

# AUSÊNCIA DE TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA EM RATOS WISTAR TRATADOS COM EXTRATO SECO DE *GINGKO BILOBA* DURANTE O PERÍODO DE DESMAME À PUBERDADE

*ABSENCE OF REPRODUCTIVE AND SISTEMIC TOXICITY IN RATS TREATED WITH GINGKO BILOBA EXTRACT FROM WEANING TO PUBERTY*

Martha de Oliveira Guerra<sup>\*</sup>, Vera Maria Peters<sup>\*\*</sup>

## RESUMO

**Introdução:** O *Gingko biloba* (EGb) é um fitoterápico usado há séculos, porém com poucos estudos referentes a seus efeitos sobre o período pós-natal. Estudos dessa natureza vêm sendo preconizados pela Agência Europeia de Medicina, visto que muitos órgãos completam seu desenvolvimento nesse período, inclusive o sistema reprodutor. **Objetivo:** Avaliar o efeito do extrato seco de EGb sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor de ratos, tratados desde o desmame até o fim da puberdade. **Métodos:** Ratos Wistar foram tratados com 25mg/kg/massa corporal (EGb 25); 50 mg/kg (EGb 50) e 100 mg/kg (EGb 100). Controle (C – 0,1ml água destilada), por gavagem dos 25 aos 45 dias de vida pós-natal. **Variáveis observadas:** indícios clínicos de toxicidade sistêmica, peso corporal, descida dos testículos, evolução da morfologia da glândula, peso de rins, baço e fígado e dos órgãos do sistema reprodutor. Hematimetria, Concentração de hemoglobina. Concentração de espermatozoides na secreção epididimária. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças significativas em quaisquer das variáveis. **Conclusão:** A exposição ao extrato seco de EGb durante o período pré-puberal e puberal em ratos Wistar não altera o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino.

## PALAVRAS-CHAVE

*Gingko biloba*. Puberdade. Toxicidade. Rato.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Gingko biloba* extract (EGb) is a phytotherapeutic that has been used for centuries but there is no studies concerning their effects during the postnatal period. This kind of research had been suggested by the European Medicine Agency since there are organs that complete their development in this period, including reproductive organs. **Purpose:** To evaluate the effect of EGb dry extract upon the rat reproductive system from weaning to 45 postnatal days. **Methods:** Wistar rats were treated with 25mg/kg/body weight (EGb 25); 50 mg/kg (EGb 50) and 100 mg/kg (EGb 100). Control (C 0,1ml distilled water). **Variables:** clinical signs of systemic toxicity, body weight, testicles descent, evolution of glans morphology, kidneys, liver, spleen and reproductive organs weights. Hematimetry. Haemoglobin concentration. Sperm concentration in the epididymal secretion. **Results:** No significant differences were observed in none of the observed variables. **Conclusion:** The EGb dry extract exposition to prepuberal and puberal rats do not alter the reproductive system development.

## KEYWORDS

*Gingko biloba*. Puberty. Toxicity. Male rat.

## 1 INTRODUÇÃO

O extrato de *Gingko biloba* (EGb) é utilizado há séculos para diversas desordens, como aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (SUN et al., 2007), melhorar a agilidade mental (ROSENBLATT et al., 1997), tratamento da doença de Alzheimer (CLARK et al., 2001), na prevenção da demência e disfunção cognitiva (WEINMANN et al., 2010). Também

Correspondence author: Martha de Oliveira Guerra. martha.guerra@uff.edu.br. Centro de Biologia da Reprodução, Campus de Martelos, Rua José Lourenço Kelmer s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora, MG. Tel.: (5532) 2102-3255. FAX: (5532) 2102-3255.

<sup>\*</sup> Doutora. Centro de Biologia da Reprodução. Pesquisadora nível II CNPq. martha.guerra@uff.edu.br.

<sup>\*\*</sup> Doutora. Centro de Biologia da Reprodução. peters.vera@uff.edu.br.

Received: 05/2015

Accepted: 11/2015

são atribuídos ao EGb efeitos antiestresse e ansiolíticos, possivelmente pela inibição reversiva da monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B) (WHITE et al., 1996) e, além disso, também é usado na terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa (GOLD et al., 2007).

