

EFEITO DO EXTRATO DE *GINKGOBILOBA* (EGB) SOBRE A TOXICIDADE SISTÊMICA E ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE RATOS WISTAR ADULTOS

EFFECT OF GINKGOBILOBA EXTRACT (EGB) ON SYSTEMIC TOXICITY AND ORGANS OF THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF ADULT WISTAR RATS

Leonardo Toshio Oshio^{*}; Cláudia Cristina Teixeira Ribeiro^{*}; Renato Macedo Marques^{*}; Martha de Oliveira Guerra^{*}; Sérgio Luís Pinto da Matta^{**}; João Evangelista de Paula Reis^{*}; Rita de Cássia da Silveira e Sá^{***}; Vera Maria Peters^{*}

RESUMO

O Extrato de *Ginkgobiloba* (EGB) é um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo. Entretanto ainda há escassez de ensaios toxicológicos em animais e o risco à exposição humana principalmente pelos compostos alquilfenóis, representados pelos ácidos ginkgólicos, que podem causar quadros alérgicos e serem compostos mutagênicos e carcinogênicos. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a toxicidade sistêmica do EGB. Oitenta ratos Wistar de três meses de idade foram tratados com água destilada (Grupo Controle) e extrato aquoso de *Ginkgobilobas* seguintes doses: 3,5 (EGB 3,5); 7,0 (EGB 7,0) e 14,0mg/kg (EGB 14,0) uma vez ao dia, por 56 dias consecutivos. Foram avaliados semanalmente, o peso dos animais (g) e a estimativa de consumo diário de ração (g). Índícios de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso, piloereção, diarreia, cromodacriorreia, estereotípias, alterações da atividade locomotora e comportamentais e mortes também foram monitorados. Após anestesia, o sangue dos animais foi coletado para avaliação de hemograma completo e dosagem bioquímica de ureia, creatinina e alanina aminotransferase (ALT). Após a eutanásia, os animais foram submetidos à necropsia e os testículos esquerdo e direito, epidídimo esquerdo, vesícula seminal repleta, próstata ventral, rins esquerdo e direito, fígado e baço foram removidos e pesados em balança de precisão. Durante todo o procedimento experimental não foram observados nos animais sinais clínicos de toxicidade sistêmica e mortes. Houve diferenças estatísticas da estimativa de consumo de ração na sexta semana e oitava semanas de avaliação, embora sem diferença no peso corporal. Não houve diferença no peso dos órgãos e na análise bioquímica sérica. Na avaliação hematológica dos animais, houve diferença estatística significativa na hemoglobinometria em que o grupo EGB 14,0 apresentou-se estatisticamente superior ao grupo EGB 3,5. A concentração de hemoglobina globular média também apresentou diferença estatística significativa, em que o EGB 3,5 apresentou médias inferiores aos grupos EGB 7,0 e EGB 14,0 e o grupo controle apresentou média inferior ao grupo EGB 14,0. Sugere-se que o EGB no presente trabalho, e com as doses utilizadas, não causou toxicidade sistêmica e nem provocou alterações em órgãos de ratos Wistar.

PALAVRAS-CHAVE

Ginkgobiloba, ratos, toxicidade, fitoterapia.

ABSTRACT

The *Ginkgobiloba* Extract (EGB) is one of the most commonly consumed herbal in the world. However there are still few toxicity tests on animals and the risk of human exposure mainly by alkyl compounds, represented by acids, which can cause allergies and are mutagenic and carcinogenic compounds. This study had the objective of evaluate the systemic toxicity of EGB. Eighty Wistar rats, three months of age were treated with distilled water (Control Group) and aqueous extract *Ginkgobilobas* following doses: 3.5 (EGB 3.5); 7.0 (EGB 7.0) and 14.0mg / kg (14.0 EGB) once a day for consecutive 56 days. Were evaluated weekly animal weight (g) and the estimated daily intake (g). Evidence of systemic signs of toxicity such as weight loss, piloerection, diarrhea, stereotypies and behavioral changes in motor activity and deaths were also monitored. After anesthesia, the animals were collected for evaluation of complete blood count and biochemical analysis of urea, creatinine and alanine aminotransferase (ALT). After euthanasia, the animals were autopsied and the left and right testis, left epididymis, seminal vesicle filled, ventral prostate, left and right kidneys, liver and spleen were removed and weighed on a precision scale. Throughout the experimental procedure were not observed in animals clinical signs of systemic toxicity and deaths. Were no statistical differences in the estimate of feed intake in the sixth week and eighth week evaluation, although no difference in body weight. There were no differences in organ weight and serum biochemical analysis. Hematological evaluation of the animals, there was a statistically significant difference in Hemoglobinometry where 14.0 EGB group was statistically higher than the EGB group 3.5. A mean corpuscular hemoglobin concentration also showed a statistically significant difference in the EGB 3 5 showed an average lower than 7.0 and EGB groups EGB 14.0 and the control group

