espermático y además se encuentra exclusivamente en las células gametogénicas de testículos mamíferos.

El gosispol es un inhibidor competitivo de un cofactor necesario para la actividad enzimática ocasionando así que la producción espermatogénica sea inhibida.

La isozima lactato deshidrogenasa X (LDH X) está asociada con las células espermatoogénicas, y su gran afinidad hacia el gopipol se debe a que posee largas cadenas de α -cetoácidos como lactato y piruvato. Esta isozima está integrada en un sistema de transferencia de H del citosol hacia la mitocondria, consecuentemente parece que la LDH X está relacionada con el proceso metabólico que provee de energía para la motilidad y supervivencia del espermatozoide. (23, 25, 65, 71)

Las ratas posee principalmente 3 lactato deshidrogenasas predominantes: LDH X, LDH A₄ y LDH B₄, siendo la primera testicular mientras que las restantes somáticas. En total existen 32 residuos diferente entre dichas enzimas, algunos de ellos por citarlos son:

<u>POSICION</u>	<u>ISOZIMA</u>	<u>RESIDUO</u>
	LDH X	Alanina
28	LDH B ₄	Glutamina
	LDH A ₄	Acido aspártico

Estos cambios pueden ser, parcialmente, los responsables de las diferentes cinéticas entre estas enzimas. Por ejemplo, la posible sustitución de glicina en la posición 27 por arginina puede explicar la actividad catalítica del LDH X para que actúe como coenzima el NADP. (7, 44)

La isozima LDH X es hidrofóbica debido a los aminoácidos que posee, principalmente, en sus sitios activos, tales como: metionina en la posición 98 (reemplaza a la glutamina en LDH A₄ y LDH B₄) y glutamina en la posición 102 (sustituye al ácido glutámico en las isozimas somáticas). El aumento de hidrofobicidad en dichos sitios explica el comportamiento específico de esta enzima testicular. Debido a estas propiedades, el gopipol puede

formar fácilmente complejos, esto aclara por qué la LDH X es la más susceptible de las 3 isozimas a la inhibición causada por dicho agente. Es importante citar que el gosipol también puede inhibir la actividad de otras enzimas, tales como: glutatión-S-transferasa, malato deshidrogenasa, deshidrogenasa succínica, citocromo oxidasa y xantina oxidasa. (7)

Es un hecho que el efecto del gosipol sobre las oxidorreductasas es energético, pues el microorganismo Trypanosoma cruzi, parásito portador de la enfermedad del Chagas, al incubarlo durante 5 minutos en una suspensión 100 μM de gosipol su motilidad fue inhibida completamente. Mientras que, a bajas concentraciones (0.01 μM) el crecimiento de dicho microorganismo se reduce significativamente. (25, 44)

El efecto cinético inhibitorio del gosipol hacia LDH X varía de una especie a otra. Por ejemplo, la inhibición de dicha enzima en hamsters y humanos fue competitiva con respecto a NADH. Esto sugiere que el gosipol puede unirse al LDH X sin afectarse el complejo enzima-sustrato. Sin embargo, la posibilidad de que dicha inhibición sea reversible fue latente debido a la disminución de la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$). Por otro lado, la LDH X procedente del testículo de hamster presentó una inhibición no competitiva-competitiva con respecto al α -cetobutirato, lo cual indica que el gosipol se une a la enzima con el sitio activo compitiendo así con el complejo enzima-sustrato también formado. En cambio, la inhibición de LDH X testicular humano fue competitivo con respecto al α -hidroxiácido citado, sugiriendo así que el gosipol compite con el sustrato por el sitio activo. (23, 25, 33, 37, 61, 71).

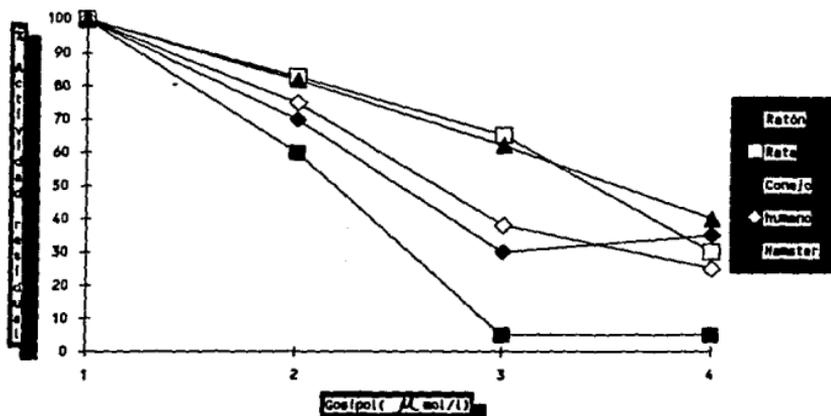
Gráf. 5

ii) Inhibición de otras enzimas.

La inhibición de LDH X origina efectos directos e indirectos, con respecto a los primeros, el gosipol a concentraciones tan bajas como 5.6×10^{-5} M genera la disminución del nivel intracelular de ATP ocasionado por la interrupción de la glicólisis, aportadora de ATP necesario para la motilidad espermática. Sin embargo la severa inhibición de esta ruta metabólica causada por el gosipol puede compensarse en el espermatozoide por medio de la reducción de adenina nucleótido (NADH).

El efecto indirecto del gosipol sobre la glicólisis espermática es la inhibición de ciertas enzimas intermediarias en esta ruta. El gosipol reduce los niveles de: fructosa 1,6-difosfato, dihidroxiacetona fosfato y, posiblemente, gliceraldehído 3-fosfato.

Gráfica 5. Efecto del gossipol sobre la enzima LDH-X testicular in vitro



Gráfica 5. Efecto del gossipol sobre la enzima LDH-X testicular in vitro. El agente fue preincubado con citosol testicular durante 15 minutos antes de la adición de sustratos. Las concentraciones de estos últimos fueron: 1 mmol α -cetobutirato/l y 0.17 mmol NADH/l para hamsters, hombres y conejos; 4.1 mmol α -cetobutirato y 0.17 mmol NADH/l.