O EGb possui cerca de 300 compostos químicos, extraídos das folhas das árvores. O extrato padronizado para fins medicinais – EGb 761 – contém, aproximadamente, 24% de glicosídeos flavônicos (principalmente a quercetina, kaempferol, e isorhamnetina) e cerca de 6% de terpeno lactonas (VAN BEEK, 2002). É considerado um fitoestrógeno por alguns de seus flavonoides se ligarem aos receptores de estrogênio (ERs) por sua semelhança estrutural com o estradiol (E2 ou *17β-estradiol*) (ZHAO; MU, 2011).

O estrogênio desempenha papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da função reprodutiva do sexo masculino e da fertilidade (HESS et al., 2011). Camundongos machos *knockout* para receptores de estrogênio (ERαKO ou ERβKO) ou aromatase (ArKO) apresentaram redução da motilidade espermática, infertilidade, espermatogênese anormal e desorganização da estrutura testicular evidenciando a importância do estrogênio para as funções reprodutoras masculinas (HAMILTON; ARAO; KORACH, 2014).

Delbès, Levacher e Habert (2006) demonstraram que a deficiência de estrogênio, durante o desenvolvimento fetal, aumenta o número de células germinativas e a atividade esteroidogênica, enquanto sua ausência em adultos interfere negativamente no desenvolvimento das funções do sistema reprodutor masculino.

O efeito do estrogênio no desenvolvimento testicular e na espermatogênese se faz via receptores estrogênicos nucleares: receptor estrogênico α (ERα), receptor estrogênico β (ERβ) [1-3] e ER – “G protein-coupled estrogen receptor 1” (GPER) que foi identificado em células germinativas e somáticas do testículo (HESS et al., 2011; LUCAS et al., 2011; PROSSNITZ, 2008).

Devido à capacidade do EGb se ligar a receptores de estrogênio (ERs) (ZHAO, MU, 2011), *pode-se supor que tenha* potencial disruptor endócrino, capaz de interferir com a puberdade masculina – um período crítico do desenvolvimento que depende de regulação estrita de fatores hormonais, genéticos, parácrinos e outros.

Estudos relacionados à toxicidade reprodutiva e toxicidade do desenvolvimento do EGb 761 são escassos. Ratas Wistar tratadas com EGb durante o período de trânsito tubário e período de implantação não apresentaram mortes

embrionárias, retardo de crescimento ou malformações fetais (FERNANDES et al., 2010). Porém, retardo do crescimento intrauterino em fetos de ratas tratados com EGb foi observado durante o período de pós-implantação (PINTO et al., 2007). Em fêmeas de camundongos tratadas com EGb entre os dias 6-15 de prenhez não foram encontradas alterações na incidência de malformações, variações ou retardo no desenvolvimento dos fetos (AL-YAHYA et al., 2006). A toxicidade pós-natal foi avaliada em ratas tratadas com EGb durante o período de lactação, e as crias não tiveram alterações físicas, sensoriais e motoras em seu desenvolvimento (FARIA et al 2008).

Entretanto, não foram encontradas referências na literatura sobre a exposição do EGb durante o período da puberdade, considerando o seu potencial de união a receptores estrogênicos que, modificando o retrocontrole Estrogênio/FSH, pode alterar o equilíbrio hormonal necessário ao desenvolvimento gonadal adequado.

Diante destas informações pareceu importante avaliar o papel do *Ginkgo biloba* no desenvolvimento da puberdade em ratos.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 EXTRATO DE *GINGKO BILOBA*

O extrato de *Ginkgo biloba* utilizado foi fornecido pela JR Pharma (China – Lote nº 20130610). O teste de controle de qualidade feito pela Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda. mostrou que o EGb usado no experimento é composto por 24% de flavonoides, 6% de ginkgolídeos e 2,2% de bilobalídeos.

A metodologia usada foi adaptada dos *guidelines* da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 416 e 421) e International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH S5(R2)).

Foram utilizados 90 filhotes do sexo masculino, recém-desmamados, de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769), não isogênicos, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF) (CIAPE 01.0048.2013).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha não esterilizada, dotadas de cocho para ração do tipo peletizada Nuvilab CR1® da empresa Nuvital Nutrientes Ltda. (Colombo/PR) e local para

bebedouro com água filtrada. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados Alesco® com temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , em salas com controle de luminosidade respeitando o ritmo circadiano dos animais (ciclo de claro/escuro de 12 horas).

Os filhotes foram separados aleatoriamente em quatro grupos de 16 animais cada um e destinado para o grupo controle (C) ou tratados com EGb (EGb). O grupo C recebeu 1 ml de água destilada; os grupos tratados receberam 25 mg/kg/massa corporal (EGb 25); 50 mg/kg (EGb 50) e 100 mg/kg (EGb 100), por gavagem. A menor dose corresponde à dose terapêutica diária para humanos, convertida para ratos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007). A duração do tratamento foi do desmame até aos 45 dias de vida, quando os animais atingem a maturidade sexual (SILVA-LIMA et al., 2010).

