

AValiação Hematológica e Bioquímica em Ratas Prenhes Tratadas com Extrato de Ginkgo Biloba

HEMATOLOGIC AND BIOCHEMISTRY EVALUATION ON PREGNANT RAT TREATED WITH GINKGO BILOBA EXTRACT

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

RESUMO

Introdução: O extrato de Ginkgo biloba (GBE) é um fitoterápico usado no tratamento de doenças degenerativas e em estudos recentes tem sido demonstrado efeito nefro e hepatoprotetor de seus componentes. **Material e métodos:** No presente estudo, 120 ratas Wistar prenhes foram distribuídas em dois grupos experimentais – GB 15 e GB 21 – tratadas, respectivamente, do primeiro ao oitavo dia da prenhez e do oitavo ao vigésimo dia com 0, 3,5; 7,0 ou 14mg/kg/dia de extrato aquoso de GBE, via gavagem. Os animais foram eutanaziados por exsanguinação total, sob anestesia, no 15º dia ou no 20º dia de prenhez. Os seguintes parâmetros foram avaliados no sangue coletado: eritograma, leucograma, dosagens séricas de ureia, creatinina, ALT, AST, colesterol e triglicérides. **Resultados:** Não foram encontradas alterações significativas no padrão hematológico de ratas tratadas nos grupos GB 15 e GB 21. Em relação ao perfil bioquímico, o grupo GB 15, tratado com as doses de 7 e 14mg/kg, evidenciou aumento dos níveis de colesterol e redução de ALT, ureia e creatinina. No grupo GB 21, tratado com as mesmas doses, não se observou aumento de colesterol, mas sim de ureia, enquanto que ALT e creatinina reduziram-se da mesma maneira que no grupo GB 15. **Conclusões:** Os resultados sugerem que o GBE não altera os padrões hematológicos, porém, no início da gestação aumenta os níveis de colesterol, enquanto que no final da gestação não altera o colesterol, aumentando a ureia, e durante os dois períodos de gestação reduz creatinina e ALT, o que parece confirmar os efeitos nefro e hepatoprotetor.

PALAVRAS-CHAVE

Ginkgo biloba. Rato Wistar. Gestação. Perfil hematológico. Perfil bioquímico.

ABSTRACT

Introduction: The Ginkgo biloba extract (GBE) is a phytotherapeutic used in the treatment of neurodegenerative diseases and recent studies have demonstrated nephro and hepatoprotector effects of its components. **Material and methods:** In this study 120 pregnant Wistar rats were distributed among two experimental groups - GB15 e GB21 – treated respectively from the first to eight day of pregnancy and to the eight to de 20th day, with zero, 3.5, 7 or 14mg/kg/day of aqueous extract of Ginkgo biloba by gavagem. Animals were euthanized by exsanguinations under anesthesia on 15th or 21th pregnancy day. The following parameters were analyzed in the blood hemogram, hematocrit, hemoglobin, total leukocytes, cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP). **Results:** No hematological alteration was observed in either group. With respect to biochemistry profile the GB15, group treated with 7 and 14mg/kg, showed higher level of cholesterol and lower level of ALT, urea and creatinin. In the group GB21, treated with the same dose, there was no cholesterol alteration but higher level of urea whereas ALT and creatinin where lower than control as in GB15 group. **Conclusions:** GBE seems do not alter hematological profile but at early gestation increase the cholesterol level. At latter gestation do not alter cholesterol but increase urea levels. At all period of the gestation the GBE decrease creatinine and ALT seems to confirm possible nepro and hepatic protector effect.

KEY WORDS

Ginkgo biloba. Wistar rats. Pregnancy. Haematological profile. Biochemical profile.

Correspondence author: Vera Maria Peters - Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970 Juiz de Fora, MG, Brasil. vera@uff.edu.br.

Agradecimentos

* Universidade de São Paulo. andreasilva@usp.br.

** Médico Residente Hospital Sara Kubitshek BH – MG. esfe@ymail.com.

*** Médico. Mestre em Saúde Brasileira. moraes.rafael@gmail.com.

Pesquisador Associado Centro de Biologia da Reprodução. joaoreis@ig.com.br.

Professora Visitante – Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina e Pesquisadora do Centro de Biologia da Reprodução. martha.guerra@uff.edu.br.