showed less than 14.0 EGb group. It is suggested that EGb in this work, and the doses used, did not cause systemic toxicity nor caused changes in organs of Wistar rats.

KEYWORDS

Ginkgobiloba, rats, toxicity, phytoterapy.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que 80% da população mundial utilizem medicamentos extraídos de plantas para tratamento de enfermidades, uma vez que o uso de fitoterápicos tornou-se uma alternativa frente à dificuldade de acessibilidade à medicação convencional (PANDEY et al., 2011). Entretanto, a segurança ainda é questionada, pois muitos desses medicamentos são comercializados sem serem submetidos às análises toxicológicas recomendadas (MAR; BENT, 1999). A inocuidade, segurança e eficácia dos medicamentos tornaram-se de interesse das autoridades sanitárias e do público (WHO, 2000). Por esse motivo, avaliações dos riscos de um medicamento precisam ser analisadas no âmbito pré-clínico para detecção de toxicidade renal e hepática e efeitos nos sistemas hematopoiético, reprodutor e pele. Adicionalmente, estudos de carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade devem ser realizados (WHO, 1993).

O Extrato de *Ginkgobiloba* (EGb) é atualmente um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo, usado principalmente para quadros de demência, melhoria da circulação sanguínea periférica e doença de Alzheimer (OKEN; STORZBACH; KAYE, 1998; MAR; BENT, 1999; STROMGAARD; NAKANISHI, 2004). O EGb é uma mistura de cerca de 300 compostos químicos extraídos das folhas das árvores e geralmente possui entre 22 a 27% de glicosídeos flavonólicos (*flavonas*: quercetina, kaempferol e isorhamnetina; *biflavonas*: bilobetina, ginkgetina, isoginkgetina e sciadopitysina), entre 5 a 7% de terpeno trilactonas (*ginkgolídeos*: A, B, C e J) e menos de 5 ppm de ácidos ginkgólicos (WHO, 1999; VAN BEEK, 2002; SMITH; LUO, 2004; OH; CHUNG, 2004).

Embora não existam relatos epidemiológicos humanos da associação da exposição ao EGb e toxicidade ou risco ao câncer (CHAN et al., 2007), Fransen et al. (2010) descreveram o risco toxicológico do EGb e a escassez dos ensaios em animais. Os autores citaram a necessidade de uma investigação multidisciplinar para assegurar o uso deste fitoterápico. Siegers (1999) cita que os alquilfenóis, representados pelos ácidos ginkgólicos, são os

componentes tóxicos do extrato e podem causar quadros alérgicos e serem compostos mutagênicos e carcinogênicos. Koch et al. (2000) relataram efeitos imunotóxicos do extrato em camundongos ao causar reações linfoproliferativas se aplicados parenteralmente na pele. Por esse motivo, os extratos não devem ter mais do que 5ppm de alquilfenóis (SIEGERS, 1999; WHO, 1999; FRANSEN et al. 2010). Sierpina; Wollschlaeger; Blumenthal (2003) verificaram efeito inibidor sobre o fator de ativação de plaquetas e potencial efeito anticoagulante.

Um trabalho recente utilizando o EGb foi realizado pelo Programa Nacional em Toxicologia -National Toxicology Program- dos Estados Unidos em 2013 utilizando ratos F344/N e camundongos B6C3F1/N. Os animais receberam o EGb cinco vezes por semana durante dois períodos: três meses e dois anos nas doses de 100, 300 and 1.000 mg/kg de EGb em ratos e 200, 600 e 2.000 mg/kg em camundongos. Os animais demonstraram lesões de hipertrofia no fígado e na tireoide e hipertrofia e atrofia no epitélio nasal, levando à conclusão de que o EGb causou câncer da glândula tireoide tanto em ratos machos e fêmeas e em camundongos machos, além de câncer de fígado em camundongos machos e fêmeas.