Após o tratamento, os animais foram observados por 30 minutos para verificar indícios clínicos de toxicidade ou morte. Os animais foram pesados antes do início do tratamento, a cada três dias e no dia da eutanásia. Foram verificados dias de ocorrência da descida do testículo e das fases de evolução da morfologia da glândula.

Aos 60 dias, os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg) via intraperitoneal (WOLFENSOHN, 1994), submetidos à punção cardíaca para obtenção de sangue e, em seguida, foram eutanasiados por ruptura do diafragma.

O Gráfico 1 expressa a evolução do peso corporal dos animais ao longo do tratamento e no dia da eutanásia.

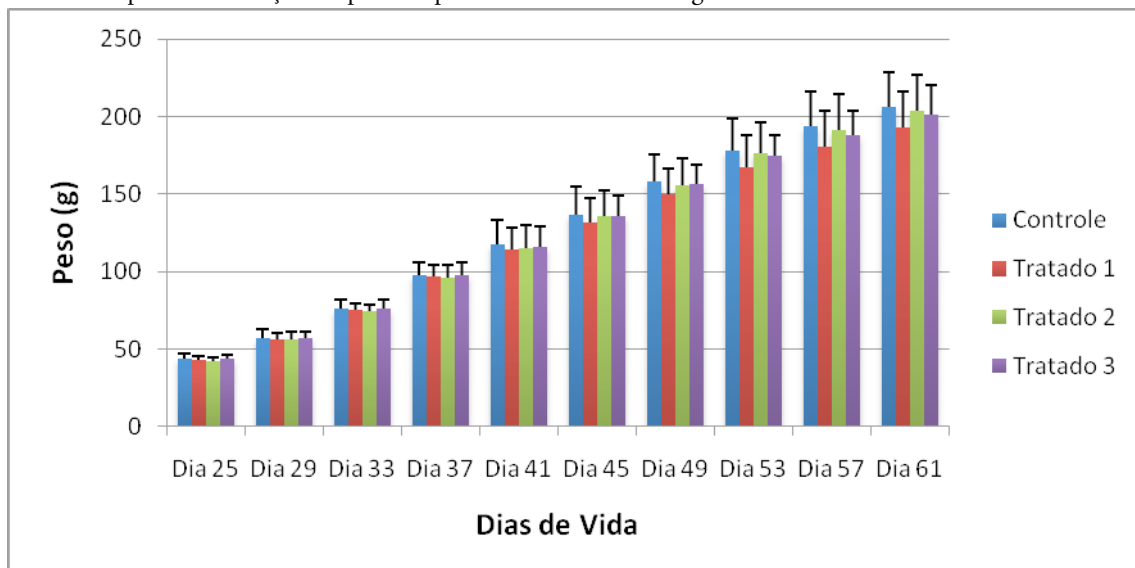


Gráfico 1: Peso corporal (g) de crias de ratas, tratadas com água destilada (Controle) e 25 mg/kg/massa corporal (EGb 25); 50 mg/kg (EGb 50) e 100 mg/kg (EGb 100), por gavagem, durante o período de puberdade.

$p > 0.05$

Fonte: Acervo dos autores.

Após a eutanásia, procedeu-se a obtenção de líquido epididimário para determinar a concentração espermática (SEED et al., 1996) após contagem em hemocitômetro, em microscópio óptico modelo BX41TF (Olympus® Tóquio, Japão), no aumento de 100x, utilizando-se da fórmula:

$$x = a \times 300 \times 10^4 \text{ onde } x = \text{concentração final de espermatozoide por ml e } a = \text{a média obtida de oito quadrados laterais do hemocitômetro.}$$

Em seguida, os seguintes órgãos foram removidos e pesados em balança de precisão: testículos, vesícula seminal, próstata, rim, baço, fígado, epidídimo esquerdo, obtendo-se deles o peso absoluto e relativo, exceto dos testículos.

No sangue foram realizadas análises hematológicas para determinação do hemograma completo e dosagem de ALT e creatinina.

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFJF – certificado nº 045/2013.

### 3 RESULTADOS

Não foram encontrados indícios de toxicidade clinicamente observáveis (perda ou ganho de peso; piloereção, alteração na deambulação, diarreia, sialorreia, cromadacriorreia) nos animais tratados.