Diretora e pesquisadora do Centro de Biologia da Reprodução. peters.vera@uff.edu.br. Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Terapêuticos/FAPEMIG. PROBIC/FAPEMIG/UFJF. Apoio técnico de Rosimar Rodrigues de Azevedo.

Received: 05/2010

Accepted:07/2010

1 INTRODUÇÃO

Ginkgo biloba (GB), única representante da família Ginkgoaceae, é uma planta de origem chinesa, usada tradicionalmente como alimento e medicamento nas culturas orientais (BILIA, 2002). O extrato produzido a base de GB é um preparado padronizado (GBE 761), cujos principais componentes ativos são os ginkgolídeos A e B, bilobalídeos, alquifonóis e flavonoides, como a quercetina e o kempferol (DUGOUA et al., 2006; JACOBS; BROWNER, 2000; SEGURA et al., 2000). A constituição final do extrato consiste em

22 a 27% de glicoflavonoides, 5 a 7% de terpenas lactonas e < 5 ppm ácido gíngkólico (JACOBS; BROWNER, 2000; SEGURA et al., 2000; SMITH; LUO, 2004).

O extrato de *Ginkgo biloba* (GBE) é largamente usado no tratamento de doenças neurodegenerativas, na insuficiência vascular cerebral, na doença vascular periférica e em distúrbios vestibulares (ARNOLD, 2003; CHEUVRONT; CARTER, 2003; DORAISWAMY; 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). Essas ações se devem principalmente às propriedades anti-inflamatórias (McKENNA et al., 2001), regulando a permeabilidade capilar ao inibir a bradicinina e a histamina (TESKE; TRENTINI, 2001); à ação antioxidante (MASTEIKOVA et al., 2007; WELT et al., 2007), por diminuir o nível de espécies reativas de oxigênio (McKENNA et al., 2001) e atenuar a peroxidação lipídica da membrana celular (BOVERIS et al., 2007), e à potente ação antiagregante plaquetária (CARLSON et al., 2007; KOCH, 2005), ao antagonizar os receptores do fator de agregação plaquetária (XIE et al., 2008).

Diversos trabalhos têm demonstrado efeitos nefroprotetores e hepatoprotetores do extrato de *Ginkgo biloba*. Em ratos hipertensos, o GBE exerce ação anti-hipertensiva (KUBOTA et al., 2006; UMEGAKI et al., 2000), produzindo vasodilatação ao aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular e causando efeito bradicárdico por influenciar o ritmo circadiano (KUBOTA et al., 2006; UMEGAKI et al., 2000). Devido à sua ação antioxidante, o GBE reduz a nefrotoxicidade induzida pela vancomicina (CELIK et al., 2005). Além disso, tratamento com GBE em ratos diabéticos sugere alta eficácia do extrato na prevenção da nefropatia diabética (LU et al., 2007; WELT et al., 2007).

Estudo recente comprovou, *in vitro*, elevada eficácia hepatoprotetora de constituintes flavonoides do GBE, exibindo efeito antifibrótico e reduzindo necrose e atrofia hepática induzida por drogas como o tetracloreto de carbono e álcool (DING et al., 2005; KINJO et al., 2006; YAO et al., 2007; YUAN et al., 2007; ZHANG et al., 2006).

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 (DI STASI et al., 2002; EISENBERG et al., 1998; MAR; BENT, 1999; TESCH, 2003). Por ser um medicamento de venda livre, 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 (DUGOUA et al., 2006; ERNST, 2002), tem motivado a realização de vários estudos sobre o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* no organismo materno e sua implicação no desenvolvimento embrionário (ACKER et al., 1988; CHAN, 2005; CHAN, 2006; FARIA et al., 2006; ONDRIZEK et al., 1999; PINTO et al., 2007; SPINKS; O'NEILL, 1988).

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.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram selecionadas cento e vinte ratas Wistar, adultas (n=120), com idade de 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), previamente acasaladas com machos de fertilidade comprovada. A presença de espermatozoides 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 ($21^{\circ}C \pm 2$) 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.

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

2.2 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 mesmo continha em sua composição 28,2% de glicosídeos flavonoides, 8,3% de terpenolactonas, 15% de quercetina, 10,9% de kaempferol, 2,3% de isorhammetina e menos de 5 ppm (0,81%) de ácido gíngkólico. Estas concentrações são similares às encontradas no extrato padronizado de *G. biloba* (GBE 761) (BLUMENTHAL, 2007; JACOBS; BROWNER, 2000; SIERPINA et al., 2003; SMITH; LUO, 2004). 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 (BLUMENTHAL et al., 2003; McKENNA et al., 2001; SMITH; LUO, 2004).