Estos tres compuestos intermedios se encuentran en constante equilibrio, su reducción provoca la inactivación de la enzima gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.12). Otra explicación acerca de la disminución de estos 3 intermediarios es la posible activación de la enzima -glicerofostato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.8) debido al NADH acumulado por el efecto primario del gopipol (disminución del nivel intracelular de ATP). Alternativamente, la fosforilación de la fructosa 6-fostato puede ser insuficiente debido a la disminución en los niveles de ATP. (45, 60, 61, 70, 73). Ver gráfica 6

El adenosín trifostato (ATP) es una fuente energética sintetizada y utilizada continuamente para la motilidad espermática. En condiciones normales del 70 al 80% del ATP es requerido para esta actividad, mientras que el 30% restante es empleado en otros procesos fisiológicos.

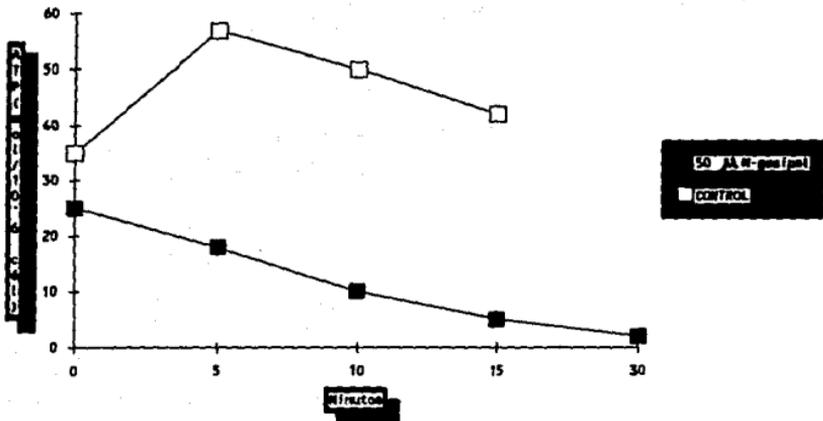
La motilidad espermática es el resultado de sucesivos movimientos flagelares de contracción y extensión. Un flagelo es una estructura interna que contiene un axonema con pequeños filamentos a lo largo de su estructura.

Parece que el efecto inhibitorio en la actividad ciliar se genera por la interacción de la dineína (ATPasa del axonema flagelar y encargada de convertir la energía química a mecánica) con el gopipol. (28, 54, 80). Ver gráficas 7 y 8.

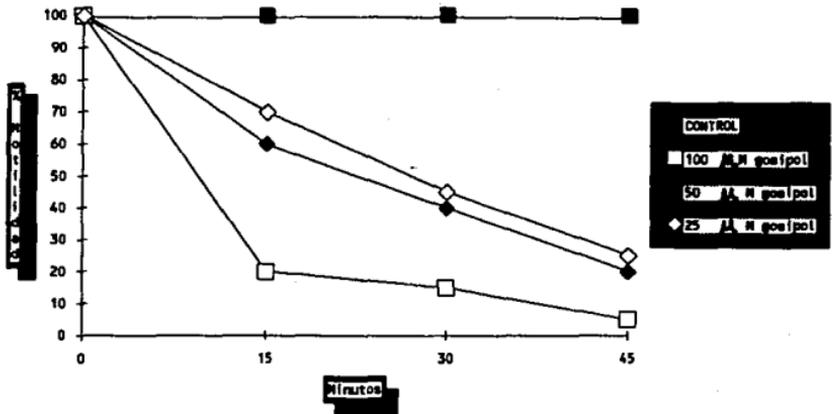
El contenido de ATP es esencialmente estable a concentraciones de 1.8×10^{-5} M del agente; manifiesta ligeras afecciones a 5.6×10^{-5} M, mientras que, la presencia de gopipol a 10^{-4} M produce la inhibición completa de dichos axonemas.

Al pasar el espermatozoide a través del epidídimo se llevan a

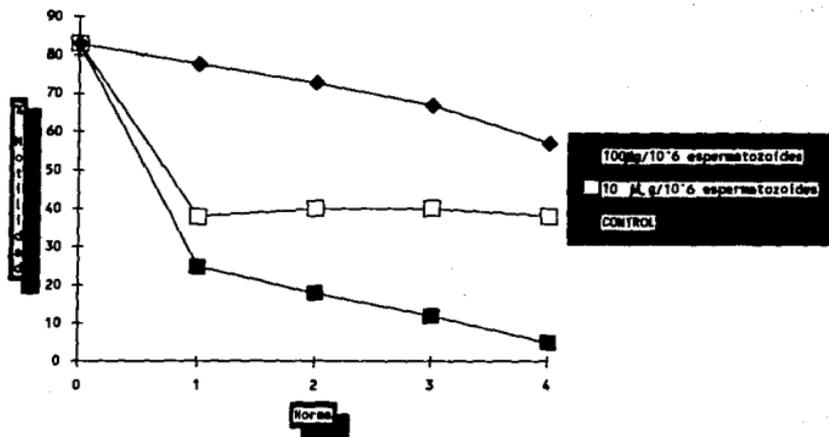
Gráfica 6. Efecto del gossipol en la concentración de ATP en espermatozoides humanos



Gráfica 7. Efecto en el incremento de gosirol entre la motilidad espermática en humano



Gráfica 8. Efecto del gosal pol ácido acético sobre la motilidad espermática en humanos



cabo cambios en la superficie celular, membrana plasmática y citoplasma. Las lesiones generadas por el gosipol en el espermatozoide son específicas, esto es, aparentemente la región nuclear y acrosomal no presentaron cambios, mientras que, en la zona caudal se llevaron a cabo alteraciones considerables, tales como, evaginaciones y subsecuentes dislocaciones de las fibras axiales ocasionadas, probablemente, por la interacción del gosipol durante el transporte epididimal. La existencia de un polipéptido asociado con la fracción queratinosa caudal del espermatozoide formado por enlaces disulfuro, es donde, probablemente actúa el agente alterando estructuralmente la fracción proteica y, por consiguiente, su desarrollo morfológico y de maduración.

El zinc juega un papel importante en la formación de enlaces disulfuro, por tanto, su quelación por parte del gosipol puede generar los cambios anteriormente mencionados.