Na Tabela 1 estão expostos os pesos relativos e absolutos dos órgãos de ratos tratados com EGb e controles.

Tabela 1: Peso absoluto (g) e relativo de órgão de ratos Wistar tratados com EGb do 25º dia pós-natal ao 45º. Grupos controle (1 ml de água destilada); Tratados com 25, 50, 100 mg de EGb (EGb 25; EGb 50; EGb 100)/kg de massa corporal, via oral, diariamente pela manhã. Eutanásia no 60º dia de vida.

	GRUPOS			
	Controle n= 16	EGb 25 n= 16	EGb 50 n= 16	EGb 100 n= 16
Peso absoluto(g)				
Testículo Direito	0,57 ± 0,05	0,59 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,58 ± 0,05
Testículo Esquerdo	0,60 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,57 ± 0,05
Vesícula Seminal	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Próstata	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,03
Epidídimo	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Rins (2)	0,89 ± 0,07	0,90 ± 0,07	0,86 ± 0,04	0,91 ± 0,07
Baço	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,03
Fígado	4,27 ± 0,33	4,54 ± 0,33	4,55 ± 0,31	4,55 ± 0,34
Peso relativo				
Epidídimo	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Vesícula Seminal	0,29 ± 0,06	0,29 ± 0,08	0,30 ± 0,04	0,31 ± 0,08
Baço	0,50 ± 0,06	0,48 ± 0,07	0,49 ± 0,06	0,50 ± 0,08
Fígado	9,68 ± 1,47	8,80 ± 1,46	9,29 ± 1,09	9,16 ± 1,12

p>0,05

Fonte: Acervo dos autores.

Na Tabela 2 estão expressas: as concentrações de espermatozoide, os dias em que se observaram a evolução da morfologia da glândula e a descida do testículo para o escroto, em animais dos grupos controle e tratados.

Tabela 2: Concentração de espermatozoides (concentração/ml) e morfologia da glândula/(dias de vida) em ratos Wistar com EGb do 25º dia pós-natal ao 45º. Grupos controle (1 ml de água destilada); tratados com 25, 50, 100 mg de EGb (EGb 25; EGb 50; EGb 100)/kg de massa corporal, via oral, diariamente pela manhã. Eutanásia no 60º dia de vida.

Variáveis	GRUPOS			
	Controle (n=16)	EGb25 (n=16)	EGb50 (n=16)	EGb100 (n=16)
Concentração de espermatozoides	3,05 ± 1,15	3,30 ± 1,54	3,34 ± 1,8	4,37 ± 2,48
Glande Fase A	34,87 ± 1,36	42,94 ± 1,06	35,25 ± 1,29	34,94 ± 1,48
Fase B	42,94 ± 1,06	43,94 ± 1,29	43,56 ± 1,50	43,44 ± 1,50
Fase C	43,94 ± 1,06	44,94 ± 1,29	44,56 ± 1,50	44,44 ± 1,50
Descida dos testículos	26,68 ± 2,71	26,09 ± 1,24	26,82 ± 1,37	25,86 ± 0,99

p> 0.05

Fonte: Acervo dos autores.

Na Tabela 3 são expostos os dados hematológicos e bioquímicos dos animais de todos os grupos estudados.

Tabela 3: Dados hematológicos e bioquímicos de ratos Wistar tratados com EGb do 25º dia pós-natal ao 45º. Grupos controle (1 ml de água destilada); tratados com 25, 50, 100mg de EGb (EGb 25; EGb 50; EGb 100)/kg de massa corporal, via oral, diariamente pela manhã. Eutanásia no 60º dia de vida.

Variáveis	GRUPOS			
	Controle (n=16)	EGb25 (n=16)	EGb50 (n=16)	EGb100 (n=16)
Hematimetria	45,63 ± 3,48	44,26 ± 3,12	43,80 ± 2,65	43,51 ± 4,11
Hemoglobina	16,50 ± 1,27	15,82 ± 1,33	15,47 ± 1,66	15,67 ± 1,37
ALT	68,53 ± 12,17	67,75 ± 7,38	69,25 ± 7,86	66,56 ± 12,89
Creatinina	0,38 ± 0,90	0,42 ± 0,73	0,47 ± 0,98	0,45 ± 0,15

p>0.05

Fonte: Acervo dos autores.

