

EDUARDO SIQUEIRA FERNANDES

EMBRIOGÊNESE INICIAL EM RATAS WISTAR TRATADAS COM EXTRATO DE
GINKGO BILOBA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Maria Peters

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Martha de Oliveira Guerra

Juiz de Fora
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernandes, Eduardo Siqueira.

Embriogênese inicial em ratas Wistar tratadas com extrato de Ginkgo biloba / Eduardo Siqueira Fernandes. – 2009.

110 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Desenvolvimento embrionário. I. Título.

CDU 591.3

EDUARDO SIQUEIRA FERNANDES

**EMBRIOGÊNESE INICIAL EM RATAS WISTAR TRATADAS COM EXTRATO DE
*GINKGO BILOBA***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde.

Aprovada em: 13 de agosto de 2009

Banca examinadora:

Dra. Vera Maria Peters (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Ivone Antônia de Souza

Universidade Federal de Pernambuco

Dr Dimas Augusto Carvalho de Araújo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Martha de Oliveira Guerra

Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, Licínio e Goretti,
e aos meus irmãos, Edvar, Edirlei e Erivelton,
por sonharem comigo o sonho de ser médico
e, agora, mestre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

À Prof^a Dra Vera Maria Peters, “mãe” e amiga nessa caminhada de tantos anos. Pelo acolhimento, puxões de orelha e conselhos. À *professora*, por ter sido mais do que uma mestra na minha jornada na Universidade; por ter sido uma guia na minha vida.

À Prof^a Dra Martha de Oliveira Guerra pela amizade e ensinamentos científicos em minha formação. Pelas discussões literárias e cinematográficas, pelas conversas no café, pelas pizzas e por não me deixar seguir por caminhos que envolviam eventos que, como ela mesma dizia, seriam tão “imponderáveis como a imortalidade da alma e os sexos dos anjos”. Por ter me feito adquirir o gosto pela pesquisa e por ter me acolhido como pupilo e confiado em meus passos.

Ao amigo Rafael, pedra fundamental para a concretização desse projeto. Pelos momentos de dúvidas compartilhadas e certezas estabelecidas. Agradeço por todo incentivo, ajuda, parceria e anos de amizade sincera. Sem ele, esse projeto não teria iniciado.

Ao Centro de Biologia da Reprodução / Universidade Federal de Juiz de Fora pela estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos conquistados no Centro de Biologia da Reprodução: Paulinho, Evelise, Nathália, Graça, Roberto, Lúcia, Ana Paula Lazzari, Pedro e Flávia. Agradeço a força, amizade e auxílio no experimento.

Aos muitos estagiários do Centro de Biologia da Reprodução, em especial ao João Gabriel, Tatianne e Thaila, por confiarem em mim e permitir que eu transmitisse algo a eles. Espero que possamos estar juntos em muitos outros projetos.

Aos funcionários do CBR pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. À REDE Mineira de Bioterismo e à REDE Mineira de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Terapêuticos – FAPEMIG, que propiciaram através de financiamento a realização deste trabalho.

À minha prima e “irmã” Rafaela, pelas orações, palavras amigas e momentos compartilhados.

À minha cunhada Larissa, a quem tenho como irmã, pela força e apoio.

Ao grande amigo Tiago Timponi Torrent, pelas horas ao telefone, esclarecendo dúvidas, jogando conversa fora e pelo auxílio nas versões para o inglês dessa dissertação.

Aos amigos Jonas e Saulo que, mesmo distantes, contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

Ao amigo Adolfo, pelo companheirismo e amizade formados nesses dois anos de curso.

Ao Antonio Phelipe, pelo carinho e força na reta final deste trabalho.

Aos colegas do curso de Pós-graduação pelo auxílio nesse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Juiz de Fora, em nome da Prof^a Darcília Maria Nagen da Costa, pela ajuda, disponibilidade e apoio.

A todos os meus familiares que sempre torceram por mim.

RESUMO

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é usado no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas, como antiinflamatório, no tratamento da vertigem, na perda de memória relacionada a idade. Efeitos do extrato de ginkgo na reprodução demonstraram que ele inibia a fertilização por reduzir a viabilidade de espermatozóides e degenerar o oócito. Administrado a camundongos alterou o peso de órgãos como a próstata e alterou o perfil reprodutivo desses animais – levando a uma menor taxa de prenhez e aumento das mortes embrionárias. Em ratas, o EGb demonstrou causar crescimento intra-uterino restrito, aventando-se a possibilidade do efeito ter sido causado por sua atividade estrogênica. Outros trabalhos também demonstraram efeito estrogênico do *Ginkgo biloba*. Sabe-se que os níveis adequados de estrogênio, progesterona e de prostaglandinas são cruciais para o transporte do conceito pela tuba uterina e sua implantação uterina, portanto existe a possibilidade da administração do EGb no início da prenhez causar alterações no desenvolvimento embrionário, sendo esse o propósito do presente trabalho. Para o estudo foram usadas 68 ratas Wistar, adultas, nulíparas, prenhes, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora. As ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=17): Controle e tratados Gb 3.5, Gb 7 e Gb 14, que receberam, respectivamente, 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia do extrato de *Ginkgo biloba* em 1mL de suspensão aquosa, via intragástrica, uma vez ao dia, durante os oito primeiros dias de prenhez. As ratas do grupo controle receberam pelo mesmo esquema 1mL de água destilada. As ratas foram eutanasiadas, no 15^o dia de prenhez, por exsanguinação total sob anestesia. Foram avaliados: sinais clínicos indicativos de toxicidade materna – entre outros, alteração do consumo de ração e de água, alteração do peso corporal, hiper ou hipoatividade, piloereção, estereotipia, perfil bioquímico e hematológico e morte –; número de corpos lúteos; peso de órgãos maternos (ovários, fígado e rins); perfil hematológico e bioquímico maternos; peso de fetos e de placentas; número de fetos viáveis, reabsorvidos e mortos; malformações fetais em membros superiores e inferiores, fechamento de tubo neural e morfologia de face. Com exceção do perfil bioquímico materno em que houve aumento do nível de colesterol e decréscimo dos níveis de ALT, uréia e creatinina, significativamente relevantes, nos animais tratados com 7 e 14mg/Kg/dia de EGb, nenhuma outra alteração significativa foi encontrada

nos parâmetros maternos ou fetais avaliados. De forma geral, o tratamento com EGb em ratas Wistar, durante o período de trânsito tubário e implantação, não causou efeito tóxico no organismo materno, tampouco induziu mortes, crescimento intra-uterino retardado ou malformações fetais. Há ainda indícios de que o EGb poderia agir de forma hepatoprotetora e nefroprotetora quando administrado a ratas Wistar durante o período de prenhez quando usado nas doses 7 e 14 mg/Kg/dia.

Palavras-chave: *Ginkgo biloba*. Embriogênese. Implantação. Ratos. Gestação. Desenvolvimento. Hematologia. Bioquímica. Fitoterápicos.

ABSTRACT

The *Ginkgo biloba* extract (EGb) is mainly used in the treatment for and in the prevention of neurodegenerative diseases. It is also used in the treatment for dizziness, age-related memory loss and as an anti-inflammatory. Effects of EGb on reproduction include fertilization inhibition through the reduction of spermatozoa viability and oocyte degeneration. When administered to male mice, EGb led to alterations in the weight of organs such as the prostate, and in the reproductive behavior of these animals (leading to lower pregnancy rates and embryo death increase). In female rats, EGb was proved to cause intra-uterine growth retardation, this effect being thought to be related to its estrogenic activity. Other studies have also shown EGb estrogenic effects. Adequate levels of estrogen, progesterone and prostaglandins are known to be very important to tubal transit and uterine implantation. Hence, there is the possibility of EGb causing embryonic development alterations when administered in the beginning of pregnancy. Investigating this possibility is the aim of this thesis. In order to achieve that, the following experimental protocol was carried out with 68 nulliparous pregnant Wistar rats. The rats were randomly distributed into four experimental groups (n=17): Control, Gb 3.5, Gb 7 and Gb 14, which were treated, respectively, with zero, 3.5, 7.0 and 14.0mg/Kg/Day of EGb diluted in 1mL of distilled water through gavage, once a day, during the first eight days of pregnancy. Rats were euthanized in the 15th day of pregnancy, through total exsanguination under anesthesia. The following parameters were assessed: clinical signs of maternal toxicity – such as feed and water intake alterations, body weight alterations, hyper or hypoactivity, piloerection, stereotypy, biochemical and hematological profile and death –; number of corpora lutea; maternal organs (ovaries, liver and kidneys) weight; maternal hematological and biochemical profiles; fetuses and placentas weight; number of viable, resorpted and dead fetuses; fetal malformations in both superior and inferior members, neural tube closure and facial morphology. Amongst the parameters evaluated, alterations were found only in the maternal hematological profile. There was significant raise in the cholesterol level and reduction in the levels of ALT, urea and creatinine for the animals treated with 7 and 14mg/Kg/day of EGb. No significant alteration was found for other maternal and fetal parameters evaluated. Hence, it seems that treatment with EGb during both

tubal transit and implantation periods did not cause toxic effects to the maternal organism of Wistar rats. Neither did it induce deaths, intra-uterine growth retardation or fetal malformation. There is also evidence that EGb could present hepatoprotective and nephroprotective effects when administered to Wistar rats during pregnancy in the dosages of 7 and 14 mg/Kg/day.

Keywords: *Ginkgo biloba*. Embriogenesis. Implantation. Rats. Pregnant. Development. Haematology. Biochemistry. Herbal medicines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Toxicologia Reprodutiva e Estudos Pré-clínicos.....	15
2.2 Teratogenicidade	18
2.3 Embriogênese inicial.....	19
2.4 Ginkgo biloba.....	20
2.4.1 Etnobotânica.....	20
2.4.2 Composição Química.....	23
2.4.3 Ação farmacológica e indicações clínicas.....	25
2.4.4 Efeitos adversos	27
2.4.5 Efeitos no processo reprodutivo	27
3 HIPÓTESE.....	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos.....	34
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1 Modelo experimental.....	35
5.2 Substância teste	35
5.3 Grupos experimentais.....	36
5.4 Protocolo experimental.....	37
5.5 Processamento estatístico dos dados	39
6 RESULTADOS	40
6.1 Artigo submetido para publicação.....	40
6.2 Artigo em fase final de elaboração	42
7 COMENTÁRIOS.....	43

8 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES.....	54

INTRODUÇÃO

Estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva consistem em ensaios realizados em animais, com o intuito de investigar a ação de um novo fármaco ou substância química e seus efeitos adversos sobre as etapas do processo reprodutivo de mamíferos. Os testes reprodutivos foram padronizados através da ICH – *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* – e compreendem estudos desde a concepção à maturação sexual, incluindo o desenvolvimento embrionário, o parto e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes (ICH, 2005).

O extrato de *Ginkgo biloba* é um dos fitoterápicos mais usados atualmente (TESCH, 2003), devido a suas inúmeras atividades farmacológicas com atuação no sistema nervoso central (RAMASSAMY; LONGPRE e CHRISTEN, 2007), já definidas tanto experimental como clinicamente. Além de atuar no sistema nervoso, o extrato do *G. biloba* possui ação antiinflamatória (MCKENNA; JONES e HUGHES, 2001), na deficiência do fluxo sanguíneo ocular e cerebral, na insuficiência vascular periférica (SMITH e LUO, 2004) e em distúrbios vestibulares (PATTERSON e BALOUGH, 2006). Essas ações parecem ser efeitos diretos dos constituintes do extrato de *G. biloba*. O extrato é composto de terpenos, lactonas e flavonóides, glicosilados ou não (SEGURA; DELGADO e TORRES, 2000). Ginkgolídeos A, B e C (XIE, DING, GE *et al.*, 2008) e flavonóides, como a quercetina e o kaempferol (JACOBS e BROWNER, 2000), são os constituintes mais presentes e aqueles que possuem maiores efeitos farmacológicos. Atribui-se, dentre várias ações, efeito estrogênico dos constituintes deste extrato (OH e CHUNG, 2004). Porém, estudos

recentes comprovaram ser o efeito do extrato de *Ginkgo biloba*, como um todo, superior aos efeitos separados de suas frações.

Há sugestões de que o extrato de *Ginkgo biloba* poderia ser utilizado no tratamento da impotência sexual (ASHTON, AHRENS, GUPTA *et al.*, 2000) – assumindo efeito relaxante sobre a musculatura lisa vascular do corpo cavernoso de humanos (PAICK e LEE, 1996) – e de que seus constituintes inibiriam o processo de fertilização, induziriam apoptose em células-tronco embrionárias e retardariam a implantação e o desenvolvimento embrionário (CHAN, 2005; 2006).

Mesmo não havendo dados que sugiram um efeito tóxico sobre o organismo materno, o extrato de *Ginkgo biloba* é sempre indicado com cautela em casos de gestantes e lactantes (DUGOUA, MILLS, PERRI *et al.*, 2006). Já foram observados, por exemplo, casos de crescimento intra-uterino restrito em fetos de ratas tratadas com o extrato (PINTO, FERNANDES, REIS *et al.*, 2007).

Com o aumento da procura por fitoterápicos na prevenção ou tratamento de doenças, a segurança desses produtos necessita ser estudada, inclusive quanto à toxicologia do desenvolvimento. Dada à comprovada ação estrogênica do extrato, a possibilidade de influenciar o trânsito tubário e a implantação do blastocisto e a escassez de estudos realizados *in vivo* para avaliar o efeito do extrato no início da gestação, este trabalho foi planejado para avaliar se tais efeitos ocorrem ao se administrar o extrato de *Ginkgo biloba* a ratas Wistar durante as fases de transporte tubário e implantação.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Toxicologia Reprodutiva e Estudos Pré-clínicos

A preocupação com os efeitos tóxicos de diferentes agentes sobre a reprodução, sobre o desenvolvimento embriofetal e sobre o recém-nascido, além da especificidade das metodologias usadas para estudar tais efeitos acabou levando ao surgimento de uma nova ciência – a toxicologia reprodutiva –, que passou a integrar os estudos complementares dos efeitos tóxicos de diversos agentes.

Os estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva consistem em testes realizados em animais com o objetivo de verificar o potencial de um novo produto ou substância química em provocar efeitos adversos sobre as etapas do processo reprodutivo: fertilidade, acasalamento, desenvolvimento embriofetal, parto e desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade reprodutiva (ICH, 2001; PINTO, 2005). Testes em que animais são tratados durante estágios definidos da reprodução refletem com certa segurança os efeitos da exposição de produtos medicinais ao homem e permitem uma maior identificação dos estágios do desenvolvimento reprodutivo sujeitos a riscos.

O objetivo dos estudos de toxicidade reprodutiva é revelar se uma ou mais substâncias ativas de determinado produto é capaz de agir na reprodução de mamíferos. Para isso, a investigação e a interpretação dos resultados dos estudos devem ser relatadas em todos os aspectos farmacológicos e toxicológicos das substâncias-teste e, assim, determinar se o potencial risco reprodutivo em humanos é maior, menor ou igual àqueles encontrados em outras manifestações toxicológicas. Não existe um caso registrado de malformação embrionária em

humanos cujo agente também não cause alteração em algum animal de laboratório, portanto é legal, legítimo e ético o estudo prévio nesses animais (HOLSON, NEMEC, STUMP *et al.*, 2006).

Os testes reprodutivos foram padronizados através de um projeto internacional – ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) – que incluía países da União Européia, Japão e Estados Unidos. A proposta do ICH é fazer recomendações de modo a alcançar a padronização na interpretação e na aplicação de *guidelines* técnicos utilizados na pesquisa e indústria visando reduzir a necessidade de duplicar os testes realizados no desenvolvimento de novos fármacos. Visa, desta forma, uma maior economia de materiais e recursos humanos e animais, além de agilizar o desenvolvimento e a avaliação de novos medicamentos, obedecendo às obrigações impostas dos órgãos de proteção de saúde pública.

Os protocolos que tratam de estudos de toxicologia reprodutiva são chamados de *guidelines* de segurança (*Safety Topics*), que são aqueles que provem metodologias relacionadas a estudos clínicos e pré-clínicos, *in vitro* ou *in vivo*, de carcinogenicidade, genotoxicidade e outros. Especificamente, o protocolo que guia o estudo de toxicologia reprodutiva (S5[R2] - *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility*) subdivide os testes reprodutivos de acordo com estágio do desenvolvimento, alcançando fases pré-acasalamento à maturidade sexual (ICH, 2005).

O ICH subdivide as fases do desenvolvimento a serem testadas nos seguintes estágios:

- A. *Maturação sexual à concepção.*** Avaliam-se as funções reprodutivas de machos e fêmeas adultas, o desenvolvimento e maturação de gametas, o comportamento sexual e o processo de fertilização.
- B. *Concepção à implantação.*** São estudados as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento pré-implantação e o período de implantação propriamente dito.
- C. *Implantação ao fechamento do palato duro.*** As funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento embrionário e a formação dos órgãos principais são alvos de estudos nesse estágio.
- D. *Fechamento do palato duro ao final da gestação.*** Avaliam-se aqui as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento e crescimento fetal e o desenvolvimento e o crescimento dos órgãos fetais.
- E. *Nascimento ao desmame.*** Alvo de estudo: função reprodutora de fêmeas adultas, adaptação neonatal à vida extra-uterina, desenvolvimento pré-desmame e crescimento.
- F. *Desmame à maturidade sexual.*** Investigam-se as ações toxicológicas dos produtos durante o desenvolvimento e crescimento pós-desmame, adaptação das crias à vida independente até atingir a maturidade sexual.

Embora essas subdivisões não sejam mandatórias, procura-se segui-las como forma de uniformização de estudos pré-clínicos. Agências regulatórias de saúde e indústria têm nesses *guidelines* protocolos específicos de conformidade internacional, necessários para se evitar o desperdício de materiais e recursos humanos e animais no desenvolvimento e avaliação de novos medicamentos em escala global. O presente trabalho objetivou o estudo de um fitofármaco – extrato de

Ginkgo biloba –, utilizando parte do protocolo do ICH para estudos compreendidos entre a fertilização e a implantação.

2. Teratogenicidade

Teratologia (Gr. *teratos*, monstro) é a divisão da embriologia e da patologia que trata do desenvolvimento anormal (MOORE e PERSAUD, 2004). Embora os embriões de mamíferos estejam bem protegidos no útero, agentes ambientais – teratogênicos – podem causar perturbações no desenvolvimento após a exposição da mãe a eles (GARCIA; JECKEL NETO e FERNANDÉZ, 1991; DUDEK e FIX, 1998; MOORE e PERSAUD, 2004).

O nível de ação de um teratogêno está ancorado em três princípios (MOORE e PERSAUD, 2004):

- período crítico do desenvolvimento;
- dosagem da droga ou do composto químico;
- constituição gênica do embrião.

Durante a fertilização, clivagem e implantação do embrião, teratogênicos ou possuem efeito letal sobre o embrião ou o embrião inicial compensa esse efeito através de propriedades reguladoras – como a totipotencialidade de suas células –; eventualmente, aberrações cromossômicas podem ser induzidas e o embrião prosseguir seu desenvolvimento, evidenciando alterações ao nascimento ou na vida adulta (BROCAS, RIVERA, PAULA-LOPES *et al.*, 1997). Há também uma relação dose-resposta do teratogêno necessária para desencadear tais efeitos, *i.e.*, quanto maior a exposição durante a gestação, mais grave será o efeito do teratogêno (MOORE e PERSAUD, 2004).

3. Embriogênese inicial

O desenvolvimento embrionário inicia-se na fertilização, quando os pró-núcleos masculino e feminino se unem para formar o zigoto (MOORE e PERSAUD, 2004). Uma complexa e coordenada sequência de eventos ocorre para realização da fertilização: atração dos gametas masculinos pelo feminino; reconhecimento da zona pelúcida pelo espermatozóide; reação acrossômica; travessia da zona pelúcida; fusão das membranas dos gametas; inibição da poliespermia, e ativação do ovo (TALANSKY, 1992) – iniciada com o contato entre um espermatozóide e um oócito.

O contato entre o espermatozóide e o oócito ocorre normalmente no terço distal da tuba uterina e à medida que o zigoto passa ao longo da tuba em direção ao útero, sofre sucessivas divisões mitóticas originando os blastômeros. Em humanos, três a quatro dias após a fertilização, aproximadamente 12 a 14 blastômeros, dão origem à mórula (TALANSKY, 1992; MOORE e PERSAUD, 2004). Este processo acontece nos primeiros sete dias em humanos e nos primeiros quatro a cinco dias em ratos (CARSON e NAFTOLIN, 1982; GUERRA e PETERS, 1999; MOORE e PERSAUD, 2004; DUMM, 2006).

Na mórula, os blastômeros começam a secretar fluido e aos 64 blastômeros, estabelece-se o início de uma cavidade, chamada de blastocele, identificando-se aí a fase de blastocisto inicial (DUMM, 2006). Esta mudança coincide com a entrada do blastocisto, na cavidade uterina (CARSON e NAFTOLIN, 1982). O blastocisto consiste em:

- embrioblasto que dará origem ao embrião e a alguns tecidos extra-embrionários;

- cavidade blastocística ou blastocele, formada pelo espaço preenchido por fluido no embrião que formará estruturas extra-embrionárias e a parte embrionária da placenta;

- trofoblasto formado pela delgada camada celular externa que envolve o embrioblasto.

O processo de implantação inicia-se quatro a cinco dias após a fertilização; a zona pelúcida desaparece e o trofoblasto adjacente ao embrioblasto adere ao epitélio endometrial. O blastocisto humano está superficialmente implantado no endométrio ao final da primeira semana. A implantação do blastocisto completa-se durante a segunda semana de desenvolvimento e, à medida que ocorre, provoca mudanças morfológicas importantes como a formação, no embrioblasto, do disco bilaminar – epi e hipoblasto – e de estruturas extra-embrionárias: cavidade amniótica, âmnio, saco vitelino, pedículo do embrião e saco coriônico. O embrião humano está completamente implantado ao final da segunda semana de desenvolvimento (DUDEK e FIX, 1998; MOORE e PERSAUD, 2004); em ratos, o embrião estará totalmente implantado por volta do sétimo ao oitavo dia (ACOSTA, 1994).