Los cambios morfológicos dependen de la duración del tratamiento; dosis prolongadas (20 mg/Kg/día durante un mes) interfieren en la motilidad espermática, mientras que, al noveno día de iniciado el tratamiento solamente se indujeron lesiones espermáticas a nivel mitocondrial. Ambas alteraciones son reversibles. (14, 49, 50)

d) Efecto hipocalémico.

La parálisis hipocalémica es un efecto lateral frecuente ocasionado por el gosipol, pues el 0.75% de los sujetos en tratamiento (mencionado en la parte inicial de este capítulo) lo presentaron, por lo que se constituye como el principal obstáculo para aplicarlo como agente antifertilizante. El cuadro clínico del síndrome hipocalémico es el siguiente: fatiga, debilidad muscular iniciada por las extremidades inferiores extendiéndose gradualmente hacia las superiores, aunque sin afectar los músculos

respiratorios.

Qian (1975) demostró que el gopipol disminuye el contenido de potasio en el miocardio del conejo. Posteriormente, se descubrió que dicho agente reduce la concentración intracelular del K^+ en ratas alimentadas con dietas pobres en dicho ion. Análogamente, este fenómeno se presentó en los humanos; analizando esto, se puede concluir que la parálisis hipocalémica de los individuos bajo tratamiento no es una coexistencia casual de diagnóstico desconocido, sino que está relacionado con la administración del gopipol. Este mismo investigador (1979) sugirió que el agente inhibe la actividad de la enzima Na-K-ATPasa o algún otro sistema enzimático Mg-dependiente asociado con el metabolismo energético. Esta hipótesis está basada en los siguientes hechos:

1) La depleción del potasio causada por el gopipol puede invertirse por la acción del ion magnesio, que es cofactor para la enzima Na-K-ATPasa.

2) El gopipol actúa sobre el metabolismo del potasio de ratas y humanos siempre y cuando presenten una baja ingesta de dicho ion, ya que la Na-K-ATPasa es más susceptible a inhibidores específicos a estas condiciones.

El gopipol inhibe la actividad renal de esta enzima en puercos de guinea alimentados con dietas relativamente bajas en potasio, la incorporación de este ion a la dieta, puede suspender dicha inhibición. Proporcionando dietas normales antifertilizantes a: ratas, puercos de guinea, conejos y monos el efecto de la actividad de Na-K-ATPasa no es significativa. Las dosis prolongadas inhiben la acción de dicha enzima en ratas y puercos de guinea, además en estos últimos la actividad de la Na-K-ATPasa del músculo esquelético también se ve afectada.

La enzima Na-K-ATPasa es la responsable del mantenimiento adecuado del ion K intracelular, la inhibición de esta conduce inevitablemente a una disminución en la concentración de tal ion, pérdida renal de potasio y depleción corporal de éste. Esto se comprobó con la excreción urinaria de (^{42}K) la cual se incrementó en ciertas fases con la administración del isótopo.

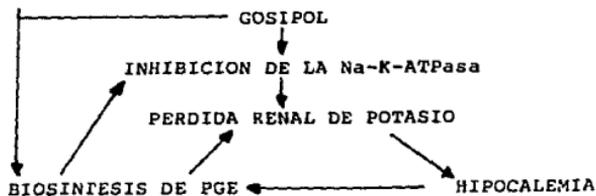
Por otra parte hay factores que afectan la distribución del potasio a nivel celular, entre ellos están: concentración de iones hidrógeno, insulina, aldosterona y catecolaminas.

No se considera que los cambios en la concentración de iones hidrógeno actúen en la disminución de la concentración de potasio puesto que, el pH del plasma se mantiene estable. Es también improbable que el efecto hipocalémico causado por el gosipol sea generado por la insulina ya que en tal acción no existen cambios en la concentración plasmática de glucosa. Las catecolaminas afectan la distribución de potasio a través de la estimulación de β -adrenérgica generando así la hipocalemia, aunque esta no es la única responsable para causar el efecto. Por otro lado, la aldosterona que posee una importante actividad en el transporte de electrólitos extrarenalmente; es posible que el gosipol estimule la separación de la aldosterona o que tenga una acción parecida a esta. Por tanto, el efecto hipocalémico del gosipol puede explicarse debido a la gran actividad de la aldosterona, que si es elevada puede incrementar la excreción urinaria del potasio.

La mayoría de los individuos sujetos a dietas con gosipol no presentaron hipocalemia, siendo la concentración de potasio normal. Intentos para producir hipocalemia no han resultado satisfactorios. En ratas, el gosipol no afecta significativamente

en la excreción fecal y urinaria del potasio.

Los únicos dos casos en que se ha inducido una hipocalcemia crónica por parte del gosisol ha sido en Jiangsú, provincia de China. Qian (1981) postuló un mecanismo para explicar el desarrollo de hipocalcemia crónica inducida por el gosisol. Este agente inicia una secuencia de eventos, incluyendo la inhibición de Na-K-ATPasa, responsable del transporte intracelular del potasio, así como de la pérdida del potasio renal. La eficiencia de este ion podría aumentar la biosíntesis renal de la prostaglandina E_2 (PGE) generando así una pérdida considerable del potasio renal. Es evidente la formación de un ciclo, en el cual es interesante mencionar que, tanto la PGE y el nivel intracelular de potasio, inhiben la actividad enzimática de Na-K-ATPasa y que el gosisol puede, por sí mismo, estimular la biosíntesis de la prostaglandina. Después de todas estas relaciones, el ciclo causante del efecto hipocalémico es el siguiente:



El ciclo continua aun después de suspendida la ingestión del gosisol. La adición de indometazina puede bloquear el ciclo interrumpiendo la biosíntesis de la prostaglandina. (1, 27, 69)

e) Acción en el plasma seminal.

Se ha demostrado experimentalmente que el gospol (1.5×10^{-5} M) inhibe la actividad potencial de la proteinasa ácida (en su forma proenzimática) del plasma seminal humano.

