

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-graduação em Saúde  
Área de Concentração em Saúde Brasileira

Leonardo Toshio Oshio

**EFEITO DO EXTRATO DE *GINKGO BILOBA* (EGb) SOBRE O SISTEMA  
REPRODUTOR MASCULINO DE RATOS WISTAR ADULTOS**

JUIZ DE FORA  
2012

**LEONARDO TOSHIO OSHIO**

**EFEITO DO EXTRATO DE *GINKGO BILOBA* (EGb) SOBRE O SISTEMA  
REPRODUTOR MASCULINO DE RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde: Área de Concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Maria Peters

JUIZ DE FORA

2012

Oshio, Leonardo Toshio.

Efeito do extrato de Ginkgo Biloba (EGb) sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos / Leonardo Toshio Oshio . – 2012. 97 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Brasileira)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Fitoterapia. 2. Ginkgo Biloba. 3. Ratos I. Título.

CDU 615.322

Título da Dissertação

"Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos"

Nome do aluno

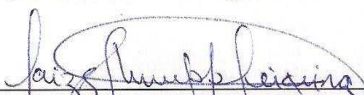
Leonardo Toshio Oshio

ORIENTADORA:


Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Maria Peters

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovada em 31 de agosto de 2012

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Taiza Stumpp Teixeira

  
Prof. Dr. Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Maria Peters

*Dedico este trabalho aos meus pais, Totian (Hiroshi Oshio) e Katian (Maria Ycuko Muraoka Oshio), e aos meus irmãos, Kenn Oshio e Simony Satsuki Oshio*

## **Agradecimentos**

Inúmeras pessoas e instituições contribuíram para a concretização deste trabalho, sem as quais nunca teria sido possível a sua realização:

A Deus por me conceder a oportunidade e proporcionar os meios para chegar até aqui.

Ao Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF) pelo fornecimento das instalações, laboratórios, modelo experimental, funcionários e toda a logística para o desenvolvimento do projeto.

À Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia (TOXIFAR/Fapemig) pelo financiamento do projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À minha família que me proporcionou o apoio emocional, me incentivou, entendeu minhas ausências devido às exigências do trabalho e me ajudou a alcançar os meus sonhos.

À Professora Vera Maria Peters e à Professora Martha de Oliveira Guerra, por terem me recebido e me orientado com paciência, exigência e rigor e que contribuíram para essa etapa de minha formação profissional.

À Pós-graduação em Saúde da UFJF - Professora Darcília, Carlos e Cristina pela orientação quanto ao funcionamento do programa e auxílio na participação do Congresso da SBCAL.

À Clínica Veterinária São Francisco e ao Dr. Ricardo Palhares Zschaber de Araújo pela confiança e pela indicação ao CBR.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa e ao Professor Sérgio Luis Pinto da Matta por terem disponibilizado material e orientação para realização da histologia e histometria testiculares que promoveram enriquecimento e melhoraram a qualidade do estudo. Aos amigos Kyvia Lugate, Mayte Balarini, Ana Paula de Lima Florentino Matta, Alex Bhering, Professora Mariana Neves e todos da UFV pela ajuda nas atividades de processamento histológico e microtomia.

À Professora Ana Paula Ferreira do Laboratório de Imunologia da UFJF e aos colegas Caio César Souza Alves e Sandra Bertelli Ribeiro de Castro que auxiliaram na definição do teste ELISA e à Dra. Fernanda Matos Coelho pelo auxílio na programação do aparelho leitor de microplacas.

À Professora Taiza Stumpp Teixeira pelas correções do projeto e pela orientação. Ao Professor João Evangelista de Paula Reis pelo preparo e fornecimento do extrato de *Ginkgo biloba*. Ao Professor Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira pelo aceite de participação como membro de banca avaliadora.

À Lorena Ribeiro pelos conselhos, amizade e companheirismo desde o início das minhas atividades no CBR. À Cláudia Cristina Teixeira Ribeiro por ter dividido todas as responsabilidades na execução desse projeto e pela amizade. À Juliana Raso Becho pelo ensinamento dos passos iniciais das técnicas necessárias para a avaliação do sistema reprodutor masculino.

Aos amigos do CBR: Ana Paula, Marcella, Renato, Hussen, Dayana, Paulinho, Paulo Matola, Flávia, Aline, Leda, Julieta, Clemílson, Leandro Alcântara, Bruno, José Wilson, Luiz Franco, Evelise, Raquel, Luiz Carlos, Layla, Mara, Gilson, João, Jasmin, Professora Beatriz, Juliana Polisseni, Jéssica, Graziela, Tatianne, Pedro, Rafaela, Janaína, Leandro Vespoli, Vinícius e Renata Pinhati pelo companheirismo.

Aos amigos da Clínica Veterinária São Francisco: Altair, Pedro, João, Gelcimar, Ralph, Helizete, Sandra, Tereza, Cátia, Edméa, Patrícia, Fabiano, Guilherme e Alexandre. À Daniela, Renata, Gabriela, Cristiane, Cleide e Luiz Alberto pelos conselhos, amizade e pela compreensão nos dias mais difíceis. À Aparecida Tresse, Márcia Prata e Juliana Munique pela amizade.