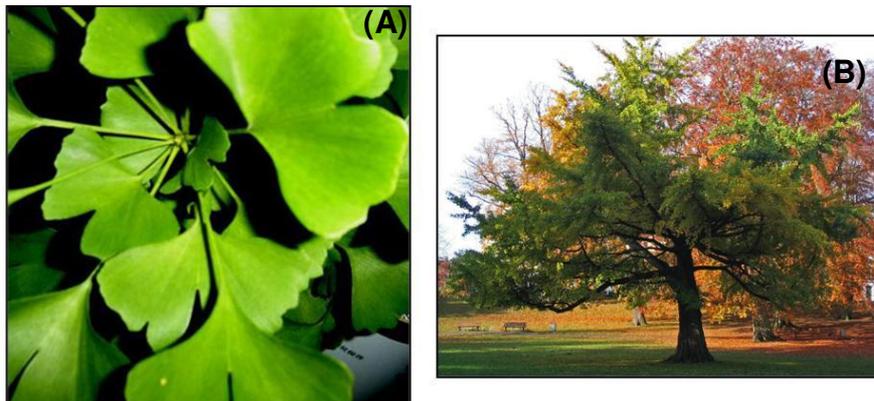
4. *Ginkgo biloba*

4.1 Etnobotânica

Ginkgo biloba L. (*Ginkgo biloba* Linneo, 1771) é uma árvore originária da China, também conhecida como Nogueira-do-Japão, árvore de Kew ou de Maidenhair (FETROW e AVILA, 2000). A árvore de *Ginkgo biloba*, antes denominada de

Salisburia adiantifolia (RAVEN; EVERT e EICHHORN, 2001), é a única espécie representante do filo Ginkgophyta, da família Ginkgoaceae (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992). O termo Ginkgo foi primeiramente utilizado pelo médico e botânico Engelbert Kaempfer em 1712, mas foi Linnaeus que denominou a planta de *Ginkgo biloba* em 1771 (NAKANISHI, 2005).

A árvore do ginkgo tem casca de cor acinzentada, pode alcançar mais de 30 metros de altura e chegar a medir mais de 7 metros de circunferência (FETROW e AVILA, 2000; TESKE e TRENTINI, 2001). É facilmente reconhecida pelas folhas (FOTOGRAFIA 1), com dois únicos lóbulos (BILIA, 2002), em forma de leque, com padrões de venação abertos e dicótomos (RAVEN *et al.*, 2001).



Fotografia 1. Folhas (A) e árvore (B) do *Ginkgo biloba*. Fonte: (A) <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ginkgo-Blaetter.jpg>; (B) http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ginkgo_biloba_1.jpg. Acesso em 01/08/2009.

O ginkgo é uma das espécies de árvores mais antigas do mundo (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992; TESKE e TRENTINI, 2001), datando do período Paleozóico, há mais de 225 milhões de anos (ZHOU e ZHENG, 2003). Considerada por muitos botânicos um fóssil vivo (FETROW e AVILA, 2000; JACOBS e BROWNER, 2000; ZHOU e ZHENG, 2003), pode viver de dois a 4000 anos. Este fato deve-se

principalmente à sua grande resistência genética, sendo capaz de resistir a doenças e adaptar-se à precárias condições ambientais, como a poluição moderna (JACOBS e BROWNER, 2000; TESKE e TRENTINI, 2001), razão pela qual tem sido plantada em grandes centros urbanos, como Nova Iorque e Tóquio (JACOBS e BROWNER, 2000).

O *Ginkgo biloba* tem sido utilizado na culinária e na terapêutica oriental por milênios, sendo citado na tradicional farmacopéia chinesa (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992). As sementes da árvore do ginkgo são especiarias gastronômicas, que quando assadas ou cozidas, integram pratos tradicionais da culinária chinesa, como o *chawan-mushi* e o *nabe-ryori* (BILIA, 2002). Chás de partes da árvore eram usados pelos chineses para o tratamento da asma e bronquite (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992; WHO, 1999), diarreia, sardas e manchas na pele (BILIA, 2002), micose interdigital, cefaléia, náuseas, edemas traumáticos e perda de memória em idosos (SEGURA; DELGADO e TORRES, 2000). As sementes do ginkgo eram consideradas digestivas (BILIA, 2002) e, portanto, utilizadas no tratamento de transtornos gástricos provocados pelo álcool (SEGURA *et al.*, 2000).

Os chineses ainda mantêm a tradição milenar de preparar chás e usá-los para o tratamento da asma e bronquite (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992; NASSIS, KAPPAZ, GOLDENSTEIN *et al.*, 2001; BILIA, 2002) e, atualmente, o uso da planta já foi difundido para outras regiões além da Ásia, sendo utilizado popularmente com vermífugo, indutor do parto e na rinite crônica (WHO, 1999). Outras formas de utilização popular do ginkgo incluem: tratamento de varizes e de úlceras varicosas, adinamia, tonteiras, dificuldade de concentração (WHO, 1999), tratamento da tosse, enurese e leucorréia (BILIA, 2002). Também é utilizado como fitocosmético (TESKE

e TRENTINI, 2001) e para promover a agilidade mental e melhorar a função cerebral (FETROW e AVILA, 2000).

4.2 Composição Química

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) constitui-se de uma mistura padronizada de compostos polares e não-polares (FETROW e AVILA, 2000). As formulações comerciais, preparadas a partir de folhas verdes desidratadas (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992; BILIA, 2002; BLUMENTHAL; BRINCKMANN e WOLLSCHLAEGER, 2003), são extraídas através de uma mistura de acetona e água, na razão de 35-67:1 de concentração da droga/extrato (BILIA, 2002). O processo de extração concentra os componentes ativos e restringe os alquilfenóis, presentes na formas de ácidos ginkgólicos e potencialmente tóxicos (JACOBS e BROWNER, 2000; BARON-RUPPERT e LUEPKE, 2001; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003), a uma concentração de cinco partes por milhão (ppm) – isenta de qualquer ação alergênica, citotóxica, mutagênica ou neurotóxica sobre o organismo humano (BARON-RUPPERT e LUEPKE, 2001; VAN BEEK, 2002; SMITH e LUO, 2004). Em sua constituição final, o EGb possui 22 a 27 % de glicoflavonóides, 5 a 7 % de terpenas lactonas e menos do que 5 ppm de ácido ginkgólico. O produto final é comercializado com o nome de EGb 761, sob a forma de comprimidos ou cápsulas (FETROW e AVILA, 2000).

O extrato contém, portanto, diversos glicosídeos flavonólicos e flavônicos, lactenas diterpênicas – ginkgentina, ácido ginkgólico e isoginkgentina – (FETROW e AVILA, 2000; NASSIS, KAPPAZ, GOLDENSTEIN *et al.*, 2001; TESKE e TRENTINI, 2001), derivados dessas lactenas, denominados ginkgolídeos – dentre os de maior

concentração estão os ginkgolídeos A, B, C (FIGURA 2), J e M – e um bilobalídeo – lactona sesquiterpênica. Os principais flavonóides presentes são derivados do kaempferol e da quercetina (PAICK e LEE, 1996; JACOBS e BROWNER, 2000; MCKENNA; JONES e HUGHES, 2001; DUGOUA, MILLS, PERRI *et al.*, 2006), sendo também encontrados a rutina, a isorramentina e a proantocianidina. Outros compostos isolados incluem: ácido ascórbico, catequina, superóxido-dismutase a base de ferro, ácido p-hidróxicinurênico, ácido protocatéquico, ácido chiquímico e os esteróis sitosterol e ácido vanílico (FETROW e AVILA, 2000).

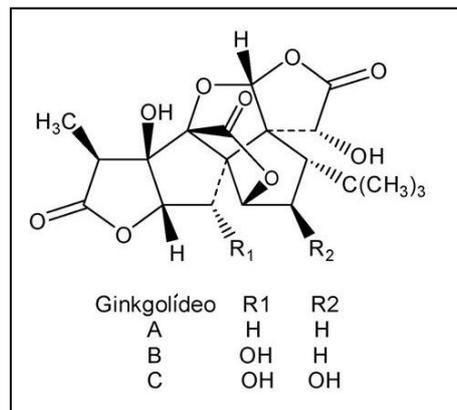


Figura 2. Estrutura dos ginkgolídeos A, B e C. Fonte: Adaptado de XIE, DING, GE *et al.*, 2008.

O extrato de *Ginkgo biloba* é bem absorvido, não sendo prejudicado com o consumo concomitante de alimentos (FOURTILLAN, BRISSON, GIRAULT *et al.*, 1995), e é extensivamente metabolizado pelo fígado (CHEN, LIANG, XIE *et al.*, 2007). Ginkgolídeos A e B e o bilobalídeo possuem alta biodisponibilidade quando o EGb é ingerido oralmente, tendo, no entanto, meias-vidas diferentes – aproximadamente 4,5, 10,5 e 3 horas, respectivamente (FOURTILLAN, BRISSON, GIRAULT *et al.*, 1995). Nenhum flavonóide foi encontrado intacto no sangue, nas fezes ou na urina de ratos; porém, foram encontrados metabólitos destes

flavonóides (PIETTA, GARDANA, MAURI *et al.*, 1995; CHEN, LIANG, XIE *et al.*, 2007). Também foi identificada a excreção de menos de 30 % dos mesmos metabólitos na urina humana, após um intervalo de 48h da ingestão dos flavonóides do EGb (PIETTA; GARDANA e MAURI, 1997).

4.3 Ação farmacológica e indicações clínicas

Dentre as ações farmacológicas do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb), descritas em extensas revisões (DIAMOND, SHIFLETT, FEIWEL *et al.*, 2000; MCKENNA; JONES e HUGHES, 2001; NASSIS, KAPPAZ, GOLDENSTEIN *et al.*, 2001; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003; SMITH e LUO, 2004; BALTASI, 2007), o destaque fica para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Segundo estudos que comprovam essa ação, o EGb possuiria efeito neuroprotetor (IZZO e CAPASSO, 2007), ao atenuar o processo de apoptose induzida pela mitocôndria neuronal lesada, além de inibir nesta, a agregação de beta-amilóides (LUO, SMITH, PARAMASIVAM *et al.*, 2002; LONGPRE, GARNEAU, CHRISTEN *et al.*, 2006; LUO, 2006; WU, WU, BUTKO *et al.*, 2006; RAMASSAMY; LONGPRE e CHRISTEN, 2007; SMITH; CAPPAL e BARNHAM, 2007).

Também possuindo ação anti-inflamatória, o EGb atua em mediadores químicos inflamatórios, regulando a permeabilidade capilar, ao inibir a bradicinina e a histamina (TESKE e TRENTINI, 2001), as proteínas e a expressão do RNAm do TNF- α e IL-6 e aumentar a atividade da superóxido dismutase (ZHOU, YU, LIU *et al.*, 2006). Outro efeito sugerido seria na estimulação da síntese de prostaglandinas ou ação indireta sobre as catecolaminas, causando indução da vasodilatação arterial

(SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003; NISHIDA e SATOH, 2004), diminuição da permeabilidade e da fragilidade capilar, diminuição da viscosidade do sangue e redução da agregação dos eritrócitos causando aumento da perfusão tecidual e do fluxo sanguíneo cerebral (MCKENNA; JONES e HUGHES, 2001). Outras importantes ações do *Ginkgo biloba* seriam como inibidor do fator de agregação plaquetária (KOCH, 2005; CARLSON, FARQUHAR, DINUCCI *et al.*, 2007) e como antioxidante (MASTEIKOVA, MUSELIK, BERNATONIENE *et al.*, 2007; WELT, WEISS, MARTIN *et al.*, 2007; YAN, LI, XIE *et al.*, 2007) – atuando no combate a radicais livres (BLUMENTHAL; BRINCKMANN e WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003; MASTEIKOVA, MUSELIK, BERNATONIENE *et al.*, 2007) e inibindo a peroxidação lipídica da membrana celular (BOVERIS; GALLEANO e PUNTARULO, 2007).

O extrato também tem sido utilizado na prevenção ao envelhecimento (BARON-RUPPERT e LUEPKE, 2001; MCKENNA; JONES e HUGHES, 2001; TESKE e TRENTINI, 2001), em falha de memória (ARNOLD, 2003; CHEUVRONT e CARTER, 2003; DORAISWAMY e POMARA, 2003; NATHAN; HARRISON e BARTHOLOMEUSZ, 2003; WHEATLEY, 2003), na demência relacionada com a idade, síndrome pré-menstrual, prevenção do mal das alturas (FETROW e AVILA, 2000; MCKENNA; JONES e HUGHES, 2001; TESKE e TRENTINI, 2001), no tratamento da impotência erétil (ADIMOELJA, 2000; ASHTON, AHRENS, GUPTA *et al.*, 2000; TAYLOR, 2006; TAMLER e MECHANICK, 2007), na perda auditiva e nos distúrbios vestibulares (PATTERSON e BALOUGH, 2006).

4.4 Efeitos adversos

Apesar de raros, são descritos alguns efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais – diarreia, flatulência, náuseas e vômitos – e transtornos circulatórios, acarretando queda da pressão arterial e sangramentos, além de cefaléia e reações cutâneas (FETROW e AVILA, 2000; TESKE e TRENTINI, 2001). O extrato de *Ginkgo biloba* apesar de ser geralmente bem tolerado, é contra-indicado para pessoas que tiveram história de alergia prévia ao fitoterápico bem como para pacientes usuários de anticoagulantes ou que irão se submeter a algum procedimento cirúrgico, dada à possibilidade de causar hemorragias (WHO, 1999).

4.5 Efeitos no processo reprodutivo

Atualmente, existe a recomendação da não utilização do extrato de *Ginkgo biloba* durante a gestação e lactação devido à escassez de estudos sobre o fitoterápico durante estes períodos (WHO, 1999; DUGOUA, MILLS, PERRI *et al.*, 2006). O *Ginkgo biloba*, recentemente têm sido utilizado pela população para tratamento de distúrbios hormonais (KAM; DENNEHY e TSOUROUNIS, 2002; GOLD, BAIR, ZHANG *et al.*, 2007), e também para auxiliar no tratamento da disfunção sexual (ASHTON, AHRENS, GUPTA *et al.*, 2000; WAYNBERG e BREWER, 2000; ROWLAND e TAI, 2003; TAMLER e MECHANICK, 2007).

Subfrações do EGb têm efeito sobre a musculatura lisa vascular do corpo cavernoso de coelhos e humanos, ao atuarem (1) inibindo o sistema nervoso adrenérgico, via inibição do receptor pré-sináptico muscarínico; (2) ativando a adenilciclase diretamente na musculatura lisa do corpo cavernoso e, assim, aumentando a

produção de AMPc, e (3) promovendo uma hiperpolarização – e conseqüentemente uma maior abertura – dos canais de potássio do tecido do corpo cavernoso de humano (PAICK e LEE, 1996). O uso do extrato foi também aventado como alternativa ao tratamento da disfunção sexual secundária ao uso de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (COHEN e BARTLIK, 1998; ADIMOELJA, 2000; ASHTON, AHRENS, GUPTA *et al.*, 2000), mas os resultados desses trabalhos não foram totalmente conclusivos (BALON, 1999; LEVINE, 1999).

Ondrizek e col (1996a), para avaliar o efeito tóxico do extrato de *Ginkgo biloba* nas células reprodutivas, incubaram oócitos de hamster em soluções de 0,1 e 1 mg/mL de EGb durante uma hora e posteriormente inseminaram esses oócitos por espermatozóides humanos. Foi feita também incubação dos espermatozóides nas mesmas soluções de EGb durante sete dias a 23°C com posterior análise da integridade do DNA. O EGb, apesar de não ter causado dano ao DNA do espermatozóide, causou redução significativa da porcentagem de penetração e no índice de capacitação dos espermatozóides, como também degeneração dos oócitos (ONDRIZEK, CHAN, PATTON *et al.*, 1999). Em outro experimento, os mesmos autores, ao analisarem o efeito do EGb na cinética dos gametas masculinos, encontraram diminuição e até mesmo inibição da motilidade quando incubados a 1,2mg/mL do extrato por 24 horas (ONDRIZEK, CHAN, PATTON *et al.*, 1999). Estes autores parecem propor que a ação antioxidante do extrato de ginkgo (BLUMENTHAL; BRINCKMANN e WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003; SMITH e LUO, 2004) – que deveria proteger os gametas – seria menos efetiva que o efeito tóxico de alguns de seus constituintes (BARON-RUPPERT e LUEPKE, 2001; HECKER, JOHANNISSON, KOCH *et al.*, 2002; AL-YAHYA, AL-MAJED, AL-BEKAIRI *et al.*, 2006).

Outro indício de toxicidade celular do EGb foi demonstrado por Li et al. (1997) que estudaram o efeito dos flavonóides quercetina e kaempferol, flavonóides presentes no extrato de *Ginkgo biloba*, sobre a atividade da hialuronidase e penetração no *cumulus oophorus* por espermatozóides de macacos. O estudo revelou que, quando os gametas foram incubados em solução de EGb, tanto a quercetina quanto o kaempferol inibem a atividade da hialuronidase dos espermatozóides de macacos, como também promovem inibição da penetração do espermatozóide no *cumulus oophorus* de hamsters, podendo interferir com o processo reprodutivo (LI, YUDIN, VANDEVOORT *et al.*, 1997).

Tratamento crônico de camundongos Swiss com EGb causou aumento de peso de órgãos reprodutivos, como a próstata e a cauda de epidídimo. Apesar de não terem sido encontradas diferenças na contagem, mobilidade e morfologia externa dos espermatozóides, estudos cromossômicos revelaram aumento da frequência de aneuploidias e do número total de anomalias cromossômicas – com diminuição da concentração de RNA e DNA – nos animais que receberam altas doses do EGb. A capacidade reprodutiva desses camundongos tratados também se alterou, tendo sido inferior ao grupo controle e mostrando uma redução significativa da taxa de prenhez e aumento no número de perdas embrionárias após a implantação, em fêmeas inseminadas por estes machos (AL-YAHYA, AL-MAJED, AL-BEKAIRI *et al.*, 2006).

Estudo feito *in vitro* com frações do EGb demonstrou uma possível ação teratogênica, uma vez que ginkgolídeos A e B induziam apoptose na massa celular interna e provocavam diminuição do número de células no blastocisto de camundongos (CHAN, 2005). Além disso, outro estudo, dessa vez *in vivo*, revelou que o extrato do ginkgo induzia apoptose em células-tronco embrionárias de

camundongos (CHAN, 2006). Este mesmo estudo evidencia que o ginkgolídeo B, presente no extrato, atuaria através de mecanismos envolvendo a formação de radicais livres ROS, alteração do potencial de membrana mitocondrial e na ativação da caspase-3 – importantes nos processos regulatórios da apoptose (CHAN; WU e HSUUW, 2005; HSUUW, CHANG, CHAN *et al.*, 2005) – retardando o desenvolvimento embrionário, a implantação e a embriogênese em camundongos. Foi encontrado, assim, um maior número de reabsorções tardias e queda de 23% de fetos com peso superior a 600mg – indicativo de bom desenvolvimento embrionário – em camundongos tratados com ginkgolídeo B (CHAN, 2006). Chan (2006) ainda demonstrou em experimento *in vivo* diminuição da implantação, aumento de reabsorção, diminuição dos fetos vivos e de peso fetal quando embriões tratados com ginkgolídeo B foram transferidos para o útero de camundongos. O autor demonstrou também que a ingestão de ginkgolídeo B poderia causar dano aos embriões, pois estes ao serem coletados dos animais que receberam dieta enriquecida com o composto também apresentaram diminuição da proliferação e aumento da apoptose celular (CHAN, 2006).

Avaliando-se a ação do EGb durante o período reprodutivo de ratas Wistar, notou-se que não foram encontrados qualquer efeito tóxico nos animais ou nos fetos analisados, quando utilizada a dose de 17mg/kg de peso corporal (CASTRO; MELLO e MELLO, 2005). Porém, outro estudo mais recente, realizado durante o período de organogênese de ratos, o EGb, quando administrado nas doses de 7 e 14mg/Kg de peso corporal/dia, causou retardo de crescimento intra-uterino (CIUR) nos fetos (PINTO, FERNANDES, REIS *et al.*, 2007). Atribuiu-se o CIUR ao efeito estrogênico dos flavonóides presentes na constituição do EGb (OH e CHUNG,

2004), possível causa de distúrbios no desenvolvimento embrionário (JONES e HAJEK, 1995; IGUCHI; WATANABE e KATSU, 2001).

Em recente revisão, foi sugerido cuidado no uso do EGb durante a gravidez, principalmente próximo ao parto, devido as suas propriedades antiplaquetárias, o que prolongaria o tempo de sangramento. Durante o período de lactação, não há estudos suficientes que demonstrem a segurança do EGb (DUGOUA, MILLS, PERRI *et al.*, 2006). Porém, em estudo realizado em ratas, o EGb administrado durante o período de lactação, na dose de 3,5mg/Kg de peso corporal, não provocou alterações no comportamento materno nem sinais indicativos de toxicidade (FARIA, REIS, RIBEIRO *et al.*, 2006).

Com o aumento da procura por fitoterápicos na prevenção ou tratamento de doenças, a segurança desses produtos necessita ser estudada (NESS; SHERMAN e PAN, 1999), inclusive quanto à interferência no período gestacional, pelo risco de uma ingesta inadvertida acarretar distúrbios como abortamentos ou malformações (MANSON e KANG, 1999; CHRISTIAN, 2001). Os resultados apresentados por diversos estudos reforçam a possibilidade de ocorrência de infertilidade, morte embrionária e malformações após o uso do extrato de *Ginkgo biloba*, sendo sugerido que as mulheres grávidas evitem o seu consumo até que mais estudos possam ser realizados para melhor avaliação dos possíveis efeitos advindos do consumo deste extrato.