Atualmente outras utilizações do EGb para tratamento da disfunção erétil decorrente do uso crônico de antidepressivos (KANG et al., 2002; MACKAY, 2004; MOYAD et al., 2004; WHEATLEY, 2004; TAMLER; MECHANICK, 2007) e como afrodisíaco (MALVIYA et al., 2011) tem sido relatadas, o que levou a um crescente consumo do extrato por homens. Embora haja plantas que são popularmente utilizadas para regular a fertilidade masculina (KAMAL; GUPTA; LOHIYA, 2003) não há muitos trabalhos que relatem especificamente o efeito do extrato de *Ginkgobiloba*. Al-Yahya et al. (2006) relataram diminuição do peso da cauda do epidídimo, da próstata, dos níveis de ácidos nucleicos testiculares, além da baixa taxa de prenhez e perdas pré-implantação de camundongos *Swiss* submetidos ao extrato. Entretanto, Yeh et al. (2009) evidenciaram que o EGb apresentou efeito protetor ao processo apoptótico em testículos de ratos tratados concomitantemente à doxorubicina, principalmente, pela vias anti-oxidativas. Predes et al. (2011) relataram que o EGb também promoveu efeito protetor contra as alterações provocadas pelo cádmio sobre as células de Sertoli, de Leydig e espermátides de ratos. Taepongsor et al. (2008) evidenciaram que a quercetina, um dos componentes do EGb, melhorou parâmetros reprodutivos como

Correspondence author: Leonardo Toshio Oshio. E-mail: leonardo.oshio@gmail.com

* Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036-330, Brasil

** Departamento de Biologia Geral/Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, CEP 36570-900, Brasil

*** Departamento de Fisiologia e Patologia/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, CEP 58051-900, Brasil

Received: 11/2013

Accepted: 01/2014

motilidade, vitalidade e concentração de espermatozoides, além de aumentar o peso testicular de ratos.

O trabalho objetivou verificar o efeito do extrato de *Ginkgobiloba*, no âmbito de toxicidade sistêmica, e sobre os órgãos do sistema reprodutor masculino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental seguiu as normas internacionais preconizadas no Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o número 016/2010.

2.1 O EXTRATO DE *GINKGOBILOBA*

O extrato de *Ginkgobiloba* foi importado da China e adquirido pela farmácia JR Pharma - Juiz de Fora - MG e a solução aquosa foi preparada pelo Prof. Dr. João Evangelista de Paula Reis. O controle de qualidade realizado pelo Laboratório Galena demonstrou que o extrato é composto de 28,2% de ginkgoflavoglicosídeos (15% de quercetina, 10,9% de kaempferol e 2,3% de isorhamnetina), 8,3% de terpenolactonas e menos que 5ppm de ácidos ginkgólicos.

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos da linhagem Wistar, com três meses de idade e de 250 gramas de peso médio, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF). Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 22±2°C, iluminação com ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49×3416 cm), forradas com maravalha não esterilizada, dotadas de cocho aramado para disposição de ração do tipo peletizada e bebedouro com água filtrada do tipo mamadeira de garrafa de polipropileno. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados ALESCO® e temperatura controlada de 22±2°C. O alojamento dos animais foi em salas com dispositivo para manter a iluminação com ciclo de claro/escuro de 12 horas. A proporção máxima de animais por gaiola foi de cinco indivíduos.

2.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS, DOSES DO EGB, VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E DURAÇÃO DO TRATAMENTO

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, um Controle (n=20) e três Tratados (n=20/grupo). O grupo Controle recebeu 1mL de água destilada e os grupos tratados

receberam: 3,5 mg/kg (EGB 3,5); 7,0 mg/kg (EGB 7,0) e 14,0mg/kg (EGB 14,0) do extrato aquoso de *Ginkgobiloba* (EGB) por dia. A menor dose correspondeu à dose terapêutica preconizada para humanos (WHO, 1999; BLUMENTHAL et al., 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003; SMITH; LUO, 2004). As doses de 7,0 mg/kg e 14,0 mg/kg corresponderam, respectivamente, ao dobro e quatro vezes a dose humana. O extrato foi administrado por via intragástrica, diariamente pela tarde, por 56 dias consecutivos, correspondendo à duração da espermatogênese em ratos (RUSSELL et al., 1990).