#### 4 DISCUSSÃO

O desmame dos filhotes de ratos, no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução, é feito aos 24-26 dias de vida pós-natal, quando a literatura relata que o aumento da secreção de FSH é máximo entre os dias 25 e 35 de vida, atingindo o pico aos 40 dias. O aumento da gonadotrofina promove o aparecimento de receptores no túbulo e une-se a eles promovendo a espermatogênese. O crescimento testicular acontece paralelamente com o aumento do FSH (revisão em OJEDA; SKINNER, 2003). Portanto, a exposição dos animais ao EGb se fez desde o início até o fim da puberdade, atendendo às preocupações da Agência Europeia de Medicina, visando estabelecer a segurança do uso de fármacos em pediatria (SILVA-LIMA et al., 2010). Nesse sentido, a avaliação do desenvolvimento pós-natal de ratos expostos ao extrato seco de *Ginkgo biloba* não só atende à regulamentação internacional como pode contribuir para estudos dos riscos e benefícios do fitoterápico.

Para avaliar a possibilidade de efeitos tóxicos sistêmicos os animais foram avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade – como alterações na deambulação, pelos eriçados, cromadacriorreia, diarreia e poliúria e o peso corporal – ao longo da exposição ao fármaco e também até a eutanásia. Nenhum dos sinais clínicos nem o peso corporal foram alterados durante o tratamento e até a eutanásia, como se observou no Gráfico 1, indicando que não ocorreu efeito tóxico clinicamente observável (SELLERS et al., 2007). Completando a sugestão de ausência de toxicidade geral, os pesos absolutos e relativos de órgãos relacionados à detoxicação, excreção e reação imunológica, como fígado, rins e baço (Tabela1), também não tiveram seus pesos

absolutos e relativos alterados. Além disso, a hematimetria e a hemoglobina tiveram concentrações semelhantes entre os grupos, e as dosagens de ALT e creatinina, indicativas de função hepática e renal (Tabela 3), também não diferiram entre os grupos, o que sugere ausência de toxicidade. Todos os dados apresentados levam à conclusão de que, avaliado por essas variáveis, o EGb não causa toxicidade sistêmica quando administrado a ratos impúberes.

Na avaliação de efeitos de substâncias sobre o sistema reprodutivo masculino, o peso dos órgãos é um dos parâmetros sensíveis utilizados (MANGELSDORF et al., 2003). Alterações no peso testicular podem indicar modificações estruturais no túbulo seminífero, edema intersticial e alteração na produção de espermatozoides (SELLERS et al., 2007). Além disso, Russell et al. (1990) sugerem que exista uma correlação forte entre o número de células germinativas presentes nas gônadas e o peso dos testículos. Como não foram notadas alterações significativas do peso testicular entre os grupos tratados, quando comparados com os controles (Tabela 1), é possível sugerir que o EGb não alterou a estrutura dos túbulos seminíferos ou a quantidade de células germinativas aí encontradas. Tal possibilidade é corroborada quando se verifica que a contagem de espermatozoides na secreção epididimária foi semelhante entre os grupos tratados, comparados aos controles (Tabela 2). Considerando tais dados, é possível concluir que a exposição de ratos impúberes ao EGb não interfere no processo de espermatogênese.

Embora a concentração plasmática de testosterona não tenha sido mensurada, os pesos inalterados dos órgãos testosterona – dependentes, como vesícula seminal e epidídimo (Tabela 1) – bem como a descida dos testículos

e as diferentes fases de evolução da morfologia da glândula (Tabela 2), são dados sugestivos de que a concentração do hormônio, provavelmente, estava adequada.

Em conclusão, pode-se dizer que, no modelo animal estudado e com as variáveis estudadas, o EGB, ministrado a ratos desde o desmame até a puberdade, não causa toxicidade sistêmica, não altera o sistema reprodutor masculino e não interfere na espermatogênese.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe técnica do CBR pelo excelente trabalho realizado, aos bolsistas de iniciação científica (Fapemig/UFJF) e ao Dr. João Evangelista de Paula Reis pelo fornecimento do extrato de *Ginkgo biloba*.

O trabalho foi financiado pela Rede Mineira de Bioterismo/Fapemig 31/11 e Toxifar 26/11 e foi realizado com apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil).