Considerando (1) o consumo elevado do extrato de *Ginkgo biloba* (BARDIA, NISLY, ZIMMERMAN *et al.*, 2007; CARLSON, FARQUHAR, DINUCCI *et al.*, 2007; KARKOS, LEONG, ARYA *et al.*, 2007); (2) o efeito embriotóxico (IGUCHI; WATANABE e KATSU, 2001) consequente da atividade estrogênica dos flavonóides presentes no extrato (OH e CHUNG, 2004); (3) a ação apoptótica dos ginkgolídeos

A e B sobre células-tronco embrionárias (CHAN, 2005; 2006), e (4) o efeito tóxico do extrato de *Ginkgo biloba* sobre o oócito (ONDRIZEK, CHAN, PATTON *et al.*, 1999), torna-se necessário a avaliação do uso do extrato de *Ginkgo biloba* durante a gestação, inclusive durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário – transporte tubário e implantação – de ratos Wistar, sendo este o objetivo do presente estudo.

HIPÓTESE

O extrato de *Ginkgo biloba* tem efeito tóxico embrionário em ratas Wistar durante os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário – período de trânsito tubário e implantação.

OBJETIVOS

1. *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos embriotóxicos do extrato de *Ginkgo biloba* em ratas Wistar durante o período de transporte tubário e implantação.

2. *Objetivos específicos*

Avaliar os efeitos embriotóxicos do extrato de *Ginkgo biloba* através das alterações clínico-laboratoriais maternas, da embrioletalidade e da presença de malformações fetais externas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Modelo experimental

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 68 ratas Wistar, adultas, nulíparas, com peso variando entre 160 e 180g. Todos os animais foram provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF, Juiz de Fora, Brasil).

As ratas foram previamente acasaladas com machos de fertilidade comprovada. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, realizado no dia seguinte à cópula, indicou o primeiro dia pós-coito (pc1) (TONG, GOH, TAIN *et al.*, 2000). Constatada a inseminação, as ratas foram alojadas individualmente em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha selecionada e mantidas em armários climatizados presentes em alojamentos, onde é mantido ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Foi fornecido diariamente às ratas 25g de ração e 100mL de água.

O protocolo experimental proposto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o nº 54/2003-CEA.

2. Substância teste

O extrato aquoso de *Ginkgo biloba* foi preparado e gentilmente cedido pela JR Pharma (Origem: China – lote nº 820146). A análise do extrato foi realizada pelo Laboratório Galena e comprovou que o extrato utilizado continha em sua composição 28,2% glicosídeos flavonóides, 8,3% de terpenolactonas, 15% de

quercetina, 10,9% de kaempferol, 2,3% de isorhammetina e menos de 5 ppm (0,81%) de ácido ginkgólico. Estas concentrações são similares às encontradas no extrato padronizado de *G. biloba* EGb 761 (JACOBS e BROWNER, 2000; BLUMENTHAL; BRINCKMANN e WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003; SMITH e LUO, 2004).

As concentrações do EGb foram preparadas baseadas na maior dose terapêutica recomendada para tratamento de doenças neurodegenerativas em humanos: 240mg/dia (KLEIJNEN e KNIPSCHILD, 1992; DIAMOND, SHIFLETT, FEIWEL *et al.*, 2000; JACOBS e BROWNER, 2000; BLUMENTHAL; BRINCKMANN e WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER e BLUMENTHAL, 2003; SMITH e LUO, 2004). As doses utilizadas 3,5; 7 e 14mg/kg/dia equivalem a uma, duas e quatro vezes à dose terapêutica máxima.

3. Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais com 17 animais em cada: um grupo Controle e três grupos Tratados. As ratas dos grupos Tratados receberam 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia do extrato de *Ginkgo biloba* em 1mL de suspensão aquosa – e, assim, denominados, respectivamente Gb 3,5, Gb 7 e Gb 14 – e as do grupo controle receberam pelo mesmo esquema 1mL de água destilada. As soluções foram administradas por via intragástrica, uma vez ao dia, durante os oito primeiros dias de prenhez.

4. *Protocolo experimental*

Para avaliação da toxicidade do EGb sobre o organismo materno foi observada a presença de sinais clínicos indicativos de toxicidade – alteração do consumo de ração e de água, alteração do peso corporal, hiper ou hipoatividade, piloereção, estereotipia, cromodaciorréia, sangramento vaginal, aumento da diurese, convulsão, diarreia e morte (MANSON e KANG, 1999; CHRISTIAN, 2001; SMITH e LUO, 2004).

O consumo de ração e água foi estimado pela diferença, respectivamente, de peso e volume entre a quantidade fornecida ao animal e o restante 24h depois. A alteração do peso corporal foi estimada através das análises dos pesos obtidos no primeiro e no último dia de prenhez. Os animais também foram pesados durante a autópsia após a remoção do trato reprodutor.

Para realização da autópsia, as ratas foram eutanasiadas, no 15^o dia de prenhez, por exsanguinação total sob anestesia (90mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilazina, via intraperitoneal) e, em seguida, após laparotomia foram removidos o trato reprodutor, fígado e rins. Ovários, fígado e rins foram dissecados, limpos em papel filtro e pesados. Nos cornos uterinos foram contados fetos viáveis (identificados pelos batimentos cardíacos), reabsorvidos e mortos. Nos ovários foram contados os corpos lúteos com auxílio de uma lupa de pala.

Fígado e rins maternos foram fixados em solução de formaldeído a 10% para posterior processamento histológico, obtendo-se cortes de 5µm que foram coradas com hematoxilina-eosina e posteriormente, analisados através de histomorfometria, realizada pelo sistema de análise de imagens Axiovision (Zeiss®).

Os fetos e placentas foram removidos, limpos em papel de filtro umedecido e, então, pesados. Em seguida, os fetos foram observados através de microscópio estereoscópico para identificação de malformações em membros superiores e inferiores, fechamento de tubo neural e morfologia de face.

Número de fetos vivos, número total de corpos lúteos, número de reabsorções e número de implantes foram determinados para cálculo das taxas de implantes por grupo (*número de implantes / número de corpos*) $\times 100$; de perdas pré-implantação por grupo ($100 - \text{taxa de implantação}$), e de perdas pós-implantação por grupo $[(\text{número de reabsorções} + \text{número de fetos mortos}) / \text{número de implantes}] \times 100$ (PARKER, 2006).

Para as análises bioquímicas e hematológicas, procedeu-se à seguinte metodologia: o sangue obtido através da punção cardíaca foi separado em dois tubos: um contendo anticoagulante EDTA a 10% e outro sem anticoagulante. No sangue anticoagulado, os valores para os eritrócitos e leucócitos foram obtidos através de diluições específicas e contagem em triplicata na câmara de Neubauer, obtendo-se a média das contagens. A dosagem de hemoglobina foi realizada no Sistema Bioquímico (SB-190) da CELM[®] com reagente LABTEST[®]. O hematócrito foi determinado em microcentrífuga, FANEM[®] usando tubos capilares. Índices hematimétricos (VCM – volume globular médio, HCM – hemoglobina corpuscular média, CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média), foram obtidos através de cálculos matemáticos. Todas as determinações foram realizadas imediatamente após o procedimento de coleta. A leucometria específica foi determinada através de extensões em lâminas coradas segundo Leischman. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas. Para análise bioquímica, o sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em

seguida, os parâmetros uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP), colesterol total e triglicérides, determinados no SB-190 CELM®, com reagentes CELM®.

5. Processamento estatístico dos dados

Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal foi usado teste Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

1. Artigo submetido para publicação

Artigo enviado à revista “*Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*”

Effects of the Extract of *Ginkgo biloba* on the Embryo-Fetal Development in Wistar Rats

Eduardo Siqueira Fernandes, Rafael Moraes Pinto, João Evangelista de Paula Reis,
Martha de Oliveira Guerra, Vera Maria Peters

Centro de Biologia da Reprodução, Federal University of Juiz de Fora,
Juiz de Fora, MG, Brazil

Correspondence to: Vera Maria Peters, PhD, Centro de Biologia da Reprodução,
Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora,
MG, Brazil. E-mail: peters.vera@ufjf.edu.br. Tel.: +55 (32) 2102-3252;
Fax: +55 (32) 2102-3255.

Running title: *Ginkgo biloba* in embryo-fetal development

Preview

From: daston.gp@pg.com

To: esfe@ymail.com,moraes.rafael@gmail.com

CC:

Subject: Manuscript submitted to Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology - BDRB-09-0021, Author's Copy

Body: 26-Jun-2009

Manuscript number: BDRB-09-0021

Dear Mr. Fernandes:

We are pleased to receive your manuscript entitled Effects of the Extract of Ginkgo biloba on the Embryo-Fetal Development in Wistar Rats by Fernandes, Eduardo; Pinto, Rafael; Reis, João Evangelista; Guerra, Martha; Vera, Peters. We will be sending it out for review shortly.

To track the progress of your manuscript through the editorial process using our new web-based system, simply point your browser to:

<http://mc.manuscriptcentral.com/bdrb-wiley>

and log in using the following user ID and password:

(User ID): esfe@ymail.com

(Password): @@PASSWORD16218132@@

If you should have any specific deadlines directly related to this manuscript, please let us know as soon as possible.

Please remember in any future correspondence regarding this article to always include its manuscript ID number BDRB-09-0021.

If you experience problems associated with the submission web site, please contact the Scholarone support staff directly using the Get Help Now link in the top right corner of the website.

Many thanks for submitting your manuscript,

Dr. George Daston

Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology Editor-in-Chief

Date Sent: 26-Jun-2009

2. *Artigo em fase final de elaboração*

Artigo a ser submetido à revista “*Journal of Toxicology*”

Toxicidade do extrato de *Ginkgo biloba* sobre ratas Wistar prenhes: Avaliação hematológica e Bioquímica

Eduardo Siqueira Fernandes, Andréa de Souza Silva, Rafael Moraes Pinto, João Evangelista de Paula Reis, Martha de Oliveira Guerra, Vera Maria Peters

Centro de Biologia da Reprodução, Federal University of Juiz de Fora,
Juiz de Fora, MG, Brazil

Correspondência: Vera Maria Peters, PhD, Centro de Biologia da Reprodução, Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora, MG, Brazil. E-mail: peters.vera@ufjf.edu.br. Tel.: +55 (32) 2102-3252; Fax: +55 (32) 21023255.

Título abreviado: Toxicidade do extrato de *Ginkgo biloba*: hematologia e bioquímica

COMENTÁRIOS

Os dados encontrados nesse trabalho indicam que, em relação ao efeito sobre o organismo materno, o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) não produziu efeitos tóxicos sobre ratas Wistar prenhes que poderiam resultar em alterações em seus perfis bioquímicos e hematológicos. Houve ainda uma tendência à hepatoproteção e nefroproteção do EGb quando usado nas doses 7 e 14 mg/Kg/dia nas fases de embriogênese.

Além disso, apesar de diversos estudos demonstrando efeitos deletérios de constituintes isolados do extrato de *Ginkgo biloba*, o EGb parece não possuir efeito significativo em perdas celulares que poderia levar a mortes embrionárias, retardo no crescimento intra-uterino e malformações fetais quando administrado a ratas Wistar nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário – trânsito tubário e implantação –, nas doses de 3,5, 7 e 14 mg/Kg de peso corporal.

CONCLUSÃO

O extrato de *Ginkgo biloba* não demonstrou embriotoxicidade em ratas Wistar durante os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário – período de trânsito tubário e implantação.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. A. Implantación humana del pre-embrión: aspectos básicos, clínicos e investigación futura. **Revista Latino-americana de Esterilidade e Fertilidade**, v. 8, p. 4-20, 1994.

ADIMOELJA, A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 23, Suppl 2, p. 82-84, 2000.

AL-YAHYA, A. A.; AL-MAJED, A. A.; AL-BEKAIRI, A. M., *et al.* Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo Biloba in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 107, n. 2, p. 222-228, 2006.

ARNOLD, K. R. Ginkgo and memory. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 546; author reply 547-548, 2003.

ASHTON, A. K.; AHRENS, K.; GUPTA, S., *et al.* Antidepressant-induced sexual dysfunction and Ginkgo Biloba. **The American Journal of Psychiatry**, Hanover, v. 157, n. 5, p. 836-837, 2000.

BALON, R. Ginkgo biloba for antidepressant-induced sexual dysfunction? **Journal of Sex & Marital Therapy**, Nova Iorque, v. 25, n. 1, p. 1-2, 1999.

BALTASI, C. The benefits of *Ginkgo biloba*. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 107, n. 3, p. 432-433, 2007.

BARDIA, A.; NISLY, N. L.; ZIMMERMAN, M. B., *et al.* Use of herbs among adults based on evidence-based indications: findings from the National Health Interview Survey. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 82, n. 5, p. 561-566, 2007.

BARON-RUPPERT, G. e LUEPKE, N. P. Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen's egg test (HET). **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, n. 2, p. 133-138, 2001.

BILIA, A. R. Ginkgo biloba L. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 3, p. 276-279, 2002.

BLUMENTHAL, M.; BRINCKMANN, J. e WOLLSCHLAEGER, B. Ginkgo. In: **The ABC clinical guide to herbs**. Nova Iorque: Thieme. 2003. p.185-200.

BOVERIS, A. D.; GALLEANO, M. e PUNTARULO, S. In vivo supplementation with Ginkgo biloba protects membranes against lipid peroxidation. **Phytotherapy Research: PTR**, Londres, v. 21, n. 8, p. 735-740, 2007.

BROCAS, C.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F., *et al.* Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes, and embryos. **Biology of Reproduction**, Nova lorque, v. 57, n. 4, p. 901-907, 1997.

CARLSON, J. J.; FARQUHAR, J. W.; DINUCCI, E., *et al.* Safety and efficacy of a ginkgo biloba-containing dietary supplement on cognitive function, quality of life, and platelet function in healthy, cognitively intact older adults. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 107, n. 3, p. 422-432, 2007.

CARSON, G. D. e NAFTOLIN, F. Fertilization and pre-implantation development. **La Vie Medicale Canadien et Français**, v. 11, p. 216-225, 1982.

CASTRO, A. P.; MELLO, F. B. e MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 265-269, 2005.

CHAN, W. H. Ginkgolides induce apoptosis and decrease cell numbers in mouse blastocysts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova lorque, v. 338, n. 2, p. 1263-1267, 2005.

_____. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 11, p. 2985-2995, 2006.

CHAN, W. H.; WU, H. J. e HSUW, Y. D. Curcumin inhibits ROS formation and apoptosis in methylglyoxal-treated human hepatoma G2 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova lorque, v. 1042, n., p. 372-378, 2005.

CHEN, W. D.; LIANG, Y.; XIE, L., *et al.* Pharmacokinetics of the ginkgo B following intravenous administration of ginkgo B emulsion in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2007.

CHEUVRONT, S. N. e CARTER, R., 3RD. Ginkgo and memory. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 547; author reply 547-548, 2003.

CHRISTIAN, M. S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, A. W. (Ed). **Principles and Methods of Toxicology**. Nova Iorque: Raven Press, 2001. p.1301-1381.

COHEN, A. J. e BARTLIK, B. Ginkgo biloba for antidepressant-induced sexual dysfunction. **Journal of Sex & Marital Therapy**, Nova Iorque, v. 24, n. 2, p. 139-143, 1998.

DIAMOND, B. J.; SHIFLETT, S. C.; FEIWEL, N., *et al.* Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 81, n. 5, p. 668-678, 2000.

DORAISWAMY, P. M. e POMARA, N. Ginkgo and memory. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 547; author reply 547-8, 2003.

DUDEK, R. W. e FIX, J. D. Human birth defects. In: (Ed). **Embriology Board Review Series**. Filadélfia: Williams & Wilkins, 1998. p.257-265.

DUGOUA, J. J.; MILLS, E.; PERRI, D., *et al.* Safety and efficacy of ginkgo (*Ginkgo biloba*) during pregnancy and lactation. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, Oakville, v. 13, n. 3, p. 277-284, 2006.

DUMM, C. L. A. G. Primeira semana do desenvolvimento. Segmentação e implantação. In: DUMM, C. L. A. G. (Ed). **Embriologia Humana - Atlas e Texto**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.46-55.

FARIA, D. E.; REIS, J. E. D. P.; RIBEIRO, L. C., *et al.* Comportamento de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) expostas ao extrato de Ginkgo biloba durante a lactação. **Revista Brasileira de Zociências**, Juiz de Fora, v. 8, n. 2, p. 91-98, 2006.

FETROW, C. W. e AVILA, J. R. **Manual de Medicina Alternativa para o Profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. 744 p.

FOURTILLAN, J. B.; BRISSON, A. M.; GIRAULT, J., *et al.* Propriétés pharmacocinetiques du Bilobalide et des Ginkgolides A et B chez le sujet sain après administrations intraveineuses et orales d'extrait de Ginkgo biloba (EGb 761). **Thérapie**, Paris, v. 50, n. 2, p. 137-144, 1995.

GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E. e FERNANDÉZ, C. G. **Embriologia**. Porto Alegre: Artes Médicas. 1991. 350p.

GOLD, E. B.; BAIR, Y.; ZHANG, G., *et al.* Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Menopause**, Nova Iorque, v. 14, n. 4, p. 612-623, 2007.

GUERRA, M. O. e PETERS, V. M. Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação do blastocisto. **Boletim do Centro Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 18, p. 15-32, 1999.

HECKER, H.; JOHANNISSON, R.; KOCH, E., *et al.* In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from Ginkgo biloba L. **Toxicology**, Amsterdam, v. 177, n. 2-3, p. 167-77, 2002.

HOLSON, J. F.; NEMEC, M. D.; STUMP, D. G., *et al.* Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study finding. In: HOOD, R. D. (Ed). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. Londres: Taylor & Francis, 2006. p.329-424.

HSUW, Y. D.; CHANG, C. K.; CHAN, W. H., *et al.* Curcumin prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryonic stem cells and blastocysts. **Journal of cellular physiology**, Filadélfia, v. 205, n. 3, p. 379-386, 2005.

ICH. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products. **Guideline for Industry ICH - S5A**, 2001.

_____. Harmonized Tripartite Guideline S5 (R2): detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility, 2005.

IGUCHI, T.; WATANABE, H. e KATSU, Y. Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. **Hormones and Behavior**, Nova Iorque, v. 40, n. 2, p. 248-251, 2001.

IZZO, A. A. e CAPASSO, F. Herbal medicines to treat Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 47-48, 2007.

JACOBS, B. P. e BROWNER, W. S. Ginkgo biloba: a living fossil. **The American Journal of Medicine**, Nova Iorque, v. 108, n. 4, p. 341-342, 2000.

JONES, L. A. e HAJEK, R. A. Effects of estrogenic chemicals on development. **Environmental Health Perspectives**, Bethesda, v. 103 Suppl 7, p. 63-67, 1995.

KAM, I. W.; DENNEHY, C. E. e TSOUROUNIS, C. Dietary supplement use among menopausal women attending a San Francisco health conference. **Menopause**, Nova lorque, v. 9, n. 1, p. 72-78, 2002.

KARKOS, P. D.; LEONG, S. C.; ARYA, A. K., *et al.* 'Complementary ENT': a systematic review of commonly used supplements. **The Journal of Laryngology and Otology**, Lomdres, v. 121, n. 8, p. 779-782, 2007.

KLEIJNEN, J. e KNIPSCHILD, P. Ginkgo biloba. **The Lancet**, Boston, v. 340, n. 8828, p. 1136-1139, 1992.

KOCH, E. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 12, n. 1-2, p. 10-16, 2005.

LEVINE, S. B. Caution recommended. **Journal of Sex & Marital Therapy**, Nova lorque, v. 25, n. 1, p. 2-5, 1999.

LI, M. W.; YUDIN, A. I.; VANDEVOORT, C. A., *et al.* Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. **Biology of Reproduction**, Nova lorque, v. 56, n. 6, p. 1383-9, 1997.

LONGPRE, F.; GARNEAU, P.; CHRISTEN, Y., *et al.* Protection by EGb 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova lorque, v. 41, n. 12, p. 1781-1794, 2006.

LUO, Y. Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and ginkgo biloba leaf extract. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 78, n. 18, p. 2066-2072, 2006.

LUO, Y.; SMITH, J. V.; PARAMASIVAM, V., *et al.* Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 99, n. 19, p. 12197-12202, 2002.

MANSON, J. M. e KANG, Y. J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, A. W. (Ed). **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1999. p.987-1037

MASTEIKOVA, R.; MUSELIK, J.; BERNATONIENE, J., *et al.* Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures. **Medicina (Kaunas)**, Kaunas, v. 43, n. 4, p. 306-309, 2007.

MCKENNA, D. J.; JONES, K. e HUGHES, K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, Aliso Viejo, v. 7, n. 5, p. 70-86, 88-90, 2001.

MOORE, K. L. e PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 609 p.

NAKANISHI, K. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 13, n. 17, p. 4987-5000, 2005.

NASSIS, C. D. Z.; KAPPAZ, G. T.; GOLDENSTEIN, P. T., *et al.* Ginkgo biloba. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 9, p. 690-696, 2001.

NATHAN, P. J.; HARRISON, B. J. e BARTHOLOMEUSZ, C. Ginkgo and memory. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 546; author reply 547-548, 2003.

NESS, J.; SHERMAN, F. T. e PAN, C. X. Alternative medicine: what the data say about common herbal therapies. **Geriatrics**, Mineápolis, v. 54, n. 10, p. 33-38, 40, 43, 1999.

NISHIDA, S. e SATOH, H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 339, n. 1-2, p. 129-33, 2004.

OH, S. M. e CHUNG, K. H. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. **Life Sciences**, Oxford, v. 74, n. 11, p. 1325-1335, 2004.

ONDRIZEK, R. R.; CHAN, P. J.; PATTON, W. C., *et al.* An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. **Fertility and Sterility**, Nova Iorque, v. 71, n. 3, p. 517-522, 1999.