2.4 PESO DOS ANIMAIS E ESTIMATIVA DE CONSUMO DE RAÇÃO

Durante o experimento, foram avaliados semanalmente, o peso dos animais (g) e a estimativa de consumo diário de ração (g), obtida pela diferença entre a quantidade ofertada e a remanescente, 24 horas após o fornecimento (HOFFMAN et al., 2002). Após a administração do extrato de *Ginkgobiloba*, os animais foram observados por 30 minutos para a detecção de possíveis sinais clínicos de toxicidade aguda como alterações da atividade locomotora e comportamentais. Índícios de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso, piloereção, diarreia, cromodacrioreia, estereotípias e mortes também foram monitorados (OECD, 2009).

Um dia após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados pela técnica de exsanguinação total por punção cardíaca sob anestesia geral. O protocolo anestésico utilizado foi a associação dos medicamentos xilazina na dose de 10 mg/kg e quetamina na dose de 90 mg/kg, aplicados por via intraperitoneal (WOLFENSOHN; LLOYD, 1994).

2.5 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Foi realizado hemograma dos animais com o aparelho analisador hematológico automático modelo pocH-100iV Diff (Sysmex® - Japão). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através da análise de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico (Laborclin® - Brasil). Os parâmetros hematológicos analisados foram a hematimetria (10⁶/μL); hematócrito (%); hemoglobimetria (g/dL); volume globular médio (fL); hemoglobimetria globular média (pg); concentração de hemoglobina globular média (%); leucometria total (10³/L) e específica representada por valores proporcionais dos monócitos, linfócitos, segmentados e eosinófilos.

2.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA SÉRICA

Concentrações da enzima hepática alanina aminotransferase (UI/L) e de ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) foram medidas no

soro sanguíneo dos animais com o aparelho automático modelo LabmaxProgress(Labtest[®] - Brasil)e kits Labtest[®] (Brasil).

2.7 PESO DOS ÓRGÃOS

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à necropsia e tiveram os seguintes órgãos removidos e pesados em balança de precisão (Marte[®] - especificidade 0,0001g): testículos esquerdo e direito, epidídimo esquerdo, vesícula seminal repleta, próstata ventral, rins esquerdo e direito, fígado e baço.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Levene para avaliação quanto à distribuição dos dados. Para os dados com distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey. Para dados sem distribuição normal, foi usado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O nível de significância adotado para o presente estudo foi de 5%. Para comparações múltiplas com o teste de Mann-Whitney, exigiu-se nível de significância de 1%.

Para a análise estatística, utilizou-se o programa SPSS (StatisticalPackage for the Social Sciences), versão 13.0.

3 RESULTADOS

Durante todo o procedimento experimental, não foram observados nos animais, sinais de toxicidade sistêmica, como alterações da atividade locomotora e comportamentais, piloereção, diarreia, cromodaciorreia, estereotipias e mortes.

O peso dos animais não diferiu estatisticamente entre os grupos experimentais analisados em nenhuma das oito semanas de avaliação (Figura 1).

Nas oito semanas de avaliação da estimativa de consumo de ração de 24 horas, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos analisados e o grupo controle, com exceção da sexta semana de tratamento, em que o grupo controle ingeriu uma quantidade inferior do que os grupos tratados e da oitava semana em que o grupo controle apresentou um consumo inferior ao EGb 14,0 (Figura 2).

Na avaliação hematológica dos animais, houve diferença estatística significativa na hemoglobimetria em que o grupo EGb 14,0 apresentou-se estatisticamente superior ao grupo EGb 3,5. A concentração de hemoglobina globular média também apresentou diferença estatística significativa, em que o EGb 3,5 apresentou médias inferiores aos grupos EGb 7,0 e EGb 14,0 e o grupo controle apresentou média inferior ao grupo EGb 14,0 (Tabela 1).

Não houve diferença significativa entre os valores de concentração de alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina séricas (Tabela 1).