## 6 REFERÊNCIAS

- AL-YAHYA, A. A.; AL-MAJED, A. A.; AL-BEKAIRE, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; QURESHI, S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 222-228, 2006.
- CLARK, W. M.; RINKER, L. G.; LESSOV, N. S.; LOWERY, S. L.; CIPOLLA, M. J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in Mice. **Journal of the American Heart Association**, v. 32, p.1.000-1.004, 2001.
- DELBÈS, G.; LEVACHER, C.; HABERT, R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. **Reproduction**, v. 132, p. 527-538, 2006.
- FARIA, D. E. P.; BORGES, L. V.; PETERS, V. M.; REIS, J. E. P.; RIBEIRO, L. C.; SÁ, R. C. S.; GUERRA, M. O. Postnatal development of pups from nursing rats treated with *Ginkgo biloba*. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 185-189, 2008.
- FERNANDES, E. S. et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the embryo-fetal development in Wistar rats. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 89, p. 133-138, 2010.
- GOLD, E. B.; BAIR, Y.; UTTS, J.; GREENDALE, G. A.; UPCHURCH, D.; CHYU, L.; STERNFELD, B.; ADLER, S. 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**, v. 14, p. 612-623, 2007.
- GRUMBACH, M. M.; CONTE, F. A. Disorders of sex differentiation. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. (Ed.). **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 853-951.
- ICH Harmonised tripartite guideline detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5 (R2). Current *Step 4* version Parent Guideline dated 24 June 1993 (Addendum dated 9 November 2000 incorporated in November 2005).
- HAMILTON, K. J.; ARAO, Y.; KORACH, K. S. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. **Reproductive Biology**, v. 14, p. 3-8, 2014.
- HESS, R. A.; FERNANDES, S. A.; GOMES, G. R.; OLIVEIRA, C. A.; LAZARI, M. F.; PORTO, C. S. Estrogen and its receptors in review efferent ductules and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, p. 600-613, 2011.
- LUCAS, T. F. G.; ROYER, C.; SIU, E. R.; LAZARI, M. F. M.; PORTO, C. S. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 307-317, 2010.
- Mangelsdorf, L.; Buschmann, J.; Orthen, B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 37, p. 356-369, 2003.
- OECD. Guideline for the testing of chemicals n. 416. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43965303.pdf>>. Acesso em: 7 maio 2015.
- OECD. Guideline for the testing of chemicals n. 421. Disponível em: <[http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd\\_gl421.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_gl421.pdf)>. Acesso em: 7 maio 2015.
- OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. In: NELL, Jimmy D. (Ed.) **Knobil and Neill's: physiology of reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p. 2.061-2.126.
- PINTO, R. M. et al. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* to rats. **Reproductive Toxicology**, p. 23, p. 480-485, 2007.
- PROSSNITZ, E. R.; SKLAR, L. A.; OPREA, T. I.; ARTERBURN, J. B. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. **Trends in Pharmacological Science**, v. 29, p. 116-123, 2008.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.
- ROSENBLATT, M.; MINDEL, J. Spontaneous hyphema associated with ingestion of *Ginkgo biloba* extract. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1.108, 1997.

RUSSELL L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG, E. D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. 1. ed. Clearwater: Cache River Press, 1990.

SEED, J.; CHAPIN, R. E.; CLEGG, E. D. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, p. 237-244, 1996.

Sellers R. S.; Morton, D.; Michael, B.; et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for Toxicology studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 751-755, 2007.

SILVA-LIMA, B.; THEILADE-THOMSEN, M. D.; CARLEER, J.; VIDAL, J. M. et al. Juvenile animal studies for the development of pediatric medicine: a description and conclusions from a European medicine agency workshop on juvenile animal testing for non clinical assessors. **Birth Defect Research (Part B)**, v. 89, p. 467-473, 2010.

SUN, B. L.; YUAN, H.; XIA, Z. L.; ZHANG, S. M. et al. Effects of extract of *Ginkgo biloba* on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and cerebral blood flow in a rat model of subarachnoid hemorrhage. **International Journal of Neuroscience**, v. 117, p. 655-665, 2007.

VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography**, v. 967, p. 21-55, 2002.

WHITE, H. L.; SCATES, P. W.; COOPER, B. R. Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. **Life Sciences**, v. 58, p. 1.315-1.321, 1996.

WEINMANN, S.; ROLL, S.; SCHWARZBACH, C. et al. Effects of *Ginkgo biloba* in dementia: systematic review and meta-analysis. **BMC Geriatrics**, v. 17, p. 10-14, 2010. doi: 10.1186/1471-2318-10-14.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. New York: Oxford University Press, 1994. 304 p.

ZHAO, E.; MU, Q. Phytoestrogen biological actions on mammalian reproductive system and cancer growth. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, p. 1-20, 2011.