La importancia fisiológica de este hecho es incierta, pues esta proteinasa requiere para su activación y acción un medio ácido. Por tanto, es difícil que esta enzima juegue un papel importante durante la fertilización. El pH vaginal normal es de 3.5 a 4.3, pero ascenderá en cuestión de segundos con la deposición del semen (7.2 a 7.8). La acción más probable de la proteinasa ácida del plasma seminal es la posible utilización de remanencias de la eyacuación después de efectuada la interacción anteriormente mencionada, esto es, cuando el pH vaginal retorne a sus condiciones iniciales. Si este fuera el caso, la inhibición del gospol interferiría el proceso de "limpieza" por lo que reacciones isoimmunitarias podrían presentarse. (43)

f) Inhibición de la ciclase adenilato.

El adenín monofosfato cíclico (AMP) es el segundo mensajero en importancia involucrado en diversos procesos metabólicos de las células eucarióticas. Niveles intracelulares de AMP cíclico son controlados mediante la actividad de la ciclase adenilato [ATP-pirofosfato liasa (ciclizada), E.C. 4.6.1.1].

El gospol parece ser un inhibidor general de las enzimas participantes en el metabolismo nucleotídico, estas enzimas presentan propiedades estructurales comunes.

La inhibición generada es el resultado de una interacción directa entre el gospol y la subunidad catalítica de la enzima, lo cual se demostró con la enzima purificada extraída del testículo bovino.

La inhibición es competitiva con respecto al ATP, ya que la formación de 2,3 dialdehído-ATP demostró tal hecho, pues esta puede ser irreversible utilizando el reactivo NaCNBH_3 como reductor.

El gopisol parece que penetra a la membrana mitocondrial para inhibir a la enzima citada. El mecanismo químico por el cual se efectúa esta interacción todavía no se ha comprendido, eso sí, la formación de bases de Schiff se excluyen debido a la incapacidad de irreversibilidad de la enzima. Asimismo, las posibles interacciones del gopisol con grupos sulfhidrilo o residuos de arginina son descartadas, ya que ni el ditiotretitol ni el exceso de arginina evitaron que le gopisol inhibiera tal enzima.

La importancia de este hecho estriba en que el gopisol afecta la relación $\text{AMP}_c/\text{GMP}_c$, dicha anomalía puede inhibir: motilidad, respiración y metabolismo del espermatozoide. (1, 24)

g) Inhibición de la ribonucleótido reductasa y su efecto en la síntesis de DNA.

La ribonucleótido reductasa en células de mamíferos está compuesta por dos subunidades diferentes (M_1 y M_2). La actividad de esta enzima aumenta durante la síntesis de DNA. Es posible bloquear la acción inhibitoria del gopisol sobre la ribonucleótido reductasa utilizando una línea celular resistente a la hidroxiaurea, con esto, el incremento de la actividad enzimática fue evidente demostrando así que esta enzima es un blanco intracelular latente para el gopisol.

La importancia de este hecho estriba en que los efectos espermatogénicos del gopisol pueden atribuírsele a la inhibición en la actividad de la ribonucleótido reductasa, la cual es esencial para la duplicación del material genético. (3)

Los efectos citotóxicos del gopisol han sido asociados con la

inhibición irreversible de la síntesis de DNA. Para determinar la causa de dichos efectos en cultivos celulares y aseverar en que fases del ciclo celular¹ la susceptibilidad del gosiol es mayor. Ovarios de hamsters chinos (HeLa) fueron expuestos a diferentes concentraciones de gosiol con intervalos de tiempo variados. La presencia de gosiol ($10 \mu\text{g/ml.}$) en la etapa de crecimiento inicial (G_1) no inhibió la progresión a la fase intermedia (S), pero a partir de esta el efecto inhibitorio del agente se hizo presente, pues la mayoría de las células no fue capaz de completar la duplicación (ciclo mitótico). Este hecho se manifestó cuando la concentración del gosiol celular era elevada, o bien, por exposiciones prolongadas. (22)

h) Efectos citotóxicos diferenciales. Acción antitumoral.

Recientes investigaciones han revelado que el gosiol puede utilizarse como agente antitumoral, ya que este tipo de células son susceptibles a la acción de este compuesto.

La siguiente tabla explica lo anterior.

<u>TIPO DE CELULA</u>	<u>SUSCEPTIBILIDAD AL GOSIOL</u>
Fibroblastos embriónicos pulmonares	10 μM
Adenocarcinoma mamario	10 μM
Eritroleucemia	10 μM
Melanoma (WM56)	10 μM y 5 μM
Carcinoma del colon (SW407)	10 μM y 5 μM
Carcinoma del colon (SK1084)	10 μM y 5 μM
Carcinoma del colon (SK1116)	10 μM y 5 μM
Melanoma (WM9)	5 μM
Melanoma (WM164)	5 μM

1 Según Puclé y Stefen (1963) el ciclo celular se clasificó en base a su morfología en las siguientes fases: G_1 , S y G_2 .

El gosispol parece que actúa a través de un mecanismo que no involucra la inhibición en la síntesis de DNA, puesto que autoradiografías de los cultivos bajo tratamiento durante 24 horas demostraron que con una concentración de $10 \mu\text{M}$ del agente, más del 90 por ciento de las células habían sido destruidas, las pocas sobre vivientes continuaron sintetizando DNA. Por consiguiente, es probable que el gosispol realice su efecto inhibitorio a través de alguna vía metabólica celular.

Estudios preliminares demuestran que las formas catiónicas de la isozima LDH X son las responsables de este efecto, puesto que el gosispol pueden interactuar la producción de lactato a través de la glicólisis anaeróbica, bloqueando así la producción de energía. (20)

Asimismo, los efectos citotóxicos del gosispol puede prevenirse in vivo, debido a la presencia de proteínas plasmáticas, hecho que no ocurre en experimentos in vitro. Pacientes en tratamiento contraceptivo se les detectó gosispol ligado a dichas proteínas, por consiguiente, el complejo formado gosispol-proteína puede detoxificarse más fácilmente del organismo que el agente en forma libre. Este hecho aclara, en parte, el por qué existe una gran diferencia entre las dosis terapéuticas y las tóxicas del gosispol. (8, 29)

Por otra parte, el gosispol ($10 \mu\text{g/ml}$) puede sensibilizar hipertérmicamente a las células ováricas de hamsters chinos (HeLa). Esto es, al exponer tales células a 41°C . y 42°C . se indujo una citotoxicidad significativa. La magnitud de dicha potenciación dependió de: concentración de gosispol, pH del medio de cultivo, concentración de glucosa, duración del tratamiento, etc.