_____. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Nova Iorque, v. 16, n. 2, p. 87-91, 1999.

PAICK, J. S. e LEE, J. H. An experimental study of the effect of ginkgo biloba extract on the human and rabbit corpus cavernosum tissue. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 156, n. 5, p. 1876-1880, 1996.

PARKER, R. M. Testing for reproductive toxicity. In: HOOD, R. D. (Ed). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. Londres: Taylor and Francis, 2006. p.525-587.

PATTERSON, M. B. e BALOUGH, B. J. Review of pharmacological therapy for tinnitus. **The International Tinnitus Journal**, Nova Iorque, v. 12, n. 2, p. 149-59, 2006.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; MAURI, P. L., *et al.* Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginkgo biloba extract. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 673, n. 1, p. 75-80, 1995.

PIETTA, P. G.; GARDANAB, C. e L., M. P. Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 693, p. 249-255, 1997.

PINTO, F. C. M. **Estudo da embriotoxicidade da beta-ionona em ratos**. (Dissertação. Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005. 81 p.

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; REIS, J. E., *et al.* Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. **Reproductive Toxicology**, Nova Iorque, v. 23, n. 4, p. 480-485, 2007.

RAMASSAMY, C.; LONGPRE, F. e CHRISTEN, Y. Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? **Current Alzheimer Research**, São Francisco, v. 4, n. 3, p. 253-262, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. e EICHHORN, S. E. Gimnospermas. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.448-476.

ROWLAND, D. e TAI, W. A review of plant-derived and herbal approaches to the treatment of sexual dysfunctions. **Journal of Sex & Marital Therapy**, Nova Iorque, v. 29, n. 3, p. 185-205, 2003.

SEGURA, M. A. M.; DELGADO, S. B. e TORRES, R. G. Aplicaciones clínicas del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba*. **Revista de Fitoterapia**, Carlet, v. 1, n. 2, p. 95-105, 2000.

SIERPINA, V. S.; WOLLSCHLAEGER, B. e BLUMENTHAL, M. Ginkgo biloba. **American Family Physician**, Cidade do Kansas, v. 68, n. 5, p. 923-926, 2003.

SMITH, D. G.; CAPPAL, R. e BARNHAM, K. J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1768, n. 8, p. 1976-1990, 2007.

SMITH, J. V. e LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 64, n. 4, p. 465-472, 2004.

TALANSKY, B. E. Fertilization and early embryonic development in the human. In: COEHN, J. (Ed). **Micromanipulation of human gametes and embryos**. Nova Iorque: Raven Press, 1992. p.84-112.

TAMLER, R. e MECHANICK, J. I. Dietary supplements and nutraceuticals in the management of andrologic disorders. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Filadélfia, v. 36, n. 2, p. 533-552, 2007.

TAYLOR, M. J. Strategies for managing antidepressant-induced sexual dysfunction: a review. **Current Psychiatry Reports**, Filadélfia, v. 8, n. 6, p. 431-436, 2006.

TESCH, B. J. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Nova Iorque, v. 188, n. 5 Suppl, p. S44-55, 2003.

TESKE, M. e TRENTINI, A. M. M. **Herbarium: Compêndio de Fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico. 2001. 317 p.

TONG, T. Y.; GOH, V. H.; TAIN, C. F., *et al.* Direct effects of varying doses of oestradiol on early embryonic development in vitro culture of rat's two-cell embryos. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 78, n. 6, p. 453-456, 2000.

VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. **J Chromatogr A**, Amsterdam, v. 967, n. 1, p. 21-55, 2002.

WAYNBERG, J. e BREWER, S. Effects of Herbal vX on libido and sexual activity in premenopausal and postmenopausal women. **Advances in Therapy**, Nova Jersey, v. 17, n. 5, p. 255-262, 2000.

WELT, K.; WEISS, J.; MARTIN, R., *et al.* Ginkgo biloba extract protects rat kidney from diabetic and hypoxic damage. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, v. 14, n. 2-3, p. 196-203, 2007.

WHEATLEY, D. Ginkgo and memory. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 546-547; author reply 547-548, 2003.

WHO. Folium Ginkgo. In: WHO (Ed). **WHO Monographs on Selected Medicinal Plants**. Geneva: World Health Organization, v.1, 1999. p.154-67.

WU, Y.; WU, Z.; BUTKO, P., *et al.* Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic Caenorhabditis elegans. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, Nova lorque, v. 26, n. 50, p. 13102-13113, 2006.

XIE, J.; DING, C.; GE, Q., *et al.* Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of Ginkgo biloba extract in rats. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 864, n. 1-2, p. 87-94, 2008.

YAN, H. D.; LI, X. Z.; XIE, J. M., *et al.* Effects of advanced glycation end products on renal fibrosis and oxidative stress in cultured NRK-49F cells. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 120, n. 9, p. 787-793, 2007.

ZHOU, Y. H.; YU, J. P.; LIU, Y. F., *et al.* Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2006, n. 5, p. 92642, 2006.

ZHOU, Z. e ZHENG, S. The missing link in Ginkgo evolution. **Nature**, Londres, v. 423, n. 6942, p. 821-822, 2003.

APÊNDICE

A – Trabalho publicado

Recent Progress in Medicinal Plants

Volume 25

Chemistry and Medicinal Value

V.K. Singh

Assistant Director (Botany)

Central Council for Research in Unani Medicine

(Dept. of AYUSH, Ministry of Health & Family Welfare)

61-65, Institutional Area, Janakpuri, New Delhi, India

J.N. Govil

Former Principal Scientist

Division of Genetics

Indian Agricultural Research Institute

New Delhi, India

ISBN : 1-933699-15-9

SERIES ISBN : 0-9656038-5-7

2009



Stadium Press LLC, U.S.A.

P.O. Box-722200, Houston, Texas-77072, USA

Tel.: 713-541-9400; Fax : 713-541-9401

E-mail : studiumpress@studiumpress.com

Recent Advances in the Reproductive and Hormonal Effects of *Ginkgo biloba*

RAFAEL MORAES PINTO, EDUARDO SIQUEIRA FERNANDES, LUCIANA VALENTE BORGES*, VERA MARIA PETERS AND MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA

Abstract

Ginkgo biloba is a medicinal plant widely used by the population. Due to its actions as an anti-inflammatory and antioxidant, *Ginkgo biloba* extract (GBE) has been largely used in the treatment of Alzheimer's disease, cerebrovascular insufficiency and peripheral arterial occlusive disease. In spite of those benefits, recent findings showed that GBE may interfere with the physiology of reproduction causing reproductive toxicity. *In vitro* and *in vivo* studies showed that GBE can cause oocyte degeneration, inhibition of human sperm motility, apoptosis of mouse blastocysts, as well as, low rate of pregnancy and pre-implantation loss. Furthermore, recent studies showed that GBE has both estrogenic and anti-estrogenic effects, which could be useful as an alternative hormone replacement therapy or, on the other hand, it could act like an endocrine disruptor and interfere with the physiology of the natural hormones. This review provides a brief overview of reproductive and hormonal effects of *Ginkgo biloba* extract.

Key words : *Ginkgo biloba*, Toxicity, Reproduction, Hormones, Estrogen, Endocrine disruptors

Introduction

Medicinal plants use has risen exponentially in recent years, attributable primarily to an augment in the proportion of the population seeking alternative therapies rather than prescription medications (Eisenberg *et al.*, 1998). The increased intake of those substances was followed by an

1. Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

* *Corresponding author*: E-mail: luvalenteb@yahoo.com.br

enlargement of news media coverage of health issues through newspapers, magazines, and journal articles, with both informative and commercial goals. Despite substantial growth in the use of alternative medicines and therapies, much of the information the public receives about it, is inaccurate or incomplete, usually not reporting potential health hazards (Bonevski *et al.*, 2008). An alternative to minimize the risks would be to increase the number of researches on alternative compounds in order to form a reliable database for patients, physicians and other health professionals (Joos *et al.*, 2008). One of the most sold and consumed herbal medicines worldwide is *Ginkgo biloba* (Kleijnen & Knipschild, 1992; Mar & Bent, 1999; Sierpina *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2007). In spite of being widely used in the treatment of several pathologies, little is known about its action on reproductive physiology.

History and Botany

Ginkgo biloba is the most ancient living tree on earth, originally from Paleozoic Era, around 225 million years ago (Blumenthal, 2003; Zhou & Zheng, 2003). It is the only surviving member of the Ginkgoaceae family, Ginkgoales order and Gymnospermae family (Who, 1999; Nakanishi, 2005). The Ginkgo takes its name from 'ginkyo' in Japanese and 'yinhsing' in Chinese; both words translate to 'silver apricot', and the notation biloba refers to the morphology of leaves, which are divided into two distinct lobes (Fig 1) (Nakanishi, 2005).



Fig 1a. *Ginkgo biloba* leaf. It is about 3 inches across with a notch dividing into 2 lobes (thus biloba). Numerous veins radiate out of the base with no midrib. Available in: <<http://zo-d.com/stuff/gardening/ginkgo-biloba-leaves.html>>



Fig 1b. Ginkgo Fossil - British Columbia, Canada. Also known as maidenhair-tree, *Ginkgo biloba*'s leaf shape and other vegetative organs are identical to fossils found in the United States, Europe and Greenland. Available in: <<http://forestry.about.com/od/forestphotogalleries/ig/Ginkgo-Biloba/Ginkgo-Fossil.htm>>

The tree *Ginkgo biloba* (Fig 2) is native from China, but it has been diffused, with ornamental purpose, to other countries, such as Australia, Japan, United States and other European countries, and it is commercially cultivated in France and United States. The maidenhair tree, as it is also known, is often called a 'living fossil', being able to live among 2000 to 4000 years, to reach more than 35 meters high and presents a diameter varying from 3 to 4 meters (Who, 1999).



Fig 2. The tree *Ginkgo biloba*. Available in: < <http://forestry.about.com/od/forestphotogalleries/ig/Ginkgo-Biloba/Moses-Cone-Ginkgo.htm> >

The tree *Ginkgo biloba* is also known for its great genetic resistance, being highly resistant to insects, microorganisms and environmental toxins (Smith & Luo, 2004; Nakanishi, 2005). That resistance was proved in the Japanese city Hiroshima, since *G. biloba* was the first plant to grow after the atomic bomb explosion (Tesch, 2003).

The term Ginkgo was first used by the German physician and botanist Engelbert Kaempfer in 1712, but Linnaeus provided the terminology *Ginkgo biloba* in 1771 (Nakanishi, 2005).

Standardized Extract

The extracts preparations of *Ginkgo biloba* (GBE) are usually accomplished with either fresh or dried leaves and using acetone and water for the final product (Van Beek, 2002). The standardized extract is commonly administered via oral under liquid or tablet forms (Who, 1999).

The standard extract usually contains from 22 to 27% of flavonol glycosides (flavonols: quercetin, kaempferol (Fig 3) and isorhamnetin; biflavones: bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin and sciadopitysin) and from 5 to 7% of diterpene lactones (ginkgolides: A, B, C and J; sesquiterpene lactone: bilobalide) (Who, 1999; Van Beek, 2002, 2005; Xie *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008). The alkylphenols are also present in GBE, predominantly ginkgolic acids, and ginkgols. Due to the allergenic, cytotoxic, mutagenic and neurotoxic properties of these substances, their concentration in extracts is limited to 5 parts per million, an amount that does not cause toxicity (Who, 1999; Baron-Ruppert & Luepke, 2001).

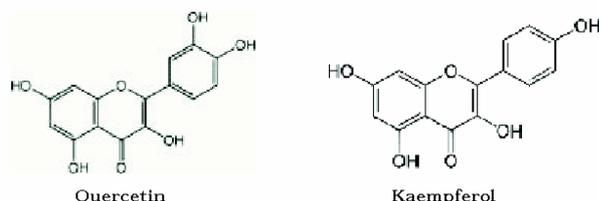


Fig 3. Chemical structures of quercetin and kaempferol, the main flavonols found in GBE

GBE flavonols are absorbed and metabolized, and its metabolites are detected in urine, faeces and blood of Wistar rats (Pietta *et al.*, 1995) as well as in human urine after GBE extract oral intake (Pietta *et al.*, 1997).

Properties and mechanisms of action

Ginkgo biloba has been used as a medicinal plant through centuries. The first written record of clinical use of Ginkgo comes from more than 5000 years ago, in ancient China, where Chen Nong (2767 to 2687 AD) reported

the medicinal properties of the plant (Diamond *et al.*, 2000). There are reports that *Ginkgo biloba* was used in the treatment of senility in aging members of the Chinese royal court in 1578 AD (Nakanishi, 2005). The indications included the treatment of heart and lungs maladies through *G. biloba* steam inhalation or by tea intake (Diamond *et al.*, 2000). The tea was used for treating asthma, bronchitis (Kleijnen & Knipschild, 1992), cough and enuresis (Smith & Luo, 2004).

Nowadays, the *Ginkgo biloba* leaf extract has been widely used by population for the treatment of several diseases (Mahadevan & Park, 2008). The popular use of GBE include the treatment of inflammation, allergy (Blumenthal, 2003), bronchitis, chronic rhinitis, arthritis, edema and as a vermifuge and on labor induction (Who, 1999). Recent studies indicate neuroprotective properties (Calapai *et al.*, 2000; Ahlemeyer & Kriegelstein, 2003; Li *et al.*, 2003; Paganelli *et al.*, 2006), anticarcinogenic (Defeudis *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), hepatoprotective (Welt *et al.*, 2004; Naik & Panda, 2008) and cardioprotective activities (Pietri *et al.*, 1997; Rioufol *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2007; Mahadevan *et al.*, 2008; Panda & Naik, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Currently, the main indications for the use of *Ginkgo biloba* are the following pathologies: 'cerebral insufficiency' (confusion, reduced memory, distraction, dizziness, buzz, headache, low energy, depression, fatigue, anxiety and decreased physical activity); Alzheimer's disease; peripheral vascular diseases (intermittent claudication, deep venous thrombosis) and central vascular diseases (Who, 1999; Blumenthal, 2003; Chan *et al.*, 2007).

The use of GBE is due mainly to: its activity on inhibiting the platelet activating factor (Koch, 2005) and on the important antioxidant property (Naik & Panda, 2008; Panda & Naik, 2008). In the former activity, *Ginkgo biloba* prevents platelet aggregation and causes an increased blood flow (Blumenthal, 2003; Koch, 2005). As an antioxidant, GBE induces a decrease of reactive oxygen species (Blumenthal, 2003) besides attenuating membrane lipid peroxidation (Panda & Naik, 2008).

Furthermore, other GBE activities which could be related to the clinical effects are: inhibition of nitric oxide synthesis (Calapai *et al.*, 2000); increase in serotonin release and reuptake; inhibition of amyloid beta deposition (Blumenthal, 2003); increased neuronal plasticity (Williams *et al.*, 2004); augment of glucose uptake and consume by the brain (Dubey *et al.*, 2004).

Adverse Effects

Although *Ginkgo biloba* extract is generally well tolerated, it is contraindicated to people who are allergic to the phytotherapeutic, as well as to patients using anticoagulants or anyone that will be submitted to a

surgery, in order to avoid hemorrhage (Who, 1999; Blumenthal, 2003). Care should also be taken regarding drugs interactions (Gaudineau *et al.*, 2004), since GBE might potentialize the action of antiplatelet agents, such as aspirin and of anticoagulants as warfarin, and also thiazide-like diuretics (Blumenthal, 2003).

Some adverse effects related after GBE use are gastrointestinal disorders, as diarrhea, nausea and vomit, and vascular disorders, as headache, allergic cutaneous reaction, vertigo and stroke (Who, 1999; Ernst, 2002; Blumenthal, 2003).

Reproductive Toxicology

Currently, *Ginkgo biloba* use is contraindicated during pregnancy and lactation, due to the lack of studies with GBE during these periods (Who, 1999; Blumenthal, 2003; Dugoua *et al.*, 2006). Some *in vitro* and *in vivo* studies were accomplished in order to assess the reproductive toxicity of GBE.

Male reproductive toxicity

Al-Yahya *et al.* (2006) evaluated *Ginkgo biloba* extract for its effects on reproductive toxicity in male Swiss albino mice. The treatment of mice with growing doses of GBE (25, 50 and 100 mg/kg/day) for 90 days by oral gavage, caused significant increase in the mean weight of caudae epididymis at 50 and 100 mg/kg, and of prostate at 100 mg/kg of GBE. Although the percent motility, sperm count and morphology of spermatozoa were not affected; chromosomal studies demonstrated increased aneuploidy and other chromosomal aberrations in animals receiving the highest dose of GBE. After mating these mice with reproductive female, it was found a decreased rate of pregnancy and it caused embryonic losses before implantation at 100 mg/kg of GBE. As those results indicate the possibility of occurring malformations and infertility after GBE intake, it is recommended caution on *Ginkgo biloba* use (Al-Yahya *et al.*, 2006).

Toxicity during fertilization period

The toxicity of *Ginkgo biloba* extract on reproductive cells were evaluated through the incubation of hamster oocytes in 0.1 and 1 mg/ml of GBE solutions during one hour and later, those oocytes have been inseminated by human spermatozoa. Spermatozoa were also incubated in the same GBE solutions during seven days in 23 °C, with later analysis of DNA integrity. Although GBE did not cause damage to spermatozoa DNA, it produced a numerically lower percentage of sperm penetration and also a decreased capacitation index, as well as it caused oocyte degeneration (Ondrizek *et al.*, 1999a). In another experiment, the same authors, when analyzing the effect of GBE on spermatozoa kinetics, have found decrease and even inhibition of motility when spermatozoa were incubated in 1.2 mg/ml during 24 hours (Ondrizek *et al.*, 1999b).

Another sign of cellular toxicity of GBE was demonstrated by Li *et al.* (1997). In this work, they studied the effect of the flavonoids kaempferol and quercetin, substances present in *Ginkgo biloba* extract, on the activity of hyaluronidase and on cumulus oophorus penetration by monkey sperm. This study demonstrated that when the male gametes are incubated in GBE solution, both kaempferol and quercetin inhibit the activity of hyaluronidase from monkey spermatozoa. It also inhibits sperm penetration into hamster cumulus, being able to interfere in the reproductive process (Li *et al.*, 1997).

Embryonic toxicity

In order to evaluate the toxicity of GBE in embryo, mice embryos were collected and cultivated in solutions containing 5 and 10 μM ginkgolide A or ginkgolide B, the major components of *Ginkgo biloba* extracts. The results indicated that ginkgolide treatment of mouse embryo induces apoptosis, decreases cell numbers and interferes in the development of embryo cultivated with both concentrations of ginkgolide A and B (Chan, 2005). In another study, the embryonic toxicity of ginkgolide B was assessed *in vitro* and *in vivo*. Treatment of embryonic stem cells with ginkgolide B induced apoptosis via reactive oxygen species generation, c-Jun protein phosphorylation and loss of mitochondrial membrane potential. Furthermore, it was showed that ginkgolide B induced a decrease in the number of cells, together with an increased level of apoptosis in cells of mice embryo. Besides the *in vitro* toxicity, when embryo were treated with ginkgolide B and transferred to uterus of mice, there was a decreased number of implantations and of live fetuses, an augment of resorptions, and a diminished fetal weight. Furthermore, it was demonstrated that ginkgolide B intake can cause harm to embryo, since the embryo collected from animals that received diet supplemented with this substance also showed decreased cell proliferation and increased apoptosis (Chan, 2006).

Toxicity during organogenesis and fetogenesis

There are signs that GBE could be toxic if administered during the period of organogenesis and fetogenesis. Fetuses from Wistar, whose mothers were treated with 7 and 14 mg/kg body weight/day of *G. biloba*, by gavage, from the 8th to 20th day of pregnancy, had decreased liver and body weights. However the extract did not cause maternal toxicity (Pinto *et al.*, 2007).

The results presented here reinforce the possible occurrence of infertility, embryo death and malformations following the use of *Ginkgo biloba* extract. Herewith, pregnant women should avoid consuming GBE until more studies are accomplished to better evaluate the effects of the extract.

Hormonal Effects

Ginkgo biloba has been widely used by population for treating hormonal disturbs, menopausal symptoms (Kam *et al.*, 2002; Gold *et al.*, 2007) and

even to help in the treatment of sexual dysfunctions (Ashton *et al.*, 2000; Waynberg & Brewer, 2000; Rowland & Tai, 2003). Although important clinical studies have not been accomplished yet, there are some evidences to support the use of *Ginkgo biloba* to treat the previously cited disturbs.

***In vitro* estrogenic effect**

The estrogenic action of *Ginkgo biloba* was suspected since studies demonstrated that quercetin and kaempferol, the main flavonols found in GBE showed estrogenic effects, which were determined in one *in vitro* assay, through the binding of flavonols to the human recombinant estrogen receptor, and also through the induction of cell proliferation in a human breast cancer (MCF-7 cells) (Han *et al.*, 2002). Then, in 2004, Oh & Chung proved the estrogenic effect of *Ginkgo biloba* and of its major flavonols (quercetin, kaempferol and isorhamnetin). The substances present in the extract bound directly to the estrogen receptor, showing higher affinity to beta receptor when compared to the alpha receptor, and also inhibited the binding of estradiol to both alpha and beta receptors, what indicates a possible competition for the same receptors. In this experiment, another proof of estrogenic effect of *Ginkgo biloba* was the induction of cell proliferation in breast cancer cells (MCF-7) and of pS2 gene expression in these cells, which are regulated by the estrogen response pathway (Oh & Chung, 2004). The same authors have demonstrated later that *Ginkgo biloba*, besides presenting estrogenic effect, also exhibits antiestrogenic effect. It was observed that the low concentrated extract induces cell proliferation in MCF-7 cells, but as the concentration of the extract is increased, it inhibits cell proliferation, such effect is similar to that of tamoxifen, an estrogen antagonist. Moreover, the authors proved that high concentration of GBE inhibit the pS2 gene expression, which responds to estrogenic stimulus and inhibits the aromatase enzyme, which is responsible for the conversion of androgens to estrogens in several human tissues (Oh & Chung, 2006). These results indicate the possibility of GBE use in the treatment of menopause symptoms and also as an adjuvant therapy in estrogen-dependent cancers.