2.3 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, 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 representadas no Quadro 1. Os animais foram submetidos a tratamentos diários, uma vez ao dia, via gavagem.

Quadro 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 | 1mL de água destilada | Primeiro ao oitavo dia de prenhez |
| GB₁₅ 3,5 | 3,5 mg/Kg/dia de GBE | |
| GB₁₅ 7 | 7,0 mg/Kg/dia de GBE | |
| GB₁₅ 14 | 14,0 mg/Kg/dia de GBE | |
| Controle GB₂₁ | 1mL de água destilada | Oitavo ao 21 ^a dia de prenhez |
| GB₂₁ 3,5 | 3,5 mg/Kg/dia de GBE | |
| GB₂₁ 7 | 7,0 mg/Kg/dia de GBE | |
| GB₂₁ 14 | 14,0 mg/Kg/dia de GBE | |

Após a administração do GBE, 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 morte (CHRISTIAN, 2001; HOOD; MILLER, 2006).

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

2.5 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 consagrados. A leucometria específica foi determinada através de extensões em lâminas coradas segundo Leischman. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas. As determinações foram realizadas imediatamente após o procedimento de coleta.

2.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos, e em seguida, determinados os parâmetros de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total e triglicérides; no SB-190 CELMr, com reagentes CELMr.

2.7 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA), seguida de Tuckey. Nível de significância p=0,05.

3 RESULTADOS

Sinais clínicos de toxicidade materna não foram observados nas amostras do experimento. 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^a dia de prenhez (GB₂₁; p>0,05). Os dados estão representados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. 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 | Grupos Experimentais | | | |
|---|---------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| | Controle GB ₁₅ | 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 ± | 4851,9 ± | 6271,18 ± | 5814,12 ± |
| LG (cel/mm ³) | 1107,69 | 556,5 | 1439,66 | 1379,33 |
| | 6535,33 ± | 5653,1 ± | 4682,35 ± | 4737,50 ± |
| | 1879,59 | 464,2 | 2002,49 | 1882,60 |
| VCM (fL) | 64,47 ± | 79,5 ± 5,0 | 57,29 ± | 69,00 ± |
| | 10,15 | | 12,40 | 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 ± | 37,25 ± 9,46 |
| | | | 11,28 | |
| Linfócitos (%) | 57,80 ± 9,26 | 50,6 ± 5,3 | 60,06 ± | 54,00 ± 8,68 |
| | | | 11,57 | |
| 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 2. Variáveis hematológicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de Ginkgo biloba, do oitavo ao 21º dia de prenhez, nas concentrações zero; 3,5; 7,0 e 14mg/Kg/dia.

| Variáveis | Controle GB ₂₁ | Grupos Experimentais | | |
|--|---------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| | | 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.

Em relação aos dados bioquímicos, nos grupos GB₁₅ (Tabela 3) houve aumento do nível de colesterol naqueles animais tratados com 7 e 14mg/Kg/dia do extrato de *Ginkgo biloba* (p<0,05). Níveis de ALT, ureia e creatinina, por sua vez, sofreram decréscimos significativos quando comparados ao grupo Controle (p<0,05). Níveis de triglicérides não se alteraram de forma significativa nesses grupos (p>0,05).

Tabela 3. Variáveis bioquímicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de Ginkgo biloba, do primeiro ao oitavo dia de prenhez (GB15), 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

Dados relativos à análise bioquímica dos grupos GB₂₁ estão expressos na Tabela 4. Níveis de ALT e creatinina dos grupos tratados com GBE 7 e 14mg/Kg/dia foram significativamente inferiores em relação ao grupo controle GB₂₁ (p<0,05). Já níveis de ureia 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 aos níveis de colesterol, triglicérides e AST entre os grupos controle GB₁₅ e GB₂₁ tratados (p>0,05).