Si el gosispol desacopla la fosforilación oxidativa y glicólisis ocasionará un bloqueo total en la producción de ATP generando así células carentes de energía y, consecuentemente, susceptibles al calor.

La importancia de este hecho estriba en la utilización del gosispol como agente antitumoral in vivo, esto es, generando un microambiente alrededor de las células malignas inducido hipertérmicamente con las condiciones ya mencionadas. (4)

1) Efectos esteroidogénicos.

El gosispol presenta un efecto inhibitorio directo sobre la esteroidogénesis, esto es, con dosis de 10 mg/Kg/día durante una semana (suministrada intravenosamente) varios pasos de la ruta biosintética de la testosterona pueden resultar bloqueados. El gosispol puede inhibir a la enzima ciclasa adenilato, necesaria para la formación del AMP cíclico. Por consiguiente, sin este mensajero la conversión de pregnenolona a testosterona se ve seriamente afectado reduciéndose dramáticamente los niveles plasmáticos de esta hormona. Esta disminución puede explicar, en parte, el efecto antifertilizante del gosispol. (34, 53, 59, 77)

La espermatogénesis depende de los andrógenos testiculares, esto se comprobó con la degeneración de las fases VII y VIII en el ciclo del epitelio seminífero que son, particularmente, andrógeno-dependientes.

Para lograr el efecto anteriormente citado es necesario administrar dosis prolongadas. Ratas tratadas con dosis de 30 mg/Kg/día durante 45 días presentaron niveles plasmáticos bajos en testosterona, 74 ± 12 ng/100 ml., siendo que, normalmente poseen 408 ± 80 ng/100 ml. (41, 48, 51, 62)

Dietas elaboradas con harina de algodón (25, 35 y 50%) generan cambios en la producción testicular de la testosterona. El contenido de intermediarios y precursores en la biosíntesis de esta hormona fueron disminuidos significativamente. Las concentraciones de pregnenolona, primer precursor de la ruta esteroidogénica, y progesterona descendieron el triple y el doble con respecto a concentración normal (21.5 y 19.3 pg/mg. de proteína respectivamente). Otros compuestos que forman parte de la ruta esteroidogénica también se vieron afectados por la acción de la dieta tales como: 17 hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona. Durante el período post-régimen, el grupo tratado con dieta al 35% recobró íntegramente sus niveles normales después de 3 semanas, en cambio, el grupo sujeto con dieta al 50% no los recobraron después de 6 semanas de suspendido el tratamiento.

Esto comprueba que los contenidos testiculares y niveles plasmáticos esteroidales pueden verse afectados por el gospol, dependiendo desde luego de su concentración y tipo de administración. (64, 66)

CONCLUSIONES

El gósipol, componente de la semilla de algodón, es un agente antiespermatogénico efectivo para humanos y algunos animales, pues varía dependiendo de la naturaleza de cada especie. Perros y conejos son muy susceptibles al efecto tóxico pero escasamente a la acción antifertilizante. En cambio, humanos y ratas manifiestan un efecto antifertilizante con dosis ordinarias (20 mg/Kg/día durante 1 mes); su prolongación puede generar aspectos tóxicos de consideración.

El gósipol desacopla la fosforilación oxidativa reduciendo la producción de ATP, específicamente a nivel mitocondrial espermático. El efecto antifertilizante ocasionado por el agente se debe a la interacción e inhibición de la enzima LDH X, esencial en la motilidad espermática. Análogamente, el gósipol inhibe la actividad enzimática de Na-K-ATPasa provocando hipocalemia.

Debido a su elevada reactividad, el gósipol puede interactuar con un sin número de enzimas, proteínas, carbohidratos, etc. presentes en el organismo, algunos de ellos son: acrosina espermática, proacrosina, NAD-isocitrato, deshidrogenasas, pepsina, albúmina, succinil-CoA sintetasa, adenilato ciclasa, entre otras.

Prasad y Diczfaluzi (1983)(1) describieron: "El descubrimiento y demostración del efecto antifertilizante del gósipol marca un importante hallazgo en la investigación de antiespermatogénicos.... Hasta ahora, el gósipol es el único agente utilizado clínicamente en gran escala durante esta década". Estas palabras reflejan apropiadamente el criterio de la mayoría de los investigadores en este campo. Sin embargo, en el aspecto toxicológico es importante ratificar algunos puntos cuestionables de investigación futura:

1. Hipocalemia: examinar los factores que contribuyen a tal efecto, prevenir su manifestación, mecanismo de desarrollo, etc.

2. Irreversibilidad: examinar los factores que contribuyen a tal efecto, grado de detección para la esterilidad inminente, etc.

3. Distribución toxicológica general: efectos en el sistema endócrino, hígado, corazón y riñón; estudios carcinogénicos vitalicios.

4. Estudios sobre el mecanismo(s) de acción. Estos estudios puede ser de utilidad en el desarrollo de compuestos análogos al gossipol, siempre y cuando demuestren efectos antifertilizantes satisfactorios con efectos tóxicos mínimos.