***In vivo* estrogenic effect**

GBE was given to animals in order to evaluate a possible estrogenic effect. Lee *et al.* (2000) administered solutions bearing 1.4 and 2.8 mg of GBE to female ovariectomized mice, via intraperitoneal injection, during 15 days. There was no significant difference in endometrial thickness, neither in mammary diameter, but the treatment caused changes in vaginal epithelium compatible with the estrogenic phase, what was probably induced by the estrogenic effect of the extract (Lee *et al.*, 2000).

Another sign of estrogenic action was found in a study with rats. In this experiment, the treatment with GBE was similar to estrogen preventing cognitive dysfunction in ovariectomized females, which were submitted to restraint stress. The treatment also reduced the loss of hippocampal CA3 neurons of the animals, suggesting estrogenic effect (Takuma *et al.*, 2007).

Currently it is known that the estrogenic effect of GBE is mainly due to the action of its major components: quercetin and kaempferol. The estrogenic effect of kaempferol was mainly detected in immature female mice. Immature female mice, which received 100 mg/kg of kaempferol via oral gavage during 4 days, did not present alterations in uterine weight; however, it was found to significantly increase the overall uterine concentration of estrogen receptor alpha, what could indicate an increased sensibility of the uterus to circulating estrogens (Breinholt *et al.*, 2000). Moreover, the administration of kaempferol only or together with 17- β -estradiol to immature and ovariectomized rats, during four days, significantly increased both absolute and relative uterine weights, suggesting a synergistic effect of the two substances; such effect was found only in immature animals. The analysis of vaginal smears from immature rats revealed an increased cornification in animals receiving kaempferol only or in combination with estrogen, suggesting that it potentialized the uterotrophic effect of 17- β -estradiol (Stroheker *et al.*, 2003).

Effect on bone metabolism

The action of *Ginkgo biloba* and its components have also been studied for its abilities to interfere with the bone metabolism, since it presents estrogenic effect, it could be useful in the treatment of osteoporosis.

An *in vitro* study was accomplished to investigate the estrogenic effect of quercetin and kaempferol on osteoblasts. Osteoblasts were incubated in different concentrations of substances and it was found an increased production of alkaline phosphatase and also of cell proliferation. Those results were similar to the ones found when the same cells were treated with 17- β -estradiol. It was also demonstrated that when ICI 182780, an antagonist of estrogen, was present in cell cultures, it inhibited the production of alkaline phosphatase, confirming that the estrogenic effect of flavonols was the responsible for the previously cited results (Prouillet *et al.*, 2004). The estrogenic effect of kaempferol on bone metabolism was also validated by Trivedi *et al.* (2008). They found an increased mineralization in *in vitro* cultures of osteoblasts and also a higher bone mineral density in rats treated with 5 mg/kg/day of kaempferol (Trivedi *et al.*, 2008).

Besides of its major component kaempferol, the whole *G. biloba* extract, was analyzed regarding its estrogenic effect on bone metabolism. Osteoblasts were incubated in different concentrations of GBE (25, 50, 100, 150, 200 and 250 μ g/ml) and it was found an increased production of alkaline phosphatase at the doses of 50, 100 and 150 μ g/ml. On the *in vivo* study, female rats were ovariectomized and after 10 weeks, they received 25, 50, 100 and 200 mg/kg/day of GBE via oral gavage. The animals that received 100 and 200 mg/kg/day of GBE presented decreased osteoclast resorptive activity (Oh *et al.*, 2008).

Effect on sexual behavior

In addition to the estrogenic effect, *Ginkgo biloba* seems to interfere with other hormones. Another study evaluated the sexual behavior of male rats treated with GBE (10, 50, or 100 mg/kg/day), via oral gavage, during 28 days. The sexual behavior was analyzed after 7, 14, 21 and 28 days of treatment, as well as were obtained the weight of reproductive organs, the number of spermatozoa, the serum levels of testosterone and prolactin and the cerebral levels of dopamine and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). The treatment with GBE did not cause alterations in rat's organs weights. However, there was increased intromission frequency in animals of treated with 50 mg/kg after 28 days, and also in rats that received 100 mg/kg/day of GBE after 14 and 21 days. Moreover, animals treated with 50 mg/Kg of the extract showed an increase in ejaculation frequency after 14, 21 and 28 days of treatment. Regarding the hormonal serum levels, the treatment did not change the testosterone level, however, the prolactin level of animals which received 50 mg/kg/day of GBE was significantly reduced when compared to control group. In the same group, it was noted a significant increase in cerebral dopamine level, without a concomitant increase of its metabolite DOPAC. The results indicate that the treatment with *Ginkgo biloba* can improve sexual dysfunction through the decrease of prolactin serum levels. In the same experiment, the authors also evaluated a culture of Leydig cells at different concentrations of GBE (50, 100, 250, 500, or 1000 mg/ml), finding a significant increase in the production of testosterone by the Leydig cells at 1000 mg/ml of GBE (Yeh *et al.*, 2008).

Human studies

Paulus *et al.* (2002) carried out a clinical trial with 45 women, which had been diagnosed with reduced uterine arterial blood flow and who had no success in infertility treatments. After the treatment with 243 mg/day of GBE, patients showed a thickened endometrium, without a concomitant increase in uterine and ovarian blood flow (Paulus *et al.*, 2002), suggesting the possible estrogenic action of *G. biloba*.

Moreover, the extract was physiologically and psychologically tested in the treatment of sexual dysfunctions in women. Meston *et al.* (2008) analyzed the effects of both short- and long-term GBE administration. In the first part of the experiment, 99 women received 300 mg of GBE, and then after 90 minutes the level of sexual arousal was physiologically measured, through vaginal photoplethysmography, and subjectively measured, through a questionnaire. It was found that GBE induced a small but significant facilitatory effect on physiological sexual arousal, but not subjective sexual arousal. The long-term study assessed women who were divided into four groups, receiving placebo, 300 mg of GBE, sex therapy or sex therapy plus GBE. GBE treatment alone was not superior to placebo on improving sexual function. However, when combined with sex therapy GBE

treatment significantly increased sexual desire and contentment beyond placebo, being therefore, able to be used in the treatment of women with sexual dysfunctions (Meston *et al.*, 2008).

There are few studies currently regarding the hormonal and reproductive effects of GBE in human. Therefore, more clinical trials are necessary to determine the action of *Ginkgo biloba* extract on the organism.

Acknowledgements

This work was supported by REDE Mineira de Bioterismo – FAPEMIG, MG, Brazil and REDE Mineira de Farmacologia e Toxicologia – FAPEMIG, MG, Brazil.

References

- Ahlemeyer, B. and Krieglstein J. 2003. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract, *Cell Mol Life Sci* 60(9): 1779-1792.
- Al-Yahya, A. A., Al-Majed, A. A., Al-Bekairi, A. M., Al-Shabanah, O. A. and Qureshi, S. 2006. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of Ginkgo Biloba in Swiss albino mice, *J. Ethnopharmacol* 107(2): 222-228.
- Ashton, A. K., Ahrens, K., Gupta, S. and Masand, P. S. 2000. Antidepressant-induced sexual dysfunction and Ginkgo Biloba, *Am J. Psychiatry* 157(5): 836-837.
- Baron-Ruppert, G. and Luepke, N. P. 2001. Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen's egg test (HET), *Phytomedicine* 8(2): 133-138.
- Blumenthal, M. 2003. Ginkgo. In: *The ABC clinical guide to herbs*. Thieme, New York, USA pp.185-200.
- Bonevski, B., Wilson, A. and Henry, D. A. 2008. An analysis of news media coverage of complementary and alternative medicine, *PLoS ONE* 3(6): e2406.
- Breinholt, V., Hossaini, A., Svendsen, G. W., Brouwer, C. and Nielsen, E. 2000. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability, *Food Chem Toxicol* 38(7): 555-564.
- Calapai, G., Crupi, A., Firenzuoli, F., Marciano, M.C., Squadrito, F., Inferrera, G., Parisi, A., Rizzo, A., Crisafulli, C., Fiore, A. and Caputi, A.P. 2000. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis, *Life Sci* 67(22): 2673-2683.
- Chan, P.C., Xia, Q. and Fu, P.P. 2007. Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 25(3): 211-244.
- Chan, W.H. 2005. Ginkgolides induce apoptosis and decrease cell numbers in mouse blastocysts, *Biochem Biophys Res Commun* 338(2): 1263-1267.
- Chan, W.H. 2006. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts, *Hum Reprod* 21(11): 2985-2995.
- Chang, T.K., Chen, J. and Yeung, E.Y. 2006. Effect of Ginkgo biloba extract on procarcinogen-bioactivating human CYP1 enzymes: identification of isorhamnetin, kaempferol, and quercetin as potent inhibitors of CYP1B1, *Toxicol Appl Pharmacol* 213(1): 18-26.
- Defeudis, F.V., Papadopoulos, V. and Drieu, K. 2003. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy, *Fundam Clin Pharmacol* 17(4): 405-417.
- Diamond, B.J., Shiflett, S.C., Feiwei, N., Matheis, R.J., Noskin, O., Richards, J.A. and Schoenberger, N.E. 2000. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications, *Arch Phys Med Rehabil* 81(5): 668-678.

- Dias, M.C., Rodrigues, M.A., Reimberg, M.C. and Barbisan, L.F. 2008. Protective effects of Ginkgo biloba against rat liver carcinogenesis, *Chem Biol Interact* 173(1): 32-42.
- Ding, S., Dudley, E., Plummer, S., Tang, J., Newton, R.P. and Brenton, A.G. 2008. Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS, *Phytochemistry* 69(7): 1555-1564.
- Dubey, A.K., Shankar, P.R., Upadhyaya, D. and Deshpande, V.Y. 2004. Ginkgo biloba - an appraisal, *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2(3): 225-229.
- Dugoua, J.J., Mills, E., Perri, D. and Koren, G. 2006. Safety and efficacy of ginkgo (Ginkgo biloba) during pregnancy and lactation, *Can J Clin Pharmacol* 13(3): e277-284.
- Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M. and Kessler, R.C. 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey, *JAMA* 280(18): 1569-1575.
- Ernst, E. 2002. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava, *Ann Intern Med* 136(1): 42-53.
- Gaudineau, C., Beckerman, R., Welbourn, S. and Auclair, K. 2004. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the Ginkgo biloba extract, *Biochem Biophys Res Commun* 318(4): 1072-1078.
- Gold, E.B., Bair, Y., Zhang, G., Utts, J., Greendale, G.A., Upchurch, D., Chyu, L., Sternfeld, B. and Adler, S. 2007. Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN), *Menopause* 14(4): 612-623.
- Han, D.H., Denison, M.S., Tachibana, H. and Yamada, K. 2002. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids, *Biosci Biotechnol Biochem* 66(7): 1479-1487.
- Joos, S., Musselmann, B., Miksch, A., Rosemann, T. and Szecsenyi, J. 2008. The role of complementary and alternative medicine (CAM) in Germany - a focus group study of GPs, *BMC Health Serv Res* 8: 127.
- Kam, I.W., Dennehy, C.E. and Tsourounis, C. 2002. Dietary supplement use among menopausal women attending a San Francisco health conference, *Menopause* 9(1): 72-78.
- Kim, K.S., Rhee, K.H., Yoon, J.H., Lee, J.G., Lee, J.H. and Yoo, J.B. 2005. Ginkgo biloba extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells, *Oral Oncol* 41(4): 383-389.
- Kleijnen, J. and Knipschild, P. 1992. Ginkgo biloba, *Lancet* 340(8828): 1136-1139.
- Koch, E. 2005. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts, *Phytomedicine* 12(1-2): 10-16.
- Lee, E.Y., Park, W.I., Kim, E.K., Han, S.W., Kim, M.K. and Lee, H.J. 2000. Estrogenic effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761): changes of vaginal epithelium in ovariectomized mouse, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 52(2): 566.
- Li, M.W., Yudin, A.I., Vandevort, C.A., Sabeur, K., Primakoff, P. and Overstreet, J.W. 1997. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids, *Biol Reprod* 56(6): 1383-1389.
- Li, W., Trovero, F., Cordier, J., Wang, Y., Drieu, K. and Papadopoulos, V. 2003. Prenatal exposure of rats to Ginkgo biloba extract (EGb 761) increases neuronal survival/growth and alters gene expression in the developing fetal hippocampus, *Brain Res Dev Brain Res* 144(2): 169-180.
- Mahadevan, S. and Park, Y. 2008. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses, *J. Food Sci* 73(1): R14-19.
- Mahadevan, S., Park, Y. and Park, Y. 2008. Modulation of cholesterol metabolism by Ginkgo biloba L. nuts and their extract, *Food Res Intern* 41(1): 89-95.
- Mar, C. and Bent, S. 1999. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs, *West J. Med* 171(3): 168-171.

- Meston, C.M., Rellini, A.H. and Telch, M.J. 2008. Short- and Long-term Effects of Ginkgo Biloba Extract on Sexual Dysfunction in Women, *Arch Sex Behav* 37(4): 530-547.
- Naik, S.R. and Panda, V.S. 2008. Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome(R) in rifampicin induced liver injury in rats: Evidence of antioxidant activity, *Fitoterapia*.
- Nakanishi, K. 2005. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century, *Bioorg Med Chem* 13(17): 4987-5000.
- Oh, S.M. and Chung, K.H. 2004. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts, *Life Sci* 74(11): 1325-1335.
- Oh, S.M. and Chung, K.H. 2006. Antiestrogenic activities of Ginkgo biloba extracts, *J Steroid Biochem Mol Biol* 100(4-5): 167-176.
- Oh, S.M., Kim, H.R. and Chung, K. H. 2008. Effects of ginkgo biloba on in vitro osteoblast cells and ovariectomized rat osteoclast cells, *Arch Pharm Res* 31(2): 216-224.
- Ondrizek, R.R., Chan, P.J., Patton, W.C. and King, A. 1999a. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid, *Fertil Steril* 71(3): 517-522.
- Ondrizek, R.R., Chan, P.J., Patton, W.C. and King, A. 1999b. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine, *J Assist Reprod Genet* 16(2): 87-91.
- Paganelli, R.A., Benetoli, A. and Milani, H. 2006. Sustained neuroprotection and facilitation of behavioral recovery by the Ginkgo biloba extract, EGb 761, after transient forebrain ischemia in rats, *Behav Brain Res* 174(1): 70-77.
- Panda, V.S. and Naik, S.R. 2008. Cardioprotective activity of Ginkgo biloba Phytosomes in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats: A biochemical and histoarchitectural evaluation, *Exp Toxicol Pathol*.
- Paulus, W.E., Zhang, M., Strehler, E., Reeka, N. and Sterzik, K. 2002. Application of ginkgo biloba in assisted reproduction therapy, *Fertil Steril* 78(3): S124.
- Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K. and Culcasi, M. 1997. Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761), *J Mol Cell Cardiol* 29(2): 733-742.
- Pietta, P.G., Gardana, C. and Mauri, P.L. 1997. Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 693(1): 249-255.
- Pietta, P.G., Gardana, C., Mauri, P.L., Maffei-Facino, R. and Carini, M. 1995. Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginkgo biloba extract, *J Chromatogr B Biomed Appl* 673(1): 75-80.
- Pinto, R.M., Fernandes, E.S., Reis, J.E.P., Peters, V.M. and Guerra, M.O. 2007. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats, *Reprod Toxicol* 23(4): 480-485.
- Prouillet, C., Maziere, J.C., Maziere, C., Wattel, A., Brazier, M. and Kamel, S. 2004. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway, *Biochem Pharmacol* 67(7): 1307-1313.
- Rioufol, G., Pietri, S., Culcasi, M., Loufoua, J., Staat, P., Pop, C., Drieu, K. and Ovize, M. 2003. Ginkgo biloba extract EGb 761 attenuates myocardial stunning in the pig heart, *Basic Res Cardiol* 98(1): 59-68.
- Rodriguez, M., Ringstad, L., Schafer, P., Just, S., Hofer, H.W., Malmsten, M. and Siegel, G. 2007. Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by Ginkgo biloba (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients, *Atherosclerosis* 192(2): 438-444.
- Rowland, D.L. and Tai, W. 2003. A review of plant-derived and herbal approaches to the treatment of sexual dysfunctions, *J Sex Marital Ther* 29(3): 185-205.
- Sierpina, V.S., Wollschlaeger, B. and Blumenthal, M. 2003. Ginkgo biloba, *Am Fam Physician* 68(5): 923-926.
- Smith, J.V. and Luo, Y. 2004. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract, *Appl Microbiol Biotechnol* 64(4): 465-472.

- Stroheker, T., Chagnon, M.C., Pinnert, M.F., Berges, R. and Canivenc-Lavier, M.C. 2003. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study, *Reprod Toxicol* 17(4): 421-432.
- Takuma, K., Hoshina, Y., Arai, S., Himeno, Y., Matsuo, A., Funatsu, Y., Kitahara, Y., Ibi, D., Hayase, M., Kamei, H., Mizoguchi, H., Nagai, T., Koike, K., Inoue, M. and Yamada, K. 2007. Ginkgo biloba extract Egb 761 attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction resulting from chronic restraint stress in ovariectomized rats, *Neuroscience* 149(2): 256-262.
- Tesch, B.J. 2003. Herbs commonly used by women: an evidence-based review, *Am J Obstet Gynecol* 188(5 Suppl): S44-55.
- Trivedi, R., Kumar, S., Kumar, A., Siddiqui, J.A., Swarnkar, G., Gupta, V., Kendurker, A., Dwivedi A. K., Romero J. R. and Chattopadhyay N. 2008. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats, *Mol Cell Endocrinol*.
- Van Beek, T.A. 2002. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts, *J Chromatogr A* 967(1): 21-55.
- Van Beek, T.A. 2005. Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties, *Bioorg Med Chem* 13(17): 5001-5012.
- Waynberg, J. and Brewer, S. 2000. Effects of Herbal vX on libido and sexual activity in premenopausal and postmenopausal women, *Adv Ther* 17(5): 255-262.
- Welt, K., Weiss, J., Martin, R., Dettmer, D., Hermsdorf, T., Asayama, K., Meister, S. and Fitzl, G. 2004. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes und acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract, *Exp Toxicol Pathol* 55(5): 331-345.
- Who. 1999. Folium Ginkgo. In: WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva, Switzerland pp.154-167.
- Williams, B., Watanabe, C.M., Schultz, P.G., Rimbach, G. and Krucker, T. 2004. Age-related effects of Ginkgo biloba extract on synaptic plasticity and excitability, *Neurobiol Aging* 25(7): 955-962.
- Wu, Y., Li, S., Cui, W., Zu, X., Du, J. and Wang, F. 2008. Ginkgo biloba extract improves coronary blood flow in healthy elderly adults: role of endothelium-dependent vasodilation, *Phytomedicine* 15(3): 164-169.
- Xie, J., Ding, C., Ge, Q., Zhou, Z. and Zhi, X. 2008. Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of Ginkgo biloba extract in rats, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 864(1-2): 87-94.
- Xie, P., Chen, S., Liang, Y.Z., Wang, X., Tian, R. and Upton, R. 2006. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine, *J Chromatogr A* 1112(1-2): 171-180.
- Yao, Z.X., Han, Z., Drieu, K. and Papadopoulos, V. 2004. Ginkgo biloba extract (Egb 761) inhibits beta-amyloid production by lowering free cholesterol levels, *J. Nutr. Biochem.* 15(12): 749-756.
- Ye, B., Aponte, M., Dai, Y., Li, L., Ho, M.C., Vitonis, A., Edwards, D., Huang, T.N. and Cramer, D.W. 2007. Ginkgo biloba and ovarian cancer prevention: epidemiological and biological evidence, *Cancer Lett* 251(1): 43-52.
- Yeh, K.Y., Pu, H.F., Kaphle, K., Lin, S.F., Wu, L.S., Lin, J.H. and Tsai, Y.F. 2008. Ginkgo biloba extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats, *Horm Behav* 53(1): 225-231.
- Zhang, Y., Chen, A.Y., Li, M., Chen, C. and Yao, Q. 2008. Ginkgo biloba Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells, *Journal of Surgical Research*,
- Zhou, Z. and Zheng, S. 2003. The missing link in Ginkgo evolution, *Nature* 423(6942): 821-822.

B – Trabalho enviado para publicação

Effects of *Ginkgo biloba* Extract on the Embryo-Fetal Development in Wistar Rats

Eduardo Siqueira Fernandes, Rafael Moraes Pinto, João Evangelista de Paula Reis,
Martha de Oliveira Guerra, Vera Maria Peters*

Centro de Biologia da Reprodução, Federal University of Juiz de Fora,
Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora, MG, Brazil

Grant sponsor: FAPEMIG - REDE 173/08

Running title: *Ginkgo biloba* in embryo-fetal development

**Correspondence to:* Vera Maria Peters, PhD, Centro de Biologia da Reprodução, Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora, MG, Brazil.

E-mail: peters.vera@ufjf.edu.br

ABSTRACT

BACKGROUND: *Ginkgo biloba* extract (GBE) is an herbal medicine used for treating neurodegenerative diseases, cerebrovascular insufficiency, peripheral arterial occlusive disease, and also vestibular disturbance. Some components of GBE have presented estrogenic effects and, in a previous study, high dosages of GBE caused intra-uterine growth retardation in fetuses of Wistar rats treated during the fetogenesis period. **METHODS:** Pregnant Wistar rats were treated, through gavage, with different dosages of aqueous GBE (3.5, 7.0 and 14.0 mg/Kg/day), during the tubal transit and implantation period. Rats were killed on the 15th day of pregnancy and the following parameters were evaluated: clinical symptoms of maternal toxicity; maternal body weight; feed and water intake; maternal liver, kidney and ovary weights; number of corpora lutea; implants per group ratio; pre- and post-implantation loss per group ratio; live fetuses mean; dead fetuses percentage; fetus and placenta weight per offspring ratio; and fetal external malformation. **RESULTS:** No significant alteration was found for both the maternal and embryonic parameters evaluated. **CONCLUSIONS:** The GBE treatment in Wistar rats, during the tubal transit and implantation period, caused no toxic effect on the maternal organism and did not induce embryonic death, growth retardation and/or fetal malformations.