Tabela 4. Variáveis bioquímicas de ratas Wistar prenhes após tratamento com extrato de Ginkgo biloba, do oitavo ao 21º dia de prenhez, nas concentrações zero; 3,5; 7,0 e 14mg/Kg/dia.

| Variáveis | Controle GB ₂₁ | Grupos Experimentais | | |
|-----------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| | | 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* |
| Ureia (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

4 DISCUSSÃO

As doses usadas neste estudo são baseadas na maior dose preconizada para humanos no tratamento de doenças neurodegenerativas (BLUMENTHAL et al., 2003; SMITH; LUO, 2004): 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 (OECD, 2001).

Alteração do padrão comportamental materno na gaiola após a administração do extrato de *Ginkgo biloba* (GBE) poderia sugerir toxicidade materna, possivelmente representado laboratorialmente como alteração da série branca nos grupos tratados. Eventos imunes, mais especificamente reações de hipersensibilidade, poderiam estar representados no leucograma através de eosinofilia. Ácidos ginkgólicos e alquilfenóis são constituintes presentes no GBE sabidamente alergênicos, e como tal poderiam estar laboratorialmente associados ao aumento do número de eosinófilos (BARON-RUPPERT; LUEPKE, 2001; HECKER et al., 2002). Nossas observações demonstraram que não houve qualquer sinal de toxicidade materna – estereotípia, 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 os leucogramas 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 tratados com GBE. O período gestacional impõe às gestantes alterações hematológicas e bioquímicas quando comparadas a mulheres não grávidas. Ocorre uma hemodiluição fisiológica com conseqüente redução dos níveis, entre outros, de hemoglobina, hematócrito, ureia 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 GBE, 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 o muscular estriado esquelético e cardíaco, além de em órgãos como a vesícula biliar e os rins. Assim, sua elevação no sangue não necessariamente indica lesão dos hepatócitos (AL-HABORI et al., 2002). Já a alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima essencialmente hepática e seu aumento significa lesão primária dos hepatócitos. Os dados encontrados neste trabalho indicam uma redução dos níveis de ALT, o que pode ser interpretado, a princípio, pelo efeito hepatoprotetor do GBE. Kinjo et al. (2006) comprovaram, *in vitro*, elevada eficácia hepatoprotetora de constituintes do GBE, em especial do kaempferol e da quercetina, com o primeiro assumindo eficácia hepatoprotetora duas vezes maior que o segundo (KINJO et al., 2006). O GBE reduziu necrose e a atrofia hepática induzida por CCl₄ (CHANG et al., 2007; DING et al., 2005), atenuando os níveis de ALT (CHANG et al., 2007). Da mesma forma, o GBE atenuou o aumento dos níveis séricos de ALT em ratos, nos quais foi induzida lesão hepática por álcool, quando comparados com ratos normais (YAO et al., 2007; YUAN et al., 2007), além de regular a proliferação e a apoptose celular em carcinomas hepatocelulares (CHAO; CHU, 2004). Em estudos experimentais com ratos machos Wistar, o GBE exibiu efeito antifibrótico (SENER et al., 2005; ZHANG et al., 2006), inibindo a proliferação das células estreladas hepáticas e reduzindo a expressão de TGF-β₁ e do fator de crescimento do tecido conectivo, suprimindo a produção de colágeno (ZHANG et al., 2006). 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 padrões erráticos, não repetidos nos demais grupos tratados. Não foram, ainda, encontrados na literatura dados suficientes de perfis de colesterol e triglicérides de animais tratados com *Ginkgo biloba* que pudessem ser confrontados com os achados nesse trabalho.

A alteração sérica significativa de ureia pode ser inicialmente interpretada como uma alteração renal. Um aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda, ou ainda, de aumento de catabolismo proteico (VIJAYALAKSHMI et al., 2000). Estudos baseados na ação do GBE sobre o metabolismo renal têm indicado efeito nefroprotetor com queda dos níveis de creatinina e de ureia, anteriormente elevados por nefropatias diversas – hipertensivas ou diabéticas (ALMEIDA et al., 2002; KUBOTA et al., 2006; LU et al., 2007; UMEGAKI et al., 2000). Os níveis de ureia e de creatinina dos animais de GB₁₅, 7 e de GB₁₅, 14 foram 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 GBE. Porém, contraditoriamente, grupos tratados GB₂₁, 7 e GB₂₁, 14 apresentaram significativa redução nos níveis de creatinina e aumento nos níveis de ureia, quando comparados ao grupo controle GB₂₁. A análise de ureia e de creatinina foi processada imediatamente à coleta, não sendo, portanto, o intervalo entre a coleta e o tempo de processamento do material o fator responsável por esse contraste de valores. Mais fidedignos para determinar uma lesão renal, os níveis de creatinina sofreram redução em ambos os grupos tratados, sugerindo um papel nefroprotetor do GBE, de acordo com a literatura.