HEMEROGRAFIA

1. Qian, S.Z. and Gang, W.Z.(1984). Gossypol: A Potential Antifertility Agent for Males. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 24: 329 - 360.
2. Sourfir, J.C.; Dantec, M.C.; Jegou, B.; Folliot, R.; Garnier, D.H. and Stelly, N.(1984). Epididymal Effects of Gossypol. Lancet, 2: 107.
3. McClarty, G.A.; Chan, A.K.; Creasey, D.C. and Wright, J.A.(1985). Ribonucleotide Reductase: An Intracellular Target for Male Antifertility Agent, Gossypol. Biochem. Biophys. Res. Commun., 133 (1): 300 - 305.
4. Kim, S.H.; Kim, J.H.; Alfieri, A.A.; He, S.Q. and Young, C.W.(1985). Gossypol, a Hyperthermic Sensitizer of He La Cells. Cancer Res., 45: 6338 - 6340.
5. Abou-Donia, M.B. and Dieckert, J.W.(1975). Metabolic Fate of Gossypol: The Metabolism of ¹⁴C Gossypol in Swine. Toxicol. Appl. Pharmacol., 31: 32 - 46.
6. Finlay, T.H.; Dharmgrongartama, E.D. and Perlmann, G.E.(1973). Mechanism of the Gossypol Inactivation of Pepsinogen J. Biol. Chem., 248 (13): 4827 - 4833.
7. Vander Jagt, D.L.; Dean, V.L.; Wilson, S.P. and Royer, R.E.(1983). Regulation of the Glutathione-S-Transferase Activity of the Bilirubin Transport Protein (Ligandin) from Human Liver. J. Biol. Chem., 258 (9): 5689 - 5694.
8. Haspel, H.C.; Ren, Y.; Watanabe, K.A.; Sonenberg, M. and Corin, R.E.(1984). Cytocidal Effect of Gossypol on Culture Murine Erythroleukemia Cells in Prevented by Serum Protein. J. Pharmacol. Exp. Therap., 229 (4): 218 - 225.

9. Steven, S.L.; Li, L.; Feldmann, R.J.; Okabe, M. and Pan, Y.E.(1983). Molecular Features and Immunological Properties of Lactate Dehydrogenase C₄ Isosymes from Mouse and Rat Testes. J. Biol. Chem., 258 (11): 7017 - 7028.

10. Bressani, R.; Eliás, L.G. and Porras, A.(1969). Effect of pH on the Free and Total Gossypol and Nutritive Value of Cottonseed and Protein Concentrate. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 19: 367 - 379.

11. Pösö, H.; Wichmann, K.; Jänne, J. and Luukkainen, T.(1980). Gossypol, a Powerful Inhibitor of Human Spermatozoal Metabolism. Lancet, 1: 885 - 886.

12. Hong, S.K.; Haspel, H.C.; Sonenberg, M. and Goldinger, J.M.(1983). Effects of Gossypol on PAH Transport in the Rabbit Kidney Slice. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71: 430 - 435.

13. Bressani, R.; Aburto, A.; Gómez-Brenes, R. and Braham, J.E.(1975). Efecto del Gosipol Libre de Diferentes Harinas de Algodón sobre el Crecimiento de Ratas y Niveles de Lisina Libre y Gosipol Libre en Organos, Músculo y Suero de Animales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 25: 47 - 66.

14. Bozek, S.A.; Jensen, D.R. and Tone, J.R.(1981). Scanning Electron Microscopic Study of Spermatozoa from Gossypol-Treated Rats. Cell Tissue Res., 219: 659 - 663.

15. Adams, R.; Geissman, T.A. and Edwards, J.D.(1960). Gossypol, a Pigment of Cottonseed. Chem. Rev., 60 (6): 555 - 571.

16. Myers, B.D. and Thronenberry, G.O.(1966). Effect of Gossypol on Some Oxidative Respiratory Enzymes. Plant Physiol. 41: 787 - 791.

17. Tanksley, T.D.; Neumann, H.; Lyman, C.M.; Pace, C.N. and Prescott, J.M.(1970). Inhibition of Pepsinogen Activation by Gossypol. *J. Biol. Chem.*, 245 (23): 6456 - 6451.

18. Haspel, H.C.; Corin, R.E. and Sonenberg, M.(1982). Gossypol, an Oral Male Contraceptive: Effects on Human Erythrocyte Membrane Functions. *Fed. Proc.*, 41: 671.

19. Abou-Donia, M.B. and Dieckert, J.W.(1974). Gossypol: Uncoupling of Respiratory Chain and Oxidation Phosphorilation. *Life Sciences*, 14: 1955 - 1963.

20. Tuszynski, G.P. and Cossu, G.(1984). Differential Cytotoxic Effect of Gossypol on Human Melanoma, Colon, Carcinoma and Other Tissue Culture Cell Lines. *Cancer Res.*, 44: 768 - 771.

21. Reyes, J.; Allen, J.; Tanpaichitr, N.; Bellvé, A.R. and Benos, D.J.(1984). Molecular Mechanism of Gossypol Action of Lipid Membranes. *J. Biol. Chem.*, 259 (15): 9607 - 9615.

22. Wang, Y. and Rao, P.N.(1984). Effect of Gossypol on DNA Synthesis and Cell Cycle Progression of Mammalian Cells in Vitro. *Cancer Res.*, 44: 35 - 38.

23. Oligati, K. and Toscano, W.A.(1983). Kinets of Gossypol Inhibition of Bovine Lactate Dehydrogenase-X. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115 (5): 180 - 185.

24. Oligati, K.L.; Toscano, D.G.; Atkins, W.M. and Toscano, W.A.(1984). Gossypol Inhibition of Adenylate Cyclase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 231 (2): 411 - 415.

25. Montant, E.E.; Burgos, C.; Gerez de Burgos, N.M.; Rovai, L.E. and Blanco, A.(1982). Inhibitory Action of Gossypol on Enzymes and Growth of *Trypanosoma cruzi*. *Science*, 218: 288 - 289.

26. De Peyster, A. and Wang, Y.Y.(1979). Gossypol: Proposed Contraceptive for Men Passes the Ames Test. The New England J. Med., 301 (5): 275 - 276.

27. Tam, S.-C.(1986). Acute Hypokalemic Effect of Gossypol. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64: 881 - 884.

28. Duckett, K.E.; Schiller, S.L.; Girard, P.R. and Kennedy, J.R.(1986). The Effects of Gossypol on the Ultrastructure and Function of Tracheal Ciliated Cells. J. Submicrosc. Cytol., 18 (1): 117 - 125.

29. Royer, R.E. and Vander Jagt, D.I.(1983). Gossypol Binds to a High-Affinity Binding Site on Human Serum Albumin. FEBS Letters, 157 (1): 28 - 30.

30. Albrecht, J.E.; Clawson, A.J. and Smith, F.H.(1972). Rate of Depletion and Route of Elimination of Intravenously Injected Gossypol in Swine. J. Anim. Sci., 35 (5): 941 - 946.