Keywords: *Ginkgo biloba*, embryogenesis, implantation, development, rats, pregnant.

INTRODUCTION

Ginkgo biloba, the only representative of the Ginkgoaceae family, is a plant traditionally used as both food and medicine by the eastern cultures (Bilia, 2002). The herbal medicine produced from *G. biloba* is a standard formula (GBE 761) in which the following active components can be found: ginkgolides A, B and C; bilobalides (Xie et al., 2008); alkylphenols and flavonoids, such as quercetin, kaempferol, isorhammetine and proanthocyanidins (Dugoua et al., 2006; Jacobs and Browner, 2000; Segura et al., 2000). In its final constitution, GBE 761 has 22 to 27% flavonoid glycosides, 5 to 7% terpene lactones, and < 5 ppm ginkgolic acid (Jacobs and Browner, 2000; Segura et al., 2000; Smith and Luo, 2004).

Because of the anti-inflammatory (McKenna et al., 2001), anti-oxidant (Masteikova et al., 2007; Welt et al., 2007) and platelet anti-aggregating (Carlson et al., 2007; Koch, 2005) properties of its constituents, GBE is usually used in the treatment for neurodegenerative diseases (Arnold, 2003; Chevront and Carter, 2003; Doraiswamy and Pomara, 2003; Longpre et al., 2006; Luo et al., 2002; Nathan et al., 2003; Ramassamy et al., 2007; Smith et al., 2007; Wheatley, 2003; Wu et al., 2006), cerebrovascular insufficiency, peripheral arterial occlusive disease (Blumenthal et al., 2003; Sierpina et al., 2003; Smith and Luo, 2004), and also vestibular disturbance (Patterson and Balough, 2006).

Due to the fact that it is one of the top selling herbal medicines in the world (Di Stasi et al., 2002; Eisenberg et al., 1998; Mar and Bent, 1999; Tesch, 2003), several studies, both *in vitro* and *in vivo*, have been carried out in order to assess the effects of GBE on the sexual behavior and reproduction of mammals. According to these studies, GBE would help in male erectile dysfunction because of its relaxing effect on the corpus cavernosum (Paick and Lee, 1996), besides being an adjuvant to the usage of anti-depressives which inhibit the serotonin

receptors (Ashton et al., 2000; Cohen and Bartlik, 1998) in the alternative treatment for secondary sexual dysfunction. GBE was able to enhance, in Leydig cell cultures, the production of testosterone, and, *in vivo*, improved the sexual performance of young rats, by reducing serum prolactin (Yeh et al., 2007).

In which regards the effects of GBE on reproduction, it was demonstrated, *in vitro*, that high dosages of GBE led to degeneration of the oocyte and reduction of sperm viability in both hamsters (Ondrizek et al., 1999a) and humans (Ondrizek et al., 1999b), inhibiting the fertilization process. There are few experiments performed during the lactation period (Dugoua et al., 2006), however, a study with rats focusing on the maternal behavior during lactation has not demonstrated toxic effects on the maternal organism (Faria et al., 2006).

Previously it was observed that GBE, in the dosages of 7 and 14 mg/Kg/day, reduced fetal body weight when administered to the animals during fetogenesis and organogenesis (Pinto et al., 2007), probably because of its estrogenic (Oh and Chung, 2004), anti-estrogenic (Oh and Chung, 2006) and embryo-toxic (Chan, 2005; 2006; Ondrizek et al., 1999a) effects, proven *in vitro*. Other studies showed that some constituents of GBE, tested separately, caused deleterious effects on the DNA of mice (Chan, 2005; 2006; Spinks and O'Neill, 1988) and rat (Acker et al., 1988) embryos, affecting the fertilization and implantation processes. However, no studies with GBE have been carried out during the beginning of pregnancy, when humoral and hormonal imbalance, as well as the action of some drugs, may affect zygote and early embryo transport.

Hence, this study was designed in order to verify, *in vivo*, whether GBE affects embryonic development when administered to pregnant rats during the one-cell-to-blastocyst period, which comprehends the phases of tubal transit and implantation.

MATERIALS AND METHODS

The methods used in this study were submitted to and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation, of Federal University of Juiz de Fora, MG, Brazil, under the protocol number 54/2003-CEEA, following the international ethic principles for animal experimentation. The experimental design comprises part of the ICH protocol for the analysis of embryonic development – stage B (Christian, 2001; ICH, 2005).

Experimental model

Sixty-eight three-month-old nulliparous Wistar rats weighting from 160 to 180g were used in this study. All of them were obtained from the vivarium of the Centro de Biologia da Reprodução of the Federal University of Juiz de Fora, MG, Brazil. The male rats were previously mated to attested fertility. The presence of spermatozoa in the vaginal smear indicated the first day after mating. Pregnant females were individually housed in clear plastic cages with pinewood shavings as bedding and kept in an animal room with controlled temperature ($21^{\circ}\text{C}\pm 2$) and a 12-h light/12-h dark cycle. The animals were given 25g of pelletized feed and 100mL of filtered water daily.

Preparation and dosage of Ginkgo biloba extract

The aqueous *Ginkgo biloba* extracts (Origin: China – lot nº 820146) were prepared and kindly provided by JR Pharma. The quality control obtained by the Galena Labs (SN-GB-032070214) confirmed the following composition for the extract: 28.2% flavonoid glycosides; 8.3% terpene lactones; 15% quercetin; 10.9% kaempferol; 2.3% isorhamnetin;

and less than 5 ppm (0.81%) of ginkgolic acids. Those concentrations are similar to those found in the standardized extract GBE 761 (Blumenthal et al., 2003; Diamond et al., 2000; Jacobs and Browner, 2000; Kleijnen and Knipschild, 1992; Sierpina et al., 2003; Smith and Luo, 2004; WHO, 1999).

The GBE dosages were prepared according to the higher therapeutic dose recommended for disease treatments in humans; 240mg/day (Blumenthal et al., 2003; Diamond et al., 2000; Jacobs and Browner, 2000; Sierpina et al., 2003; Smith and Luo, 2004), which corresponds to a dosage of 3.5 mg/Kg/day for a human weighing 70 Kg. The doses of GBE were administrated once a day in 1mL of aqueous solution, through gavage, from the 1st to the 8th day of pregnancy, in the concentrations of 3.5, 7.0 and 14.0 mg/kg/day.

a. Experimental groups

Animals were randomly distributed into four experimental groups of 17 animals each: control (*G. biloba* 0 mg/kg/day), Gb 3.5 (*G. biloba* 3.5 mg/kg/day), Gb 7 (*G. biloba* 7 mg/kg/day) and Gb 14 (*G. biloba* 14 mg/kg/day).

b. Experimental Protocol

At first, in order to evaluate the GBE toxicity on the maternal organism, the pregnant rats were observed during a 60-minute period after being treated with this substance. This procedure aimed at identifying clinical symptoms of toxicity, such as: piloerection, behavioral alterations (hyper- or hypoactivity, head flicking), chromodacryorrhea, vaginal bleeding, tremors, convulsion, diarrhea and death. The animals were observed in order to monitor

clinical signals of toxicity: feed and water intake alterations, once a day, and body weight gain or loss, assessed every two days (Christian, 2001; Hood and Miller, 2006).

The pregnant rats were euthanized after total exsanguination under anesthesia (90mg/Kg ketamine + 10mg/Kg xylazine, IP) and autopsied on the 15th day of pregnancy. During the autopsy, animals which did not present visual evidence for either early or late resorption, as well as those presenting no live or dead fetuses, were considered non-pregnant and removed from the study. For the other animals, the maternal reproductive tract, liver and kidneys were removed through laparotomy. The uterine horns were sectioned longitudinally and the resorpted, live and dead fetuses were counted. The number of live fetuses, the total number of corpora lutea, the number of resorptions and the number of implants were determined for the calculation of (i) the implant per group ratio (number of implants / number of corpora lutea) x 100; the (ii) pre-implantation losses per group (100 – implantation rate), and (iii) the postimplantation loss per group [(number of resorptions + number of dead fetuses) / number of implants] x 100 (Parker, 2006). Ovaries, liver and kidneys were weighted.

The fetuses were observed under the stereoscopic microscope for malformation analysis through the examination of both superior and inferior members, neural tube closure and face morphology.

c. Statistical analysis

The data obtained were processed through variance analysis (ANOVA), followed by the Dunnett test, in those cases in which samples were normal and homocedastic. For the data without homoscedastic samples and normal distribution, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used, followed by the Mann-Whitney test. Chi-Square test was used for the analysis

of the implantation per group rate and of the pre- and post-implantation loss per group rate.

The significance level was $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Amongst the 68 rats used in this experiment, four (5.88%) were not pregnant by the moment of the autopsy: one (5.88%) from the Control group, two (11.76%) from the Gb 3.5 group, and one (5.88%) from the Gb 14 group ($p>0.05$).

No clinical symptoms for maternal toxicity – head flicking, hyper- or hypoactivity, piloerection, chromodacryorrhea, vaginal bleeding, diarrhea, tremors, convulsions or deaths – were observed in any of the experimental groups studied. Moreover, the estimated feed and water intake did not present significant differences among the control and treated groups (Figure 1). Also, there was no significant weight gain or loss during the experiment (Figure 2). Table 1 presents the data concerning body weight gain; absolute and relative weight of maternal liver, kidneys and ovaries; number of corpora lutea, implants per group ratio; and pre- and post-implantation loss per group ratio. No significant alteration was found for these variables ($p>0.05$).

Table 2 summarizes the number of live and dead fetuses, average fetal weight/offspring and average placenta weight/offspring. No significant difference was found for any of the values observed ($p>0.05$).

No external malformation was detected during the macroscopic analysis of the fetuses.

DISCUSSION

The absence of signals of maternal toxicity is important because adverse fetal effects during embryonic development can be related to either transitory or permanent alterations in maternal physiology (Khera, 1987), even if such correlation is not mandatory (Chahoud et al., 1999; Hood and Miller, 2006), or even if fetal malformations are not *a priori* caused by the presence of maternal toxicity (Holson et al., 2006).

Ginkgo biloba extract carries some cytotoxic, mutagenic and allergenic substances, such as ginkgolic acids and alkylphenols, which could cause maternal toxicity (Baron-Ruppert and Luepke, 2001; Hecker et al., 2002). Maternal toxicity includes clinical signs, behavioral changes, or reduction in the weight gain during pregnancy (Chernoff et al., 2008). Such alterations are observed through the body weight changes during pregnancy, changes in the feed and water intake, hyper- or hypoactivity of the rat in the cage, piloerection, stereotypy (paw licking, muzzle itching and tail biting), chromodacryorrhea, vaginal bleeding, diuresis increase, diarrhea and death (Christian, 2001; Hood and Miller, 2006). The weight of the organs tends to follow the total weight of the body, when there is no pathology in action. In this paper, the maternal organs weight were statistically similar, also, no clinical signs of maternal toxicity were observed, even when GBE dosages were twice or four times the therapeutic dosage.

Terpenic fractions together with flavonoids are the main constituents of GBE presenting pharmacological properties. Terpenoids in GBE include bilobalides and ginkgolides. Ginkgolides A, B and C are powerful and specific antagonists of the platelet activation factor (Xie et al., 2008). The platelet aggregation factor (PAF) is a phospholipid found in several mammalian tissues, including male and female reproductive tissues, which has an important role in the normal female physiologic mechanism, including follicular ovarian development,

reproductive cycle, embryo implantation and pregnancy. PAF levels may act as markers for the embryo viability (Kordan et al., 2003) and the administration of antagonists to this factor, in the first days of pregnancy, can significantly reduce the embryo implantation rates in mice (Spinks and O'Neill, 1988) and rats (Acker et al., 1988). When females treated during the pre-implantation period present significant increase in both pre- and post-implantation losses and alterations in the implantation rate, it can be taken as a signal of adverse effects to gamete transport, fertilization, zygote, blastula and/or of interferences in the implantation process (Parker, 2006). The curve dose-response leads to the higher dosage tested; thus, the more the dosage raises, the more adverse or benefic effects can be observed – though there are some cases where an inadequate dose of a compound is harmful, a higher dosage is beneficial and a still higher dose is again harmful (Hood and Miller, 2006). However, the results found suggest there was no significant alteration in the embryo viability markers – implants ratio and pre- and post-implantation loss per group ratio. These results suggest that, in spite of the antagonism between ginkgolides A, B and C and PAF receptors, the former do not lead to alterations in the tubal transport of gametes and embryos and in embryonic implantation.

Chan (2006) demonstrated, through *in vitro* and *in vivo* studies, that the ginkgolide B fraction of GBE induced a raise in apoptosis of embryonic stem cells because they generate free radicals, leading to embryonic DNA damage (Skibola and Smith, 2000), c-Jun protein phosphorylation and loss of mitochondrial membrane potential (Chan, 2006), with consequent raise in the number of embryonic resorptions. Similarly to ginkgolide B, ginkgolide A also showed, *in vitro*, capability to reduce the viability of mammal blastocytes, by inducing apoptosis of the inner cell mass (Chan, 2005), which points to evidence of possible GBE teratogenicity. Mitochondrial damage and free radicals formation, with potential damage to embryo development and consequent induction to fetal mutations and/or malformations, as well as fetal weight reduction, are also effects related to quercetin (Skibola and Smith, 2000),

a flavonoid found in great amount in GBE (van Beek, 2002; WHO, 1999). Other constituents of GBE, such as the ginkgolic acid and the alkylphenols (Tesch, 2003), also presented high embryonic lethality in a study with hen eggs (Baron-Ruppert and Luepke, 2001). In this work, however, no significant differences in the number of resorptions or in the body weight of the fetuses were found, as well as no deaths or even external malformations in the 15-day-old fetuses from treated pregnant rats were observed.

There are still no reliable data regarding which concentrations of GBE would be safe and also regarding which would be the effects of the prolonged intake of flavonoids and other constituents of GBE (Skibola and Smith, 2000). Some studies have demonstrated several benefits of the constituents of this extract (Kinjo et al., 2006); others, however, point to mutagenic and cytotoxic effects of these same constituents (Chan, 2005; 2006; Hecker et al., 2002). Toxicology studies use the higher possible dosage of the drug being tested for maternal-fetal toxicity as long as it does not lead to severe suffering or death of the experimental model, when administered during all of the pregnancy period or part of it (Chernoff et al., 2008). Such dosages, in reproductive toxicology studies, reach the order of 10 times the habitual dosage for humans (OECD, 2001). In a previous study it was observed that GBE induced retardation in intra-uterine growth, in dosages twice and four times (7 and 14 mg/Kg/day) the therapeutic dosage indicated to humans, when administered to the animals during fetogenesis and organogenesis (Pinto et al., 2007). The present work investigated whether a similar effect would be found if GBE was administered in the same dosages, however, during a different embryonic development period: the tubal transit of gametes and embryos / implantation period.

Data found in this research indicate that, despite the fact that several harmful effects of isolated components of *Ginkgo biloba* have been demonstrated (Baron-Ruppert and Luepke, 2001; Chan, 2005; 2006; Hecker et al., 2002; Skibola and Smith, 2000; Spinks and O'Neill,

1988), GBE seems not to cause embryo deaths, growth retardation and/or malformations, when administered to Wistar rats in the first phases of embryonic development, in the dosages of 3.5, 7.0 and 14 mg/Kg of body weight.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by PROBIC/FAPEMIG/UFJF and Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Terapêuticos/FAPEMIG, Brazil. The authors are grateful to Tiago Timponi Torrent for the English version.

LITERATURE CITED

- Acker G, Hecquet F, Etienne A, Braquet P, Mencia-Huerta JM. 1988. Role of platelet-activating factor (PAF) in the oviimplantation in the rat: effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021. *Prostaglandins* 35(2):233-241.
- Arnold KR. 2003. Ginkgo and memory. *JAMA* 289(5):546; author reply 547-548.
- Ashton AK, Ahrens K, Gupta S, Masand PS. 2000. Antidepressant-induced sexual dysfunction and Ginkgo Biloba. *Am J Psychiatry* 157(5):836-837.
- Baron-Ruppert G, Luepke NP. 2001. Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen's egg test (HET). *Phytomedicine* 8(2):133-138.
- Bilia AR. 2002. Ginkgo biloba L. *Fitoterapia* 73(3):276-279.
- Blumenthal M, Brinckmann J, Wollschlaeger B. 2003. *The ABC clinical guide to herbs*. New York: Thieme.
- Carlson JJ, Farquhar JW, DiNucci E, Ausserer L, Zehnder J, Miller D, Berra K, Hagerty L, Haskell WL. 2007. Safety and efficacy of a ginkgo biloba-containing dietary supplement on cognitive function, quality of life, and platelet function in healthy, cognitively intact older adults. *J Am Diet Assoc* 107(3):422-432.
- Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS. 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 13(5):375-381.
- Chan WH. 2005. Ginkgolides induce apoptosis and decrease cell numbers in mouse blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 338(2):1263-1267.
- Chan WH. 2006. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts. *Hum Reprod* 21(11):2985-2995.
- Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. 2008. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the "no observed adverse effect level". *Reprod Toxicol* 25(2):192-202.
- Cheuvront SN, Carter R, 3rd. 2003. Ginkgo and memory. *JAMA* 289(5):547; author reply 547-548.
- Christian MS. 2001. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press. p 1301-1381.
- Cohen AJ, Bartlik B. 1998. Ginkgo biloba for antidepressant-induced sexual dysfunction. *J Sex Marital Ther* 24(2):139-143.
- Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tiena OS, Hakinami SH, Reis MS. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73:69-91.
- Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. 2000. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* 81(5):668-678.
- Doraiswamy PM, Pomara N. 2003. Ginkgo and memory. *JAMA* 289(5):547; author reply 547-548.
- Dugoua JJ, Mills E, Perri D, Koren G. 2006. Safety and efficacy of ginkgo (Ginkgo biloba) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 13(3):e277-284.
- Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC. 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA* 280(18):1569-1575.

- Faria DE, Reis JEdP, Ribeiro LC, Peters VM, Guerra MdO. 2006. Comportamento de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) expostas ao extrato de *Ginkgo biloba* durante a lactação. *Revista Brasileira de Zootecias* 8(2):91-98.
- Hecker H, Johannisson R, Koch E, Siegers CP. 2002. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. *Toxicology* 177(2-3):167-177.
- Holson JF, Nemec MD, Stump DG, Kaufman LE, Lindström P, Varsho BJ. 2006. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study finding. In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2nd ed. Londres: Taylor & Francis. p 329-424.
- Hood RD, Miller DB. 2006. Maternally mediated effects on development. In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2^a ed. Londres: Taylor & Francis. p 93-124.
- ICH. 2005. ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). ICH Harmonized Tripartite Guideline S5 (R2): detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility.
- Jacobs BP, Browner WS. 2000. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *Am J Med* 108(4):341-342.
- Khera KS. 1987. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders--a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. *Crit Rev Toxicol* 17(4):345-375.
- Kinjo J, Hitoshi M, Tsuchihashi R, Korematsu Y, Miyakoshi M, Murakami T, Niiho D, Mizutani K, Tanaka T, Nonaka G, Nohara T, Okawa M, Okabe H. 2006. Hepatoprotective constituents in plants 15: protective effects of natural-occurring flavonoids and miscellaneous phenolic compounds as determined in an HepG2 cell cytotoxicity assay. *J Nat Med* 60:36-41.
- Kleijnen J, Knipschild P. 1992. *Ginkgo biloba*. *Lancet* 340(8828):1136-1139.
- Koch E. 2005. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of *Ginkgo biloba* extracts. *Phytomedicine* 12(1-2):10-16.
- Kordan W, Strzezek J, Fraser L. 2003. Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review. *Pol J Vet Sci* 6(1):55-60.
- Longpre F, Garneau P, Christen Y, Ramassamy C. 2006. Protection by GBE 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. *Free Radic Biol Med* 41(12):1781-1794.
- Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, Khan I, Netzer WJ, Xu H, Butko P. 2002. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract GBE761. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19):12197-12202.
- Mar C, Bent S. 1999. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. *West J Med* 171(3):168-171.
- Masteikova R, Muselik J, Bernatoniene J, Bernatoniene R. 2007. Antioxidative activity of *Ginkgo*, *Echinacea*, and *Ginseng* tinctures. *Medicina (Kaunas)* 43(4):306-309.
- McKenna DJ, Jones K, Hughes K. 2001. Efficacy, safety, and use of *ginkgo biloba* in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* 7(5):70-86, 88-90.
- Nathan PJ, Harrison BJ, Bartholomeusz C. 2003. *Ginkgo* and memory. *JAMA* 289(5):546; author reply 547-548.
- OECD. 2001. Guideline for the testing of chemicals—no. 414: prenatal developmental toxicity study. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development.
- Oh SM, Chung KH. 2004. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Life Sci* 74(11):1325-1335.