O peso médio dos testículos não apresentou diferença estatística significativa entre o grupo controle e os grupos tratados e entre os grupos tratados (Tabela 2). Os pesos relativos do baço, fígado e rins também não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos experimentais analisados. Os pesos relativos do epidídimo esquerdo, vesícula seminal repleta e próstata ventral também não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 2).

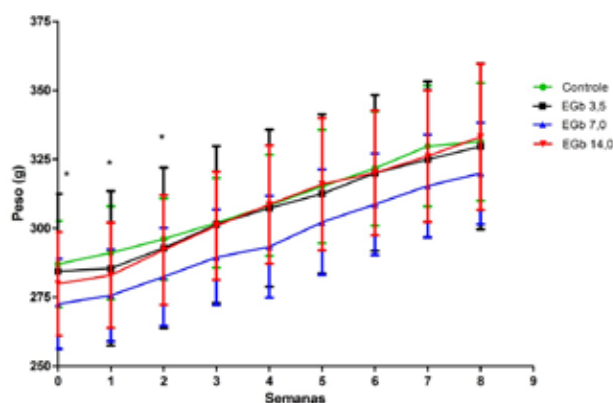


Figura 1 – Peso corporal (g),avaliado semanalmente, de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (1mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgobiloba* nas doses de 3,5(EGb 3,5); 7,0(EGb 7,0) e 14,0mg/kg (EGb 14,0) por 8 semanas. Dados expressos em média±desvio-padrão.

$p > 0,05$

*Foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis para avaliação de dados nas semanas 0, 1 e 2.

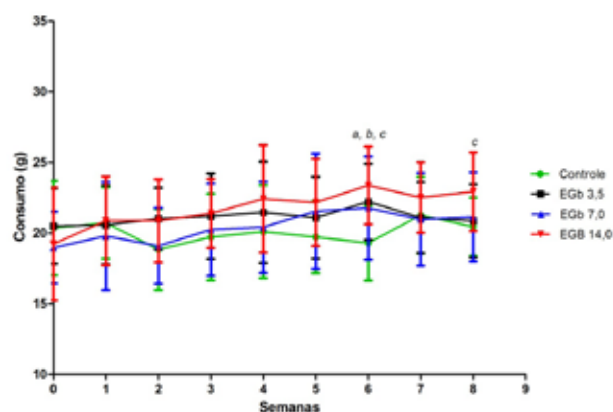


Figura 2 – Estimativa de consumo de 24 horas de ração (g), avaliado semanalmente em ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (1mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgobiloba* nas doses de 3,5(EGb 3,5); 7,0(EGb 7,0) e 14,0mg/kg (EGb 14,0) por 8 semanas.Dados expressos em média±desvio-padrão.

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA em todas as avaliações;

^a $p \leq 0,05$. O EGb 3,5 difere do Controle pelo teste *post hoc* de Tukey;

^b $p \leq 0,05$. O EGb 7,0 difere do Controle pelo teste *post hoc* de Tukey;

^c $p \leq 0,05$. O EGb 14,0 difere do Controle pelo teste *post hoc* de Tukey;

Tabela 1 – Parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (1mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgobiloba* nas doses de 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) por 56 dias consecutivos. Dados expressos em média±desvio-padrão.

	Controle (n=20)	EGb 3,5 (n=20)	EGb 7,0 (n=20)	EGb 14,0 (n=20)
HEM (10 ⁶ /μL)	8,35±0,44	8,33±0,36	8,51±0,42	8,55±0,35
HTC (%)	43,23±1,97	43,08±1,75	43,90±2,42	44,17±1,66
HG (g/dL)	15,56±0,69	15,48±0,59 ^b	15,97±0,83	16,10±0,62
VGM (fL)	51,83±0,87	51,77±0,74	51,61±0,74	51,71±0,74
HGM (pg)	18,65±0,31	18,60±0,44	18,77±0,31	18,83±0,37
CHGM (%)	36,00±0,44	35,91±0,49 ^{a,b}	36,35±0,41	36,40±0,51 ^c
LEU (10 ³ /μL)	7,36±1,86	7,38±1,93	7,40±2,26	7,48±1,62
MON (%)	4,80±2,14	4,85±1,27	5,80±2,33	4,70±2,30
LIN (%)	63,65±5,98	64,90±6,88	62,80±7,67	64,75±6,73
SEG (%)	30,50±6,89	29,60±6,92	30,30±6,95	29,20±5,45
EOS (%)*	0,85±0,99	0,75±0,79	0,85±1,04	1,35±1,39
ALT (UI/L)	58,60±11,08	62,25±8,29	60,60±8,75	57,90±10,09
URE (mg/dL)*	38,30±6,31	38,70±4,51	37,45±4,06	39,30±3,59
CRE (mg/dL)	0,58±0,05	0,59±0,07	0,57±0,08	0,56±0,07

*Foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis nos dados de contagem relativa de eosinófilos e dosagem sérica de ureia;

^ap≤0,05. O Grupo EGb 3,5 difere do EGb 7,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

^bp≤0,05. O Grupo EGb 3,5 difere do EGb 14,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

^cp≤0,05. O Grupo Controle difere do EGb 14,0 pelo teste *post hoc* de Tukey.

HEM – Hematimetria (10⁶/μL); HTC – Hematócrito (%); HG – Hemoglobimetria (g/dL); VGM – volume globular médio (fL); HGM – hemoglobimetria globular média (pg); CHGM – Concentração de hemoglobina globular média (%); LEU – Leucometria total (10³/μL); MON – Contagem relativa de monócitos (%); LIN – contagem relativa de linfócitos (%); SEG – Contagem relativa segmentados (%); EOS – Contagem relativa de eosinófilos (%); ALT – alanina aminotransferase (UI/L); URE – ureia (mg/dL); CRE – creatinina (mg/dL).

Tabela 2 – Pesos dos órgãos e glândulas do sistema reprodutor masculino de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (1mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgobiloba* nas doses de 3,5 (EGb 3,5); 7,0(EGb 7,0) e 14,0mg/kg (EGb 14,0) por 56 dias consecutivos.Dados expressos em média±desvio-padrão.

	Controle (n=20)	EGb 3,5 (n=20)	EGb 7,0 (n=20)	EGb 14,0 (n=20)
PT (g)	1,39±0,10	1,33±0,11	1,38±0,15	1,40±0,11
PE	0,16±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01	0,17±0,02
PVS*	0,39±0,05	0,41±0,05	0,42±0,05	0,40±0,07
PPV	0,15±0,02	0,15±0,03	0,16±0,04	0,16±0,04
PR	0,35±0,03	0,36±0,03	0,35±0,03	0,35±0,04
PB*	0,18±0,04	0,17±0,02	0,18±0,02	0,17±0,02
PF	3,38±0,22	3,48±0,17	3,36±0,24	3,36±0,29

p>0,05

*Foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis para avaliação de dados dos pesos relativos da vesícula seminal e do baço;

PT – Peso absoluto médio dos testículos (g); PE – Peso relativo do epidídimo esquerdo; PVS – Peso relativo da vesícula seminal; PPV – Peso relativo da próstata ventral; PR – Peso relativo médio dos rins; PB – Peso relativo do baço; PF – Peso relativo do fígado.

4 DISCUSSÃO

A avaliação toxicológica de uma substância em modelos animais é importante para o estabelecimento do potencial risco humano e é uma etapa necessária para garantir a segurança de um medicamento (ASARE et al., 2011). Para esse fim, os protocolos internacionais fornecem diretrizes úteis e recomendações dos testes a serem utilizados (OECD, 2009).

Os sinais clínicos são uma importante ferramenta para verificar se uma substância possui potencialidade tóxica, ou se a mesma pode atuar sobre os principais sistemas orgânicos. Alterações nos olhos, pele, pelagem, mucosas, trato respiratório e digestivo podem fornecer indícios de toxicidade sistêmica. A verificação de estereotípias, ou modificações comportamentais, como letargia, comportamentos compulsivos com lambeduras persistentes, excitação, tremores, convulsões e coma podem indicar atividade da substância sobre o sistema nervoso central (OECD, 2009). No período experimental,

nenhum animal apresentou os sinais anteriormente citados e nenhum apresentou-se em estado moribundo que necessitasse de ser humanamente eutanasiado.