31. Abou-Donia, M.B. and Lyman, C.M.(1970). Metabolic Fate of Gossypol: The Metabolism of Gossypol ¹⁴C in Laying Hens. Toxicol. Appl. Pharmacol., 17: 160 - 173.

32. Cameron, S.M.; Waller, D.P. and Zaneveld. L.D.J.(1982) Vaginal Spermicidal Activity of Gossypol in the Mecaca arctoides. Fertil. Steril., 37 (2): 273 - 274.

33. Lee, C.-Y. and Malling, H.V.(1981). Selective Inhibition of the Sperm-Specific Lactate Dehydrogenase-X by an Antifertility Agent, Gossypol. Fed. Proc., 40: 718.

34. Lin, T.M.D.; Muroso, E.P.; Osterman, J.; Nankin, H.R. and Coulson, P.B.(1981). Gossypol Inhibits Testicular Steroidogenesis. Fertil. Steril., 35 (5): 563 - 566.

35. Burgos, M.H.; Chin, -Y.C. and Segal, S.J.(1980). Gossypol Inhibits Motility of Arbacia Sperm. Biol. Bull., 159 (2): 467 - 468.
36. Shandilya, L.; Clarkson, T.B.; Adams, M.R. and Lewis, J.C.(1982). Effects of Gossypol on Reproductive and Endocrine Functions of Male Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis). Biol. Reprod., 27: 241 - 252.
37. Morris, I.D.; Higgins, C. and Matlin, S.A.(1986). Inhibition of Testicular LDH X from Laboratory Animals and Man Gossypol and its Isomers. J. Reprod. Fertil., 77: 607 - 612.
38. Tanchaichitr, N.; Chen, L.D. and Bellvé, A.R.(1984). Direct Effect of Gossypol on TR-ST Cells: Perturbation of Rhodamine 123 Accumulation in Mitochondria. Biol. Reprod. 31: 1049 - 1060.
39. Hunt, S. and Mittwoch, V.(1984). Effects of Gossypol in Sperm Count in Two Inbred Strains of Mice. J. Reprod. Fertil., 70: 341 - 345.
40. Majumdar, S.K.; Thatcher, J.D.; Dennis, D.H.; Cutrone, A.; Stockage, M. and Hammond, M.(1982). Mutagenic Evaluation of Two Males Contraceptives 5-Thio-D-Glucose and Gossypol Acetic Acid. J. Hered., 73: 76 - 77.
41. Wang, J.M.; Gu, C.H.; Qian, Z.M. and Jing, G.W.(1984). Effect of Gossypol on Testicular Blood Flow and Testosterone Production in Rats. J. Reprod. Fertil., 71: 127 - 133.
42. Wong, R.C.; Nakagawa, Y. and Perlmann, G.E.(1972). Studies on the Nature of the Inhibition by Gossypol of the Transformation of Pepsinogen to Pepsin. J. Biol. Chem., 247 (5): 1625 - 1631.
43. Vogsorasak, L. and Svasti, J.(1986). Gossypol Prevents Activations of Purified Proenzymes of Human Seminal Plasma Acidic Proteinase. Biochem. Biophys. Acta, 883: 271 - 276.

44. Blanco, A.; Aoki, A.; Montamat, E.E. and Rovai, L.E.(1983). Effect of Gossypol Upon Motility and Ultrastructure of Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 30 (4): 648 - 651.

45. Floridi, A.; Atri, S.D.; Menichini, B.; Marcante, M.L.; Nista, A.; Silvestrini, B.; Caputo, A. and De Martino, C.(1983). The Effect of the Association of Gossypol and Lonidamine on the Energy Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor Cells. Exp. Mol. Pathol., 38: 322 - 335.

46. Lyman, C.M.; Baliga, B.P. and Slay, M.W. (1959). Reactions of Proteins with Gossypol. Arch. Biochem. Biophys., 84: 486 - 497.

47. Killion, D.D.; Grooms, S. and Frans, R.E.(1968). Oxidative and Phosphorylative Activities of the Mitochondria Isolated from Cotton Hypocotyls. Plant Physiol., 43: 1966 - 2000.

48. Ridley, A.J.(1981). Testosterone and Gossypol Effects on Human Sperm Motility. Fertil. Steril., 36 (5): 638 - 642.

49. Hoffer, A.P.(1983). Effects of Gossypol on the Seminiferous Epithelium in the Rat: A Light and Electron Microscope Study. Biol. Reprod., 28: 1007 - 1020.

50. Oko, R. and Hrudka, F.(1982). Segmental Aplasia of the Mitochondrial Sheath and Sequelae Induced by Gossypol in the Rat Spermatozoa. Biol. Reprod. 26: 183 - 195.

51. Oko, R. and Hrudka, F.(1984). Comparison of the Effects of Gossypol, Estradiol-17 and Testosterone Compensation on Male Rat Reproductive Organs. Biol. Reprod., 30: 1198 - 1207.

52. Shi, Q.-X. and Friend, D.S.(1983). Gossypol Induced Inhibition of Guinea Pig Sperm Capacitation in vitro. Biol. Reprod., 29: 1027 - 1032.

53. Chang, C.-C.; Gu, Z. and Tsong, Y.-Y.(1982). Studies on Gossypol. Toxicity, Antifertility and Endocrine Analysis in Male

Rats. Int. J. Fertil., 27 (4): 213 - 218.

54. Ke, Y.-B. and Tso, W.-W.(1982). Variations of Gossypol Susceptibility in Rat Spermatozoa During Spermatogenesis. Int. J. Fertil., 27 (1): 42 - 46.

55. Tone, J.N. and Jensen, D.R.(1976). The Accumulation Pattern of Ingested Gossypol in Selected Organs of the Rat. Experimentia, 32: 369 - 371.

56. Abou-Donia, M.B. and Dieckert, J.W.(1971). Gossypol: Subcellular Localization and Stimulation of the Rat Liver Microsomal Oxidases. Toxicol. Appl. Pharmacol., 18: 507 - 516.

57. Albrecht, J.E.; Clawson, A.J.; Ulberg, L.C. and Smith, F.H.(1968). Effects of High Gossypol Cottonseed Meal on the Electrocardiogram of Swine. J. Anim. Sci., 27: 976 - 980.