- Oh SM, Chung KH. 2006. Antiestrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100(4-5):167-176.
- Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. 1999a. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 71(3):517-522.
- Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. 1999b. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. *J Assist Reprod Genet* 16(2):87-91.
- Paick JS, Lee JH. 1996. An experimental study of the effect of ginkgo biloba extract on the human and rabbit corpus cavernosum tissue. *J Urol* 156(5):1876-1880.
- Parker RM. 2006. Testing for reproductive toxicity. In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2nd ed. Londres: Taylor and Francis. p 525-587.
- Patterson MB, Balough BJ. 2006. Review of pharmacological therapy for tinnitus. *Int Tinnitus J* 12(2):149-159.
- Pinto RM, Fernandes ES, Reis JE, Peters VM, Guerra Mde O. 2007. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reprod Toxicol* 23(4):480-485.
- Ramassamy C, Longpre F, Christen Y. 2007. Ginkgo biloba extract (GBE 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? *Curr Alzheimer Res* 4(3):253-262.
- Segura MAM, Delgado SB, Torres RG. 2000. Aplicaciones clínicas del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba*. *Revista de Fitoterapia* 1(2):95-105.
- Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M. 2003. Ginkgo biloba. *Am Fam Physician* 68(5):923-926.
- Skibola CF, Smith MT. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 29(3-4):375-383.
- Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. 2007. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1768(8):1976-1990.
- Smith JV, Luo Y. 2004. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(4):465-472.
- Spinks NR, O'Neill C. 1988. Antagonists of embryo-derived platelet-activating factor prevent implantation of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 84(1):89-98.
- Tesch BJ. 2003. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. *Am J Obstet Gynecol* 188(5 Suppl):S44-55.
- van Beek TA. 2002. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *J Chromatogr A* 967(1):21-55.
- Welt K, Weiss J, Martin R, Hermsdorf T, Drews S, Fitzl G. 2007. Ginkgo biloba extract protects rat kidney from diabetic and hypoxic damage. *Phytomedicine* 14(2-3):196-203.
- Wheatley D. 2003. Ginkgo and memory. *JAMA* 289(5):546-547; author reply 547-548.
- WHO. 1999. Folium Ginkgo. In: WHO, editor. *WHO monographs on selected medicinal plants*. Geneva: World Health Organization. p 154-167.
- Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, Link CD, Luo Y. 2006. Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract GBE 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26(50):13102-13113.
- Xie J, Ding C, Ge Q, Zhou Z, Zhi X. 2008. Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of Ginkgo biloba extract in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 864(1-2):87-94.

Yeh KY, Pu HF, Kaphle K, Lin SF, Wu LS, Lin JH, Tsai YF. 2007. Ginkgo biloba extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats. *Horm Behav.*

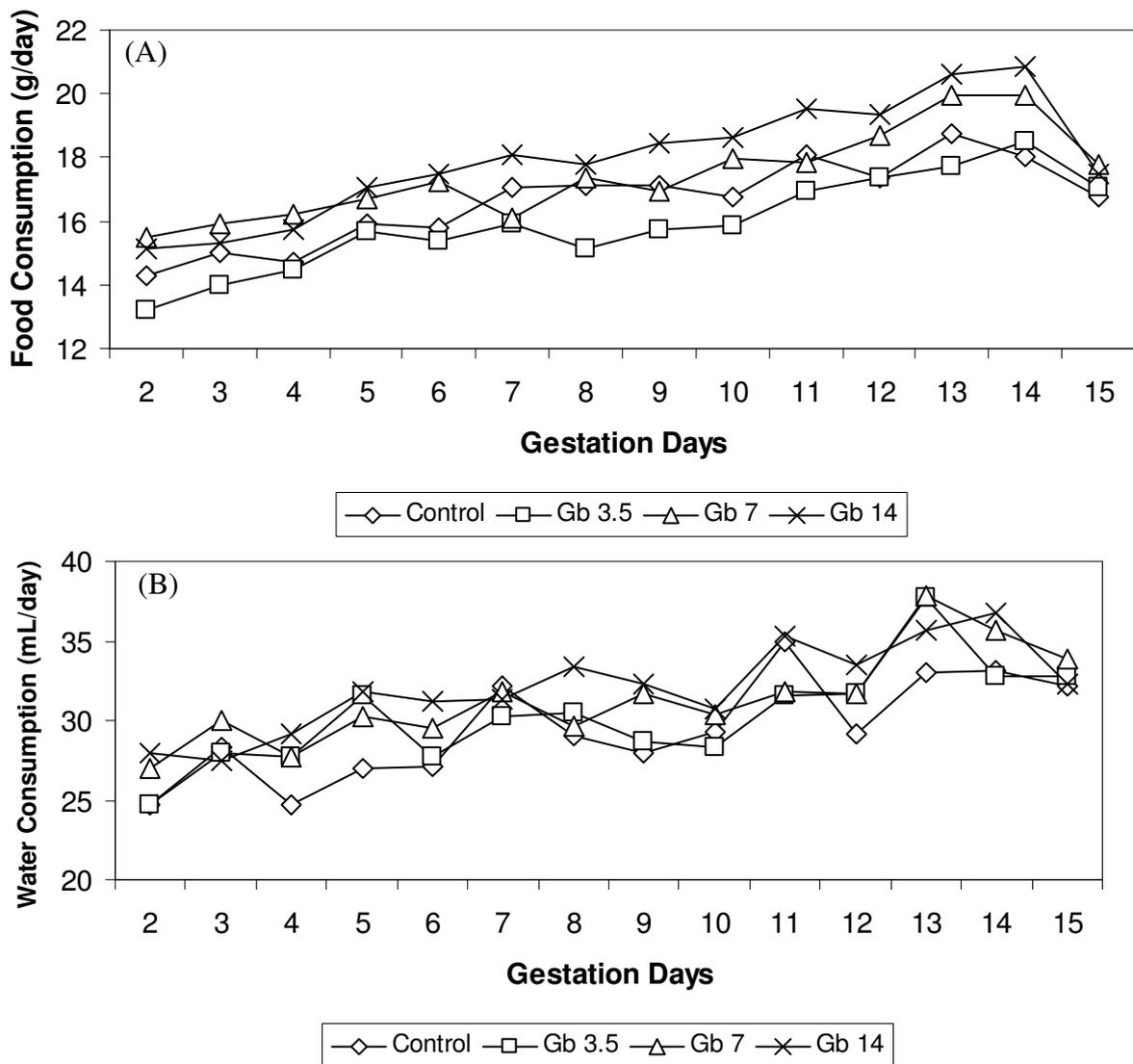


Figure 1. Food (A) and water (B) consumption by pregnant Wistar rats treated with extract of *Ginkgo biloba* in the concentrations of zero (Control), 3.5 mg/Kg/day (Gb 3.5), 7 mg/Kg/day (Gb 7) and 14 mg/Kg/day (Gb 14). Results show the daily average consumption, from the second to the 15th day of pregnancy. $p > 0.05$.

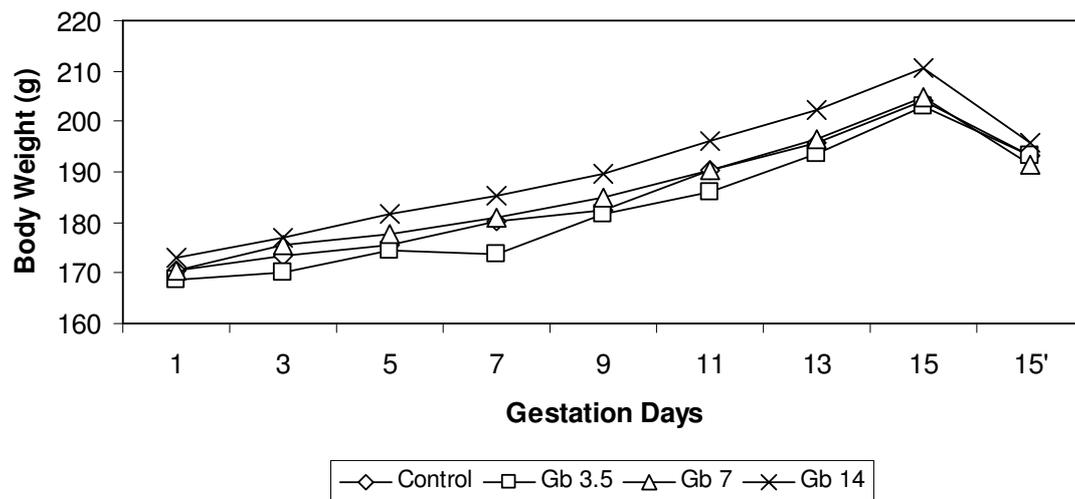


Figure 2. Maternal body weight of pregnant Wistar rats treated with extract of *Ginkgo biloba* in the concentrations of zero (Control), 3.5 mg/Kg/day (Gb 3.5), 7 mg/Kg/day (Gb 7) and 14 mg/Kg/day (Gb 14). 15': maternal body weight obtained after the removal of the female reproductive tract. $p > 0.05$.

Table 1. Maternal toxicity variables after treatment with extract of *Ginkgo biloba* in Wistar rats, from the first to the 8th day of pregnancy, in the concentrations of zero, 3.5, 7.0 and 14.0 mg/Kg/day.

Maternal Variables	Experimental Groups			
	Control (16)	Gb 3.5 (15)	Gb 7 (17)	Gb 14 (16)
Body weight gain (g) Days 1-15	22.75 ± 6.37	24.65 ± 5.62	20.84 ± 4.53	22.93 ± 8.59
Liver – <i>absolute weight (g)</i> <i>relative weight</i>	8.44 ± 0.51 4.37 ± 0.23	8.56 ± 0.87 4.43 ± 0.35	8.68 ± 0.62 4.53 ± 0.26	8.56 ± 0.73 4.37 ± 0.25
Kidneys – <i>absolute weight (g)</i> <i>relative weight</i>	1.33 ± 0.12 0.69 ± 0.07	1.35 ± 0.11 0.70 ± 0.05	1.33 ± 0.09 0.69 ± 0.04	1.37 ± 0.12 0.70 ± 0.04
Ovaries weight (mg)	55.43 ± 6.17	58.14 ± 8.79	58.10 ± 7.11	55.37 ± 10.20
Number of corpora lutea	11.44 ± 0.73	11.00 ± 1.41	11.76 ± 1.30	12.07 ± 1.03
Implantation/group (%)	90.12 [155/172]	80.09 [147/165]	94.50 [189/200]	88.69 [149/168]
Pre-implantation loss/group (%)	9.88	19.91	5.50	11.31
Post-implantation loss/group (%)	11.61 [18/155]	13.61 [20/147]	6.34 [12/189]	13.42 [20/149]

Results shown in average ± standard deviation. (N). p>0.05.

Table 2. Fetal variables after treatment with extract of *Ginkgo biloba* in Wistar rats, from the first to the 8th day of pregnancy, in the concentrations of zero, 3.5, 7.0 and 14.0 mg/Kg/day.

Fetal Variables	Experimental Groups		
	Control	Gb 3.5	Gb 7
Live fetuses	10.00 ± 1.57 (14)	9.27 ± 2.09 (15)	10.41 ± 1.66 (17)
Dead fetuses (%)	0.68 (14)	2.11 (15)	0 (17)
Fetuses weight/offspring (mg)	152.66 ± 9.55 (15)	148.45 ± 9.01 (15)	157.80 ± 11.01 (17)
Placental weight/offspring (mg)	137.61 ± 13.85 (15)	134.87 ± 12.18 (15)	132.91 ± 13.86 (17)
			Gb 14
			10.00 ± 2.22 (14)
			0 (14)
			160.93 ± 14.47 (15)
			138.40 ± 19.30 (15)

Results shown in average ± standard deviation. (N). p > 0.05.

C – Trabalho em fase de conclusão

Toxicidade do extrato de *Ginkgo biloba* sobre ratas Wistar prenhes:

Avaliação hematológica e bioquímica

*Eduardo Siqueira Fernandes, Andréa de Souza Silva, Rafael Moraes Pinto,
João Evangelista de Paula Reis, Martha de Oliveira Guerra, Vera Maria Peters*

Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora,
Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora, MG, Brazil

RESUMO

INTRODUÇÃO: O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é um fitoterápico usado no tratamento de doenças neurodegenerativas que tem tido recentemente as ações nefro e hepatoprotetoras de seus constituintes estudadas. **MATERIAL E MÉTODOS:** Cento e vinte ratas Wistar prenhes foram distribuídas em dois grupos experimentais, Gb₁₅ e Gb₂₁, tratadas, respectivamente do 1^o ao 8^o e do 8^o ao 20^o dia de prenhez, com diferentes concentrações do EGb: zero, 3.5, 7 e 14mg/Kg de peso corporal/dia. Os animais foram eutanasiados, respectivamente, no 15^o e no 21^o dia de prenhez respectivamente por exsanguinação total sob anestesia. O sangue retirado foi processado para avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos: eritrograma, leucograma, dosagens séricas de uréia, creatinina, ALT, AST, colesterol e triglicérides. **RESULTADOS:** Não foram encontradas alterações significativas no padrão hematológico de ratas tratadas dos grupos Gb₁₅ e Gb₂₁. Em relação ao perfil bioquímico, houve aumento do nível de colesterol e decréscimo dos níveis de ALT, uréia e creatinina nos animais tratados Gb₁₅ com 7 e 14mg/Kg/dia do extrato de *Ginkgo biloba*. No grupo Gb₂₁, os níveis de ALT e creatinina foram significativamente menores e os de uréia superiores quando comparados ao grupo controle, nos animais dos grupos tratados com EGb 7 e 14mg/Kg/dia. **CONCLUSÃO:** Os resultados apontados sugerem que o EGb poderia agir de forma hepatoprotetora e nefroprotetora quando administrado a ratas Wistar durante o período de prenhez quando usado nas doses 7 e 14 mg/Kg/dia. De forma geral, não há efeito tóxico do EGb que poderia resultar em alteração relevante sobre o perfil hematológico e bioquímico do organismo materno.

Palavras-chave: *Ginkgo biloba*, ratas, gestação, desenvolvimento embriofetal, hematologia, bioquímica.

INTRODUÇÃO

Ginkgo biloba, única representante da família Ginkgoaceae, é uma planta de origem chinesa usada tradicionalmente como alimento e medicamento nas culturas orientais [1]. O extrato produzido a base de *G. biloba* é um preparado padronizado (EGb 761), cujos principais componentes ativos são os ginkgolídeos A e B, bilobalídeos, alquifonóis e flavonóides, como a quercetina e o kaempferol [2-4]. A constituição final do extrato consiste em 22 a 27% de glicoflavonóides, 5 a 7% de terpenas lactonas e < 5 ppm ácido gíngkólico [2, 3, 5].

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é largamente usado no tratamento de doenças neurodegenerativas, na insuficiência vascular cerebral, na doença vascular periférica e em distúrbios vestibulares [6-15]. Essas ações se devem principalmente às propriedades anti-inflamatória [16], regulando a permeabilidade capilar, ao inibir a bradicinina e a histamina [17]; ação antioxidante [18, 19], por diminuir o nível de espécies reativas de oxigênio [16] e atenuar a peroxidação lipídica da membrana celular [20], e potente ação antiagregante plaquetária [21, 22], ao antagonizar os receptores do fator de agregação plaquetária [23].

Diversos trabalhos têm demonstrado efeitos nefroprotetores e hepatoprotetores do extrato de *Ginkgo biloba*. Em ratos hipertensos, o EGb possui ação anti-hipertensiva [24-26] produzindo vasodilatação ao aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular [26] e causando efeito bradicárdico por influenciar o ritmo circadiano [25]. Devido à sua ação antioxidante, o EGb reduz a nefrotoxicidade induzida pela vancomicina [27]. Além disso, tratamento com EGb em ratos diabéticos sugere alta eficácia do extrato na prevenção da nefropatia diabética [19, 28].

Estudo recente [29] comprovou, *in vitro*, elevada eficácia hepatoprotetora de constituintes flavonóides do EGb, exibindo efeito antifibrótico [30] e reduzindo necrose e atrofia hepática induzida por drogas, como o tetracloreto de carbono [31] e álcool [32, 33].

Apesar da grande variedade de produtos sintéticos disponíveis para o tratamento de doenças, o uso de fitofármacos tem sido cada vez mais difundido entre a população [34-37]. Por ser um medicamento de venda livre (*over the counter*), gestantes podem fazer uso de *Ginkgo biloba* por automedicação, visto que existe uma crença da inocuidade de produtos fitoterápicos. O aumento crescente do consumo desses fitofármacos, inclusive entre as gestantes [4, 38], tem motivado a realização de vários estudos [39-45] sobre o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* no organismo materno e sua implicação no desenvolvimento embriofetal.

O presente trabalho foi elaborado com o intuito de fazer uma análise bioquímica e hematológica de ratas Wistar prenhes, tratadas com extrato de *Ginkgo biloba*, durante os períodos de embriogênese, organogênese e fetogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo experimental

Cento e vinte ratas Wistar, adultas [60 a 90 dias], nulíparas, com peso variando entre 160 e 180g, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF, Juiz de Fora, Brasil) foram previamente acasaladas com machos de fertilidade comprovada. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, realizado no dia seguinte à cópula, indicou o primeiro dia de prenhez. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno, providas de cama de maravalha e alocadas em armários climatizados, localizados em alojamentos com temperatura ($21^{\circ}\text{C}\pm 2$) controlada e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Aos animais foram fornecidas diariamente 25g de ração do tipo peletizada e 100mL de água filtrada.

Esse experimento é um complemento de outros dois estudos, cujos protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob os nºs 53/2003 e 54/2003-CEA.

Preparo do extrato

O extrato aquoso de *Ginkgo biloba* foi preparado e gentilmente cedido pela JR Pharma (Origem: China – lote nº 820146). A análise do extrato foi realizada pelo Laboratório Galena e comprovou que o extrato utilizado continha em sua composição 28,2% de glicosídeos flavonóides, 8,3% de terpenolactonas, 15% de quercetina, 10,9% de kaempferol, 2,3% de isorhammetina e menos de 5 ppm

(0,81%) de ácido ginkgólico. Estas concentrações são similares às encontradas no extrato padronizado de *G. biloba* EGb 761 [2, 5, 46, 47]. Três concentrações diferentes do extrato foram preparadas: 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia, representando, respectivamente, uma, duas e quatro vezes a dose máxima recomendada para tratamento de doenças em humanos [5, 16, 48].

Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos (Gb₁₅ e Gb₂₁, n=60). As ratas dos grupos Gb₁₅ e Gb₂₁ foram tratadas, respectivamente, do primeiro ao oitavo dia prenhez e do oitavo ao vigésimo dia de prenhez. Cada um desses grupos foi subdividido em quatro grupos experimentais (n=15): controle, Gb 3,5; Gb 7 e Gb 14, conforme doses de tratamento representados na Tabela 1. Os animais foram submetidos a tratamentos diários, uma vez ao dia, via gavagem.

Após a administração do EGb, os animais foram observados por um período de 60 minutos para avaliar a toxicidade do extrato sobre o organismo materno e assim detectar a presença ou não de sinais clínicos indicativos de toxicidade tais como: estereotipia, hiper ou hipoatividade, tremores, sangramento vaginal, diarreia, convulsões e mortes [49, 50].

Eutanásia e coleta de dados

O grupo Gb₁₅ foi eutanasiado no décimo quinto dia de prenhez e o grupo Gb₂₁, no vigésimo primeiro dia, através de exsanguinação total por punção cardíaca, sob anestesia (90mg/Kg ketamina + 10mg/Kg xilazina, IP). Para a realização do estudo, foram usados 3mL de sangue de cada animal, separados em dois tubos de

ensaios – um contendo anticoagulante EDTA a 10% e um segundo tubo sem anticoagulante.

Parâmetros Hematológicos

Eritrograma e leucograma foram obtidos através de sangue anticoagulado com EDTA a 10%, através de diluições específicas e contagem em triplicata na câmara de Neubauer. Considerou-se para o resultado final a média das contagens. Dosagem de hemoglobina foi realizada no Sistema Bioquímico SB-190, CELM[®], com reagente LABTEST[®] e hematócrito determinado em microcentrífuga FANEM[®]. Índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) foram obtidos através de cálculos matemáticos padronizados. A leucometria específica foi determinada através de extensões em lâminas coradas por Leischman. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas. As determinações foram realizadas imediatamente após o procedimento de coleta.

Parâmetros Bioquímicos

Sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinadas as concentrações de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicérides, determinados no aparelho SB-190 CELM[®], com reagentes CELM[®].

Processamento estatístico

Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA), seguido de Tuckey. Nível de significância $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna.

Não foram encontradas alterações significativas em relação à análise hematológica – série vermelha e branca – dos grupos Gb₁₅ ($p>0,05$). Tampouco houve diferença significativa quanto ao padrão hematológico das ratas tratadas do oitavo ao 20^o dia de prenhez (Gb₂₁; $p>0,05$). Os dados são apresentados respectivamente nas Tabelas 2 e 3.

Em relação aos dados bioquímicos, nos grupos Gb₁₅ (Tabela 4) houve aumento de colesterol naqueles animais tratados com 7 e 14mg/Kg/dia do extrato de *Ginkgo biloba* ($p<0,05$). Níveis de ALT, uréia e creatinina, por sua vez, sofreram decréscimos significativos quando comparados ao grupo Controle ($p<0,05$). Triglicérides não se alteraram de forma significativa nesses grupos ($p>0,05$).

Dados relativos à análise bioquímica dos grupos Gb₂₁ estão expressos na Tabela 5. Níveis de ALT e creatinina dos grupos tratados com EGb 7 e 14mg/Kg/dia foram significativamente inferiores em relação ao grupo controle Gb₂₁ ($p<0,05$). Já os níveis de uréia dos grupos Gb₂₁ tratados com as doses maiores (7 e 14mg/Kg/dia) aumentaram significativamente em relação ao grupo controle Gb₂₁ ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças significativas em relação às taxas de colesterol, triglicérides e AST entre os grupos controle Gb₂₁ e Gb₂₁ tratados ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

As doses usadas nesse estudo são baseadas na maior dose preconizada para humanos no tratamento de doenças neurodegenerativas [5, 48]: 240mg/dia, representando 3,5mg/Kg/dia para um humano pesando 70Kg. Concentrações duas e quatro vezes maiores também foram usadas para o estudo das análises hematológicas e bioquímicas das ratas prenhes [51].