O peso dos órgãos fornece informações para avaliações preliminares dos testes toxicológicos, pois pode indicar lesões nos sistemas dos quais eles fazem parte. Alterações no peso do fígado podem sugerir uma hipertrofia hepatocelular e, no caso dos rins, hipertrofia tubular ou doença crônica progressiva (SELLERSet al., 2007). A determinação da concentração de substâncias séricas como a ureia e creatinina podem sugerir possíveis lesões renais, assim como a determinação de ALT, pode sugerir uma lesão hepática. Como no presente trabalho não houve alteração do peso dos órgãos e na dosagem bioquímica sérica, pode-se inferir que o EGb não promoveu toxicidade renal e hepática nos animais.

A avaliação do tecido sanguíneo, na contagem dos seus elementos celulares, assim como a verificação do peso do baço podem fornecer indícios de toxicidade hematopoiética. O efeito de uma substância sobre este tecido apresenta padrões de mudanças em mais de uma característica analisada porque elas estão inter-relacionadas (GAD, 2006). Estudos de toxicidade hematopoiética em ratos foram realizados por Panuntoet al. (2010) utilizando *Terminaliachebula*, uma planta popularmente utilizada como laxante e expectorante. À semelhança com o presente estudo, houve diferença estatística nos valores hematológicos da série vermelha. Contudo, os autores não consideraram como efeito do fitoterápico pela variabilidade não ter ocorrido em níveis elevados. Portanto, apesar dos resultados terem demonstrado diferença significativa na hemoglobinometria e na concentração de hemoglobina globular média, compreendeu-se que essas diferenças não foram atribuídas à ação do EGb.

Segundo Hoffman et al. (2002), as avaliações semanais pontuais do peso dos animais e da estimativa de consumo diário de ração de uma sequência temporal podem fornecer dados importantes para avaliação de sinais de toxicidade de um medicamento. Como não foi notada nenhuma alteração nesses parâmetros, pode-se inferir que o EGb não provocou toxicidade sistêmica nos animais.

Quanto à avaliação de toxicidade sistêmica, o presente estudo concorda com os achados de Pinto et al. (2007), Faria et al. (2008) e Fernandes et al. (2010) que demonstraram ausência de toxicidade materna em ratas Wistar.

A avaliação do peso de órgãos do sistema reprodutor masculino é um dos parâmetros mais sensíveis para detecção da influência de substâncias (MANGELSDORF et al., 2003). Alterações no peso testicular podem indicar modificações nos túbulos seminíferos ou edema intersticial e conseqüentemente, na produção de espermatozoides. No caso do epidídimo, uma redução do peso pode indicar uma menor produção de espermatozoides pelo testículo e, no caso de aumento, edema ou inflamação (SELLERSet al., 2007).

Em conclusão, como não foi notada diferença estatística nos pesos dos órgãos do sistema reprodutor masculino, sugere-se que o EGb, nas doses utilizadas no estudo, não alterou os órgãos do sistema reprodutor masculino e nem casou toxicidade sistêmica nos animais.

5 REFERÊNCIAS

- AL-YAHYA, A. A. et al. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107 p.222–228, 2006.
- ASARE, G. A. et al. Acute toxicity studies of aqueous leaf extract of *Phyllanthusniruri*. **Interdisciplinary Toxicology**, v.4, n.4, p.206–210, 2011.
- BLUMENTHAL, M.; BRINCKMANN, J.; WOLLSCHLAEGER, B. *Ginkgo biloba*. In: **The ABC Clinical Guide to Herbs**. New York: Thieme, 2003. p.185-200.
- CHAN, P. C. et al. *Ginkgo biloba* leaf extract : biological, medicinal, and toxicological effects. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v.25, n.3, p.211-244, 2007.
- FARIA, D. E. P. et al. 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.
- FRANSEN, H. P. et al. Assessment of health claims, content, and safety of herbal supplements containing *Ginkgo biloba*. **Food & Nutrition Research**, 54: 5221 - DOI: 10.3402/fnr.v54i0.5221, 2010.
- GAD, S. **Statistics and experimental design for toxicologists and pharmacologists**. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, 2006. 567p.
- HOFFMAN, W. P. et al. Analysis of Rodent Growth Data in Toxicology Studies. **Toxicological Sciences**, v.66, p.313-319, 2002.
- KAMAL, R.; GUPTA, R. S.; LOHIYA, N. K. Plants for Male Fertility Regulation. **Phytotherapy Research**, v.17, p.579-590, 2003.
- KANG, B. J. et al. A placebo-controlled, double-blind trial of *Ginkgo biloba* for antidepressant-induced sexual dysfunction. **Human Psychopharmacology: Clinical & Experimental**, v.17, n.6, p.279–284, 2002.