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

5 REFERÊNCIAS

- ACKER, G.; HECQUET, F.; ETIENNE, A.; BRAQUET, P.; MENCIA-HUERTA, J.M. Role of platelet-activating factor [PAF] in the ovoidimplantation in the rat: effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021. **Prostaglandins**, New York, v. 35, n. 2, p. 233-241, 1988.
- 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**, Lausanne, v. 83, n. 3, p. 209-217, 2002.
- ALMEIDA, F.C.G.; RUDGE, M.V.C.; LEMONICA, I.P. Sistema de Defesa Antioxidante Hepático de Ratas Prenhes Diabéticas Tratadas com Extrato de *Ginkgo biloba*: Repercussão sobre a Performance Reprodutiva e o Resultado Perinatal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p.67, 2003.
- ARNOLD, K.R. Ginkgo and memory. **The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 7-8, 2003.
- BARON-RUPPERT, G.; LUEPKE, N.P. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET). **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. The effect of the ingestion of *Ginkgo biloba* extract (GBE 761) on the pharmacokinetics of metformin in non-diabetic and type 2 diabetic subjects--a double blind placebo-controlled, crossover study. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 26, n. 1, p. 164-465, 2007.
- BLUMENTHAL, M.; BRINCKMANN, J.; WOLLSCHLAEGER, B. **The ABC clinical guide to herbs**. New York: Thieme; 2003.
- BOVERIS, A.D.; GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. In vivo supplementation with *Ginkgo biloba* protects membranes against lipid peroxidation. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 8, p. 735-740, 2007.
- 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.
- CELIK, I.; CIHANGIROGLU, M.; ILHAN, N.; AKPOLAT, N.; AKBULUT, H.H. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 97, n. 5, p. 325-332, 2005.
- CHAN, W.H. 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. Ginkgolides induce apoptosis and decrease cell numbers in mouse blastocysts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 338, n. 2, p. 1263-1267, 2005.
- CHANG, H.F.; LIN, Y.H.; CHU, C.C.; WU, S.J.; TSAI, Y.H.; CHAO, J.C. Protective Effects of *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, and *Schizandra chinensis* Extract on Liver Injury in Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, Garden City, v. 35, n. 6, p. 995-1009, 2007.
- CHAO, J.C.; CHU, C.C. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 10, n. 1, p. 37-41, 2004.
- CHEUVFRONT, S.N.; CARTER, R. Ginkgo and memory. **The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 547, 2003.
- CHRISTIAN, M.S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press; 2001.
- DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 1, p. 69-71, 2002.
- DING, J.; YU, J.; WANG, C.; et al. *Ginkgo biloba* extract alleviates liver fibrosis induced by CCl in rats. **Liver International**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1224-1232, 2005.
- DORAISWAMY, P.M.; POMARA, N. Ginkgo and memory. **The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 547, 2003.
- DUGOUA, J.J.; MILLS, E.; PERRI, D.; KOREN, G. 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.
- EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L.; et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 280, n. 18, p. 1569-1575, 1998.
- ERNST, E. Herbal medicinal products during pregnancy? **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 9, n. 4, p. 352-354, 2002.
- FARIA, D.E.; REIS, J.E.D.P.; RIBEIRO, L.C.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. Comportamento de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) expostas ao extrato de *Ginkgo biloba* durante a lactação. **Revista Brasileira de Zootecias**, Juiz de Fora, v. 8, n. 2, p. 91-98, 2006.
- HECKER, H.; JOHANNISSON, R.; KOCH, E.; SIEGERS, C.P. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. **Toxicology**, Amsterdam, v. 177, n. 2-3, p. 167-177, 2002.
- HOOD, R.D.; MILLER, D.B. Maternally mediated effects on development. In: Hood RD, editor. **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach**. 2. ed. Londres: Taylor & Francis; 2006.