Alteração do padrão comportamental materno na gaiola após a administração do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) poderia sugerir toxicidade materna, possivelmente representado laboratorialmente em alteração da série branca dos grupos tratados. Eventos imunes, como processos alérgicos, poderiam ser representados no leucograma por aumento no número de eosinófilos. Ácidos ginkgólicos e alquifenóis são constituintes presentes no EGb sabidamente alergênicos [52, 53] e poderiam desencadear eventos imunes sugeridos laboratorialmente simplesmente pela presença de eosinofilia. Nossas observações demonstraram que não houve qualquer sinal de toxicidade materna – estereotipia, hiper ou hipoatividade, tremores, sangramento vaginal, diarreia, convulsões e mortes – nos grupos tratados Gb₁₅ ou Gb₂₁ quando comparados aos seus respectivos controles, da mesma forma que leucograma dos grupos tratados não tiveram níveis de eosinófilos ou de outras células significativamente alterados.

Não foram encontrados na literatura consultada dados sobre perfis ou alterações hematológicas de animais gestantes tratados com EGb. O período gestacional impõe às gestantes alterações hematológicas e bioquímicas quando comparadas à mulheres não grávidas. Ocorre uma hemodiluição fisiológica com consequente redução dos níveis de, entre outros, hemoglobina, hematócrito, uréia e

creatinina. Neste trabalho, não foram detectadas alterações dos padrões das séries vermelhas e brancas das ratas dos grupos tratados quando comparados com os seus respectivos controles.

De um modo geral, os valores encontrados nas análises bioquímicas não se alteraram de forma significativa para suspeita de toxicidade. Houve nos grupos tratados com as maiores doses (7 e 14mg/Kg/dia) do EGb, aumento significativo nos níveis de colesterol (GB₁₅) e uma redução também relevante nos níveis de ALT (tratados Gb₁₅ e Gb₂₁).

A aspartato aminotransferase (AST) pode ser encontrada nos hepatócitos (enzima mitocondrial), mas também está presente em outros tecidos como os músculos esqueléticos, miocárdio, vesícula biliar e rins. Assim, sua elevação no sangue não necessariamente indica lesão dos hepatócitos [54]. Já a alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima essencialmente hepática e seu aumento significa lesão primária dos hepatócitos. Os dados encontrados nesse trabalho indicam uma redução dos níveis de ALT, o que pode ser interpretado a princípio pelo efeito hepatoprotetor do EGb. Kinjo e cols (2006) comprovaram, *in vitro*, elevada eficácia hepatoprotetora de constituintes do EGb, em especial do kaempferol e da quercetina, com o primeiro assumindo eficácia hepatoprotetora duas vezes maior que o segundo [29]. O EGb reduziu necrose e atrofia hepática induzida por CCl₄ [31, 55], atenuando os níveis de ALT [55]. Da mesma forma, o EGb atenuou o aumento dos níveis séricos de ALT em ratos aos quais foi induzido lesão hepática por álcool, quando comparados com ratos normais [32, 33], além de regular a proliferação e a apoptose celular em carcinomas hepatocelulares [56]. Em estudos experimentais em ratos machos Wistar, o EGb exibiu efeito antifibrótico [30, 57], inibindo a proliferação das células estelares hepáticas e reduzindo a expressão de TGF- β_1 e do fator de

crescimento do tecido conectivo, suprimindo a produção de colágeno [30]. Nesses últimos estudos, porém, a análise de ALT não demonstrou efeito decrescente semelhante ao encontrado no atual trabalho.

O aumento dos níveis de colesterol apenas nos tratados Gb₁₅ com as maiores doses (7 e 14mg/Kg/dia), parece não ser biologicamente relevante, uma vez que os animais além de prenhes, não foram submetidos a períodos de jejum antes das dosagens bioquímicas. Os níveis de colesterol poderiam assim assumir valores inconsistentes, não repetidos nos demais grupos tratados. Não foram ainda encontrados na literatura dados suficientes de perfis de colesterol e triglicérides de animais gestantes ou não tratados com *Ginkgo biloba* que pudessem ser confrontados com os achados nesse trabalho.

A alteração sérica significativa de uréia pode ser inicialmente interpretada como uma alteração renal. Um aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda, ou ainda, de aumento de catabolismo protéico [58]. Estudos baseados na ação do EGb sobre o metabolismo renal, têm indicado efeito nefroprotetor com queda dos níveis de creatinina e de uréia, anteriormente elevados por nefropatias diversas – hipertensivas [24-26] ou diabéticas [28, 59]. Níveis de uréia e creatinina dos animais Gb₁₅ 7 e Gb₁₅ 14 apresentaram-se significativamente menores quando comparados ao grupo controle Gb₁₅, acompanhando a tendência encontrada na literatura de redução dos níveis dessas excretas nitrogenadas a partir do tratamento com EGb. Porém, contraditoriamente, grupos tratados Gb₂₁ 7 e Gb₂₁ 14 apresentaram significativamente redução nos níveis de creatinina e aumento nos níveis uréia, quando comparado ao grupo controle Gb₂₁. A análise de uréia e creatinina foram processadas imediatamente à coleta, não sendo, portanto, o intervalo entre a coleta

e o tempo de processamento do material, fator responsável por esse contraste de valores. Mais fidedigno para determinar uma lesão renal, os níveis de creatinina sofreram redução em ambos os grupos tratados, sugerindo um papel nefroprotetor do EGb, sugerido pela literatura.

Baseados nos resultados obtidos, conclui-se que a administração do extrato de *Ginkgo biloba* não produz efeitos tóxicos sobre ratas Wistar prenhes que poderiam resultar em alterações em seus perfis bioquímicos e hematológicos. Há ainda uma tendência à hepatoproteção do EGb quando usados nas doses 7 e 14 mg/Kg/dia durante a gestação, nas fases de embriogênese, organogênese e fetogênese, e uma sugestão à ação nefroprotetora do EGb, também quando administrado em doses elevadas durante as fases de embriogênese.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado por PROBIC/FAPEMIG/UFJF e pela Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Terapêuticos/FAPEMIG, Brasil. Os autores são gratos à Rosimar Rodrigues de Azevedo pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bilia AR. Ginkgo biloba L. *Fitoterapia* 2002 Jun;73(3):276-9.
2. Jacobs BP, Browner WS. Ginkgo biloba: a living fossil. *Am J Med* 2000 Mar;108(4):341-2.
3. Segura MAM, Delgado SB, Torres RG. Aplicaciones clínicas del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba*. *Revista de Fitoterapia* 2000;1(2):95-105.
4. Dugoua JJ, Mills E, Perri D, Koren G. Safety and efficacy of ginkgo (*Ginkgo biloba*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 2006 Fall;13(3):e277-84.
5. Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004 May;64(4):465-72.
6. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Sep 17;99(19):12197-202.
7. Arnold KR. Ginkgo and memory. *JAMA* 2003 Feb 5;289(5):546; author reply 7-8.
8. Cheuvront SN, Carter R, 3rd. Ginkgo and memory. *JAMA* 2003 Feb 5;289(5):547; author reply -8.
9. Doraiswamy PM, Pomara N. Ginkgo and memory. *JAMA* 2003 Feb 5;289(5):547; author reply -8.
10. Nathan PJ, Harrison BJ, Bartholomeusz C. Ginkgo and memory. *JAMA* 2003 Feb 5;289(5):546; author reply 7-8.
11. Wheatley D. Ginkgo and memory. *JAMA* 2003 Feb 5;289(5):546-7; author reply 7-8.
12. Longpre F, Garneau P, Christen Y, Ramassamy C. Protection by EGb 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. *Free Radic Biol Med* 2006 Dec 15;41(12):1781-94.
13. Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, et al. Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 2006 Dec 13;26(50):13102-13.
14. Ramassamy C, Longpre F, Christen Y. Ginkgo biloba extract [EGb 761] in Alzheimer's disease: is there any evidence? *Curr Alzheimer Res* 2007 Jul;4(3):253-62.
15. Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 2007 Aug;1768(8):1976-90.
16. McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* 2001 Sep-Oct;7(5):70-86, 8-90.
17. Teske M, Trentini AMM. *Herbarium: compêndio de fitoterapia*. 4ª ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico; 2001.
18. Masteikova R, Muselik J, Bernatoniene J, Bernatoniene R. Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures. *Medicina (Kaunas)* 2007;43(4):306-9.

19. Welt K, Weiss J, Martin R, Hermsdorf T, Drews S, Fitzl G. Ginkgo biloba extract protects rat kidney from diabetic and hypoxic damage. *Phytomedicine* 2007 Feb;14 (2-3):196-203.
20. Boveris AD, Galleano M, Puntarulo S. In vivo supplementation with Ginkgo biloba protects membranes against lipid peroxidation. *Phytother Res* 2007 Aug;21(8):735-40.
21. Koch E. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts. *Phytomedicine* 2005 Jan;12(1-2):10-6.
22. Carlson JJ, Farquhar JW, DiNucci E, Ausserer L, Zehnder J, Miller D, et al. Safety and efficacy of a ginkgo biloba-containing dietary supplement on cognitive function, quality of life, and platelet function in healthy, cognitively intact older adults. *J Am Diet Assoc* 2007 Mar;107(3):422-32.
23. Xie J, Ding C, Ge Q, Zhou Z, Zhi X. Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of Ginkgo biloba extract in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 Mar 15;864(1-2):87-94.
24. Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, et al. Effects of Ginkgo biloba extract feeding on salt-induced hypertensive Dahl rats. *Biol Pharm Bull* 2006 Feb;29(2):266-9.
25. Umegaki K, Shinozuka K, Watarai K, Takenaka H, Yoshimura M, Daohua P, et al. Ginkgo biloba extract attenuates the development of hypertension in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000 Apr;27(4):277-82.
26. Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, et al. Effects of Ginkgo biloba extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol* 2006 Feb;58(2):243-9.
27. Celik I, Cihangiroglu M, Ilhan N, Akpolat N, Akbulut HH. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005 Nov;97(5):325-32.
28. Lu Q, Yin XX, Wang JY, Gao YY, Pan YM. Effects of Ginkgo biloba on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2007 Jun;28(6):818-28.
29. Kinjo J, Hitoshi M, Tsuchihashi R, Korematsu Y, Miyakoshi M, Murakami T, et al. Hepatoprotective constituents in plants 15: protective effects of natural-occurring flavonoids and miscellaneous phenolic compounds as determined in an HepG2 cell cytotoxicity assay. *J Nat Med* 2006;60:36-41.
30. Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006 Dec;26(10):1283-90.
31. Ding J, Yu J, Wang C, Hu W, Li D, Luo Y, et al. Ginkgo biloba extract alleviates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Liver Int* 2005 Dec;25(6):1224-32.
32. Yao P, Li K, Song F, Zhou S, Sun X, Zhang X, et al. Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food Chem Toxicol* 2007 Aug;45(8):1333-42.
33. Yuan G, Gong Z, Li J, Li X. Ginkgo biloba extract protects against alcohol-induced liver injury in rats. *Phytother Res* 2007 Mar;21(3):234-8.

34. Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA* 1998 Nov 11;280(18):1569-75.
35. Mar C, Bent S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. *West J Med* 1999 Sep;171(3):168-71.
36. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tiena OS, Hakinami SH, et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 2002;73:69-91.
37. Tesch BJ. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. *Am J Obstet Gynecol* 2003 May;188(5 Suppl):S44-55.
38. Ernst E. Herbal medicinal products during pregnancy? *Phytomedicine* 2002;9:352-4.
39. Acker G, Hecquet F, Etienne A, Braquet P, Mencia-Huerta JM. Role of platelet-activating factor [PAF] in the ovoidimplantation in the rat: effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021. *Prostaglandins* 1988 Feb;35(2):233-41.
40. Spinks NR, O'Neill C. Antagonists of embryo-derived platelet-activating factor prevent implantation of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1988 Sep;84(1):89-98.
41. Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 1999 Mar;71(3):517-22.
42. Chan WH. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts. *Hum Reprod* 2006 Nov;21(11):2985-95.
43. Chan WH. Ginkgolides induce apoptosis and decrease cell numbers in mouse blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Dec 16;338(2):1263-7.
44. Faria DE, Reis JEdP, Ribeiro LC, Peters VM, Guerra MO. Comportamento de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) expostas ao extrato de Ginkgo biloba durante a lactação. *Revista Brasileira de Zootecias* 2006;8(2):91-8.
45. Pinto RM, Fernandes ES, Reis JE, Peters VM, Guerra MO. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reprod Toxicol* 2007 Jun;23(4):480-5.
46. Blumenthal M. The effect of the ingestion of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the pharmacokinetics of metformin in non-diabetic and type 2 diabetic subjects--a double blind placebo-controlled, crossover study. *Clin Nutr* 2007 Feb;26(1):164-5; author reply 6-7.
47. Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M. Ginkgo biloba. *Am Fam Physician* 2003 Sep 1;68(5):923-6.
48. Blumenthal M, Brinckmann J, Wollschlaeger B. *The ABC clinical guide to herbs*. New York: Thieme; 2003.
49. Christian MS. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press; 2001. p. 1301-81.
50. Hood RD, Miller DB. Maternally mediated effects on development. In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2^a ed. Londres: Taylor & Francis; 2006. p. 93-124.
51. OECD. *Guideline for the testing of chemicals—no. 414: prenatal developmental toxicity study*. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 2001.
52. Baron-Ruppert G, Luepke NP. Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen's egg test (HET). *Phytomedicine* 2001 Mar;8(2):133-8.

53. Hecker H, Johannisson R, Koch E, Siegers CP. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. *Toxicology* 2002 Aug 15;177(2-3):167-77.
54. Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *Journal of Ethnopharmacol* 2002;83:209-17.
55. Chang HF, Lin YH, Chu CC, Wu SJ, Tsai YH, Chao JC. Protective Effects of *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, and *Schizandra chinensis* Extract on Liver Injury in Rats. *Am J Chin Med* 2007;35(6):995-1009.
56. Chao JC, Chu CC. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004 Jan;10(1):37-41.
57. Göksel P, Levent Kabasakal, Meral Yüksel, Nursal Gedik, Alican Y. Hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats is prevented by *Ginkgo biloba* treatment. *World J Gastroenterol* 2005;11(35):5444-9.
58. Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P. Toxic. Studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug milk extract of *Semecarpus anacardim* nut. *Journal of Ethnopharmacol* 2000;69:9-15.
59. Almeida FCG, Rudge MVC, Lemonica IP. Sistema de Defesa Antioxidante Hepático de Ratas Prenhes Diabéticas Tratadas com Extrato de *Ginkgo biloba*: Repercussão sobre a Performance Reprodutiva e o Resultado Perinatal. 2002.

Tabela 1. Grupos experimentais e doses administradas do extrato de *Ginkgo biloba* durante os dias de tratamento.

Grupos experimentais	Dose administrada	Dias de tratamento
Controle Gb₁₅	1 mL de água destilada	Primeiro ao oitavo dia de prenhez
Gb₁₅ 3.5	3,5 mg/Kg/dia de EGb	
Gb₁₅ 7	7,0 mg/Kg/dia de EGb	
Gb₁₅ 14	14,0 mg/Kg/dia de EGb	
Controle Gb₂₁	1 mL de água destilada	Oitavo ao 20 ^o dia de prenhez
Gb₂₁ 3.5	3,5 mg/Kg/dia de EGb	
Gb₂₁ 7	7,0 mg/Kg/dia de EGb	
Gb₂₁ 14	14,0 mg/Kg/dia de EGb	

Tabela 2. Variáveis hematológicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de *Ginkgo biloba*, do primeiro ao oitavo dia de prenhez, nas concentrações zero, 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia.

Variáveis	Controle Gb ₁₅	Grupos Experimentais		
		Gb ₁₅ 3.5	Gb ₁₅ 7	Gb ₁₅ 14
Hb (mg/dL)	13,85 ± 1,34	11,8 ± 1,2	12,53 ± 1,75	14,37 ± 3,07
Htc (%)	37,73 ± 2,31	39,7 ± 1,3	34,35 ± 3,59	37,59 ± 3,86
Htm (x10 ³ cel/mm ³)	6016,67 ± 1107,69	4851,9 ± 556,5	6271,18 ± 1439,66	5814,12 ± 1379,33
LG (cel/mm ³)	6535,33 ± 1879,59	5653,1 ± 464,2	4682,35 ± 2002,49	4737,50 ± 1882,60
VCM (fL)	64,47 ± 10,15	79,5 ± 5,0	57,29 ± 12,40	69,00 ± 15,75
HCM (pg)	23,47 ± 3,54	24,8 ± 2,3	20,53 ± 3,71	25,35 ± 5,00
CHCM (%)	36,67 ± 2,99	29,7 ± 2,6	36,47 ± 6,03	39,57 ± 6,39
Bastonetes (%)	1,67 ± 0,98	1,2 ± 0,7	1,50 ± 0,97	1,63 ± 0,50
Segmentados (%)	30,73 ± 9,04	41,9 ± 5,6	31,25 ± 11,28	37,25 ± 9,46
Linfócitos (%)	57,80 ± 9,26	50,6 ± 5,3	60,06 ± 11,57	54,00 ± 8,68
Monócitos (%)	2,67 ± 1,84	3,3 ± 1,3	3,13 ± 1,63	3,25 ± 0,86
Eosinófilos (%)	7,13 ± 3,48	2,9 ± 2,1	4,06 ± 2,38	3,88 ± 1,41

Resultados expressos em média ± desvio padrão. n=15. p>0,05.

Hb: Hemoglobina; Htc: Hematócrito; Htm: hematimetria; LG: Leucometria Global; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 3. Variáveis hematológicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de *Ginkgo biloba*, do oitavo ao 20º dia de prenhez, nas concentrações zero, 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia.

Variáveis	Grupos Experimentais			
	Controle Gb ₂₁	Gb ₂₁ 3,5	Gb ₂₁ 7	Gb ₂₁ 14
Hb (mg/dL)	11,54 ± 1,36	11,0 ± 1,9	10,14 ± 0,73	9,801 ± 1,18
Htc (%)	34,85 ± 2,60	32,5 ± 4,8	31,00 ± 4,75	30,54 ± 2,87
Htm [x10 ³ (cel/mm ³)	5848,57 ± 876,19	5510,0 ± 1625,1	4531,43 ± 1173,70	4401,54 ± 1443,71
LG (cel/mm ³)	5790,71 ± 1705,21	4785,3 ± 1683,3	3589,28 ± 1075,28	3563,69 ± 1687,38
VCM (fL)	58,86 ± 7,35	63,7 ± 20,2	76,43 ± 23,50	72,00 ± 24,04
HCM (pg)	20,14 ± 4,29	21,9 ± 8,0	25,44 ± 8,78	20,31 ± 4,13
CHCM (%)	33,14 ± 3,68	33,9 ± 3,1	33,00 ± 3,86	32,15 ± 3,08
Bastonetes (%)	1,14 ± 0,86	1,12 ± 0,78	1,28 ± 0,47	1,92 ± 0,76
Segmentados (%)	29,78 ± 6,54	26,3 ± 11,3	30,86 ± 7,05	43,08 ± 14,37
Linfócitos (%)	62,43 ± 5,12	67,2 ± 11,3	61,35 ± 9,21	48,31 ± 13,83
Monócitos (%)	3,50 ± 1,1	2,9 ± 1,6	3,78 ± 1,19	3,00 ± 0,81
Eosinófilos (%)	3,00 ± 1,47	2,9 ± 1,5	2,86 ± 1,99	3,69 ± 1,93

Resultados expressos em média ± desvio padrão. n=15. p>0,05.

Hb: Hemoglobina; Htc: Hematócrito; Htm: hematimetria; LG: Leucometria Global; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 4. Variáveis bioquímicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de *Ginkgo biloba*, do primeiro ao oitavo dia de prenhez, nas concentrações zero, 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia.

Variáveis	Controle Gb ₁₅	Grupos experimentais		
		Gb ₁₅ 3.5	Gb ₁₅ 7	Gb ₁₅ 14
Colesterol (mg/dL)	41,00 ± 8,08	48,5 ± 15,20	60,50 ± 10,08*	82,28 ± 23,37*
Triglicérides (mg/dL)	105,43 ± 34,92	97,36 ± 54,06	97,25 ± 51,79	99,00 ± 72,03
AST (U/L)	122,36 ± 47,63	118,07 ± 51,07	161,81 ± 59,19	102,75 ± 33,53
ALT (U/L)	83,21 ± 22,74	77,14 ± 29,57	60,75 ± 19,56*	38,87 ± 10,24*
Uréia (mg/dL)	69,86 ± 18,78	69,50 ± 14,81	46,06 ± 15,23*	55,81 ± 6,57*
Creatinina (mg/dL)	0,62 ± 0,18	0,52 ± 0,02	0,51 ± 0,20*	0,39 ± 0,07*

Resultados expressos em média ± desvio padrão. n=15. *p<0,05

Tabela 5. Variáveis bioquímicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de *Ginkgo biloba*, do oitavo ao 20º dia de prenhez, nas concentrações zero, 3,5, 7 e 14mg/Kg/dia.

Variáveis	Grupos Experimentais			
	Controle Gb ₂₁	Gb ₂₁ 3.5	Gb ₂₁ 7	Gb ₂₁ 14
Colesterol (mg/dL)	91,84± 45,30	109,41 ± 49,08	88,21 ± 12,17	118,69 ± 32,12
Triglicérides (mg/dL)	296,63 ± 133,60	253,00 ± 177,51	367,64± 133,97	324,61± 140,51
AST (U/L)	63,07 ± 18,50	70,12 ± 42,27	43,46± 38,22	79,23±34,98
ALT (U/L)	50,78±19,68	56,76 ± 17,14	37,00 ± 14,60*	36,00 ± 14,70*
Uréia (mg/dL)	49,58 ±17,44	42,49 ± 15,97	75,08 ± 19,51*	77,67 ± 18,61*
Creatinina (mg/dL)	1,18± 0,53	0,70 ± 0,40	0,65 ± 0,28*	0,74 ± 0,31*

Resultados expressos em média ± desvio padrão. n=15. *p<0,05

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)