- KOCH, E. et al. Evidence for immunotoxic effects of crude *Ginkgo biloba* L. leaf extracts using the popliteal lymph node assay in the mouse. **International Journal of Immunopharmacology**, v.22, p.229-236, 2000.
- MACKAY, D. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. **Alternative Medicine Review**, v. 9, p. 4-16, 2004.
- MALVIYA, N. et al. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction – a review. **Acta Polonicae Pharmaceutica – Drug Research**, v.68, n.1, p.3-8, 2011.
- MANGELSDORE, I. et al. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.37, p.356-369, 2003.
- MAR, C.; BENT, S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. **West Journal of Medicine**, v.171, p.168–71, 1999.
- MOYAD, M. A. et al. Prevention and treatment of erectile dysfunction using lifestyle changes and dietary supplements: what works and what is worthless, part II. **The Urologic Clinics of North America**, v.31, p.259–273, 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório**. Goiânia: National Academy Press, 2003. 162p.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of *Ginkgo biloba* extract (CAS NO. 90045-36-6) in F344/N rats and B6C3F1/N mice (gavage studies)**. NIH Publication No. 13-5920. National Institutes of Health, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, 2013.
- OECD. Test Guideline 452. OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Chronic Toxicity Studies, 2009. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_9789264071209-en;jsessionid=1t5rnshjgi83k.epsilon> Acesso: 13 jun. 2012.
- OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sciences**, v.74, p.1325–1335, 2004.
- OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A. The efficacy of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v.55, p.1409-1415, 1998.
- PANDEY, M. et al. An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v.3, n.3, p.27-37, 2011.
- PINTO, R. M. et al. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* rats. **Reproductive Toxicology**, p.23, p.480-485, 2007.
- PREDES, F. S. et al. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. **Biological Trace Element Research**, v.140, p. 330-341, 2011.
- RUSSELL, L. D. et al. **Histological and histopathological evaluation of the testis**, 1st ed. Cache River Press, Clearwater, 1990.
- SELLERS, R. S. et al. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.751-755, 2007.
- SIEGERS, C. P. Cytotoxicity of alkylphenols from *Ginkgo biloba*. **Phytomedicine**, v.6, n.4, p.281-283, 1999.
- SIERPINA, V. S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. *Ginkgo biloba*. **American Family Physician**, v. 68, p.923-926, 2003.
- SMITH, J. V.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.465–72, 2004.
- STROMGAARD, K.; NAKANISHI, K. Chemistry and biology of terpenoid lactones from *Ginkgo biloba*. **Angewandte Chemie International Edition**, v.43, n.13, p.1640-1658, 2004.
- TAE PONGSORAT, L. et al. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in male rats. **Asian Journal of Andrology**, v.10, n.2, p.249-258, 2008.
- TAMLER, R.; MECHANICK, J. I. Dietary supplements and nutraceuticals in the management of andrologic disorders. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.36, p.533-552, 2007.
- VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography A**, v.967, n.1, p.21-55, 2002.
- WHEATLEY, D. Triple-blind, placebo-controlled trial of *Ginkgo biloba* in sexual dysfunction due to antidepressant drugs. **Human Psychopharmacology: Clinical & Experimental**, v.19, n.8, p.545–548, 2004.
- WHO (World Health Organization). Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific, 1993. 94p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/2.2.html#Jh2946e>> Acesso: 15 jun. 2012.

WHO (World Health Organization).Folium Ginkgo. In: **WHO Monographs on selected medicinal plants**, v.1. Geneva: World Health Organization, 1999. p.154–167.

WHO (World Health Organization).**General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**.Geneva: World Health Organization, 2000. 74p.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of laboratory animal management and welfare**.New York: Oxford University Press Inc, 1994. 304p.

YEH, K. -Y. et al. A standardized extract of *Ginkgo biloba* suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. **British JournalofPharmacology**, v.156, p.48-61, 2009.