- JACOBS, B.P.; BROWNER, W.S. *Ginkgo biloba*: a living fossil. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 108, n. 4, p. 341-342, 2000.
- KINJO, J.; HITOSHI, M.; TSUCHIHASHI, R.; 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. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 60, n. 1, p. 36-41, 2006.
- 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**, Stuttgart, v. 12, n. 1-2, p. 10-16, 2005.
- KUBOTA, Y.; TANAKA, N.; KAGOTA, S.; et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract feeding on salt-induced hypertensive Dahl rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 29, n. 2, p. 266-269, 2006.
- KUBOTA, Y.; TANAKA, N.; KAGOTA, S.; et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 58, n. 2, p. 243-249, 2006.
- LONGPRE, F.; GARNEAU, P.; CHRISTEN, Y.; RAMASSAMY, C. Protection by GBE 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 41, n. 12, p. 1781-1794, 2006.
- LU, Q.; YIN, X.X.; WANG, J.Y.; GAO, Y.Y.; PAN, Y.M. Effects of *Ginkgo biloba* on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 28, n. 6, p. 818-828, 2007.
- LUO, Y.; SMITH, J.V.; PARAMASIVAM, V.; et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract GBE761. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 19, p. 12197-121202, 2002.
- MAR, C.; BENT, S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. **The Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 171, n. 3, p. 168-171, 1999.
- MASTEIKOVA, R.; MUSELIK, J.; BERNATONIENE, J.; BERNATONIENE, R. Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures. **Medicina**, Kaunas, v. 43, n. 4, p. 306-309, 2007.
- McKENNA, D.J.; JONES, K.; 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, 2001.
- NATHAN, P.J.; HARRISON, B.J.; BARTHOLOMEUSZ, C. Ginkgo and memory. **The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 546, 2003.
- OECD Guideline for the testing of chemicals: prenatal developmental toxicity study: **Organization for Economic Co-operation and Development**, Paris, n. 414, 2001.
- ONDRIZEK, R.R.; CHAN, P.J.; PATTON, W.C.; KING, A. 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**, New York, v. 71, n. 3, p. 517-522, 1999.
- PINTO, R.M.; FERNANDES, E.S.; REIS, J.E.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* to rats. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 23, n. 4, p. 480-485, 2007.
- RAMASSAMY, C.; LONGPRE, F.; CHRISTEN, Y. *Ginkgo biloba* extract [GBE 761] in Alzheimer's disease: is there any evidence? **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 3, p. 253-262, 2007.
- SEGURA, M.A.M.; DELGADO, S.B.; TORRES, R.G. Aplicaciones clínicas del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba*. **Revista de Fitoterapia**, v. 1, n. 2, p. 95-105, 2000.
- SENER, G.; KABASAKAL, L.; YÜKSEL, M.; GEDIK, N.; ALICAN Y. Hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats is prevented by *Ginkgo biloba* treatment. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 35, p. 5444-5449, 2005.
- SIERPINA, V.S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. *Ginkgo biloba*. **American Family Physician**, Kansas City, v. 68, n. 5, p. 923-926, 2003.
- SMITH, D.G.; CAPPAL, R.; 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.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 4, p. 465-472, 2004.
- SPINKS, N.R.; O'NEILL, C. Antagonists of embryo-derived platelet-activating factor prevent implantation of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 84, n. 1, p. 89-98, 1988.
- TESCH, B.J. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 188, n. 5, p. S44-S55, 2003.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium: compêndio de fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 2001.

UMEGAKI, K.; SHINOZUKA, K.; WATARAI, K.; et al. *Ginkgo biloba* extract attenuates the development of hypertension in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 277-282, 2000.

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 anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 69, p. 9-15, 2000.

WELT, K.; WEISS, J.; MARTIN, R.; HERMSDORE, T.; DREWS, S.; FITZL, G. *Ginkgo biloba* extract protects rat kidney from diabetic and hypoxic damage. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 14, n. 2-3, 196-203, 2007.

WHEATLEY, D. Ginkgo and memory. **The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 5, p. 546-547, 2003.

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

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. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 864, n. 1-2, p. 87-94, 2008.

YAO, P.; LI, K.; SONG, F.; et al. Heme oxygenase-1 upregulated by *Ginkgo biloba* extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 1333-1342, 2007.

YUAN, G.; GONG, Z.; LI, J.; LI, X. *Ginkgo biloba* extract protects against alcohol-induced liver injury in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 3, p. 234-238, 2007.

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 International**, v. 26, n. 10, p. 1283-1290, 2006.