58. Jensen, D.R.; Tone, J.N.; Sorensen, R.H. and Bozek, S.A.(1982). Deposition Pattern of the Antifertility Agent, Gossypol in Selected Organs of Male Rats. Toxicology, 24: 65 - 72.

59. Gafvels, M.; Wang, J.; Bergh, A.; Damber, J. and Selstam, G.(1984). Toxic Effect of the Antifertility Agent Gossypol in Male Rats. Toxicology, 32: 325 - 333.

60. Wichmann, R.; Käpyyaho, K.; Sinervirta, R. and Jänne, J.(1983). Effect of Gossypol on the Motility and Metabolism of Human Spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 69: 259 - 264.

61. Stephens, D.T.; Critchlow, L.M. and Hoskins, D.D.(1983). Mechanism of Inhibition by Gossypol of Glycolysis and Motility of Monkey Spermatozoa in vitro. J. Reprod. Fertil., 69: 447 - 452.

62. Gafvels, M.; Bergh, A.; Damber, J.-E.; Selstam, G. and Wang, J.(1981). Testicular Blood Flow and Plasma Testosterone in Rats Treated with Gossypol - a Proposed Antifertility Agent. Acta Physiol. Scand., 112 (2): 6A

63. Sotelo, A.; Montalvo, I.; González-Garza, M.T.; Luz, C.M.(1982). Infertility in Male Rats Induced Diets Containing Whole Cottonseed Flour. *J. Nutr.*, 112: 2052 - 2057.
64. Herrera, J.; Montalvo, I.; González-Garza, M.T.; Sotelo, A.; Gómez, S. and Bermúdez, J.A.(1984). Modifications in the Testis Steroidogenic Pathways in Rats Fed with Cottonseed Flour. *Arch. Androl.*, 12: 53 - 58.
65. González-Garza, M.T.; Montalvo, I.; Mota, L. and Sotelo, A.(1986). Lactic Dehydrogenase Activity in Various Organs of Rats Fed Cottonseed Flour. *Nutr. Res.*, 6: 443 - 449.
66. Herrera, J.; Montalvo, I.; González-Garza, M.T.; Sotelo, A. and Bermúdez, J.A.(1983). Cottonseed Flour Effects on Androgen Testicular Content And Serum Level in Rats. *Arch. Androl.*, 11: 161 - 165.
67. González-Garza, M.T.; Montalvo, I. and Sotelo, A.(1985). Cytotoxic Effects of Gossypol and Vitamin E on Human and Rat Lymphocytes and Spermatozoa. *Nutr. Reprod. Int.*, 32 (3): 559 - 564.
68. Chang, M.C.; Zhipping, G. and Saksena, S.K.(1980). Effects of Gossypol on the Fertility of Male Rats, Hamsters and Rabbits. *Contraception*, 21 (5): 461 - 469.
69. Coulson, P.B., Snell, R.L. and Parise, C.(1980). Short Term Metabolic Effects of the Antifertility Agent, Gossypol, on Various Reproductive Organs of Male Mice. *Int. J. Androl.*, 3: 507 - 518.
70. Kalla, N.R. and Vasudev, M.(1981). Studies on the Male Antifertility Agent-Gossypol Acetic Acid. Effect of Gossypol Acetic Acid on the Motility and ATPase Activity of Human Spermatozoa. *Andrologia*, 13: 95 - 98.

71. Maugh, T.M.(1981). Male "Pill" Blocks Sperm Enzyme. Science, 212: 314.
72. Waller, D.R.; Fong, H.H.S.; Cordell, G.A. and Soejarto, D.D.(1981). Antifertility Effects of Gossypol and its Impurities on Male Hamsters. Contraception, 23 (6): 653 - 660.
73. Kalla, N.R. and Wei, F.T.(1981). Effect of Gossypol Acetic Acid on Respiratory Enzymes in vitro. IRCS Med. Sci., 9: 792.
74. Tso, W.-W. and Lee, C.-S.(1982). Potassium Leakage: Not the Cause of Gossypol Induced Antimotility in Spermatozoa. Int. J. Androl., 5: 317 - 324.
75. Tso, W.-W. and Lee, C.-S.(1982). Cottonseed Oil as a Vaginal Contraceptive. Arch. Androl., 8: 11 - 14.
76. Weinbauer, G.F.; Rován, E. and Erick, J.(1982). Antifertility Efficacy of Gossypol Acetic Acid in Male Rats. Andrologia, 14 (3): 270 - 275.
77. Saksena, S.H. and Salmonsén, R.A.(1982). Antifertility Effects of Gossypol in Male Hamsters. Fertil. Steril., 37 (5): 686 - 690.
78. Saksena, S.K.; Salmonsén, R.; Lau, I.F. and Chang, M.C.(1981). Gossypol: Its Toxicological and Endocrinological Effects in Male Rabbits. Contraception, 24 (2): 203 - 214.
79. Tso, W.-W. and Lee, C.-S.(1982). Gossypol: An Effective Acrosome Blocker. Arch. Androl., 8: 143 - 147.
80. Tso, W.-W.; Lee, C.-S. and Tso, M.-Y.W.(1982). Effect of Gossypol on Boar Spermatozoal Adenosine Triphosphate Metabolism. Arch. Androl., 9: 319 - 331.
81. Dechary, J.M. and Pradel, P.(1971). The Occurrence of (+) Gossypol in Gossypium Species. J. Am. Oil Chem. Soc., 48 (10): 563 - 564.

82. King, T.J. and de Silva, L.B.(1968). Optically Active Gossypol from Thespesia populnea. Tetrahedron Letters, 3: 261 - 263.

83. Bressani, R.; Elíaz, L.G.; Jarquín, R. and Braham, E.(1964). All-Vegetable Protein Mixtures for Human Feeding XIII. Effect of Cooking Mixtures Containing Cottonseed Flour on Free Gossypol Content. Food Technology, 18 (10): 95 - 99.

84. Jarquín, R.; Bressani, R.; Elíaz, L.G.; Tejeda, C.; González, M. and Braham, J.E. (1966). Effect of Cooking and calcium and Iron Supplementation on Gossypol Toxicity in Swine. J. Agr. Food Chem., 14 (3): 275 - 279.