Aos amigos Edson e Douglas pelo terem me recebido em minhas idas a Viçosa para realização de partes do experimento.

Ao meu fiel companheiro felino Kenzo, que ficou ao meu lado durante toda a redação da dissertação.

E à cidade de Juiz de Fora e ao seu povo que tão bem me acolheu, hospitalidade típica de Minas Gerais.

*A todos, o meu muito obrigado!*

*Respeito, agradecimentos e homenagens especiais a todos os animais utilizados em experimentação, cujo nobre papel propiciou à humanidade, entendimento, prevenção e tratamento para inúmeras enfermidades.*



## Resumo

O Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo e tem sido utilizado no tratamento da disfunção erétil e como afrodisíaco. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade sistêmica do EGb e o efeito sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar. Oitenta animais de três meses de idade foram tratados com água destilada (Grupo Controle) e extrato aquoso de *Ginkgo biloba* nas seguintes doses: 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) uma vez ao dia, por 56 dias consecutivos. Foram avaliados o peso corporal, estimativa de consumo diário de ração, indícios de sinais clínicos de toxicidade, peso de órgãos e glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino e dados histométricos testiculares. Espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo e foram submetidos à contagem e avaliados quanto à vitalidade e morfologia. Foram realizados hemograma completo, dosagem bioquímica sérica de ureia, creatinina e alanina aminotransferase (ALT) e concentração de testosterona total sérica. Não foram observados nos animais sinais clínicos de toxicidade sistêmica e mortes. Apesar de ter ocorrido diferenças estatísticas significativas na estimativa de consumo de ração, hemoglobinometria, concentração de hemoglobina globular média e volume das células de Leydig, concluiu-se que o EGb no presente trabalho, e com as doses utilizadas, não causou toxicidade sistêmica nem promoveu alteração na morfometria testicular e qualidade espermática de ratos Wistar.

**Palavras-chave:** *Ginkgo biloba*, ratos, toxicidade, fitoterapia, túbulo seminífero, célula de Leydig, espermatozoides.

## Abstract

*Ginkgo biloba* Extract (GBE) is one of the most consumed herbal medicines in the world and it has been used in the treatment of erectile dysfunction and as an aphrodisiac. The present study had as objective to evaluate the GBE systemic toxicity and its effect on male reproductive system of Wistar rats. Eighty animals of three-month-old age were treated with distilled water (Control Group) and aqueous extract of *Ginkgo biloba* in the following doses: 3.5 (GBE 3.5); 7.0 (GBE 7.0) and 14.0 mg/kg (GBE 14.0) once per day, for 56 consecutive days. Body weight, daily food consumption estimation, toxicity clinical signs evidences, male reproductive system organs and accessory glands weights and testis histometric analysis data were evaluated. Spermatozoa were collected from the cauda epididymis and were subjected to counting and evaluations of vitality and morphology. Complete blood count test, serum biochemistry test of urea, creatinine and alanine aminotransferase (ALT) and total serum testosterone levels were realized. Clinical signs of systemic toxicity and deaths were not seen. In spite of it had had significant statistical differences on daily food consumption estimation, hemoglobinometry, mean corpuscular hemoglobin concentration and Leydig cell volume, it was concluded that GBE in the present study and with the doses used, did not cause systemic toxicity nor promoted alterations on testicular morphometry and spermatic quality of Wistar rats.

**Keywords:** *Ginkgo biloba*, rats, toxicity, phytotherapy, seminiferous tubules, Leydig cells, spermatozoa.

## Sumário

1. Introdução geral .....	13
2. Revisão de literatura .....	15
2.1 Sistema reprodutor masculino .....	15
2.1.1 O testículo .....	15
2.1.2 O epidídimo .....	16
2.1.3 As glândulas acessórias .....	17
2.1.3.1 A próstata .....	17
2.1.3.2 As vesículas seminais .....	18
2.1.3.3 As glândulas bulbouretrais .....	18
2.2 O eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular .....	18
2.3 Espermatogênese .....	19
2.4 O papel do estrógeno na reprodução masculina .....	21
2.5 Substâncias estrogênicas exógenas e o sistema reprodutor masculino .....	23
2.6 Síndrome da disgenesia testicular e exposição aos contaminantes ambientais .....	24
2.7 Fitoterapia e fitoestrógenos .....	26
2.8 <i>Ginkgo biloba</i> .....	27
3. Hipótese .....	31
4. Objetivos .....	32
5. Material e métodos .....	33
5.1 O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> .....	33
5.2 Animais .....	33
5.3 Procedimento experimental .....	34
5.4 Análise hematológica .....	35
5.5 Análise bioquímica sérica .....	35
5.6 Dosagem hormonal sérica de testosterona .....	36
5.7 Contagem dos espermatozoides .....	36
5.8 Avaliação da vitalidade espermática .....	37
5.9 Avaliação da morfologia espermática .....	38
5.10 Peso dos órgãos .....	39
5.11 Análise histométrica testicular .....	40
5.11.1 Densidade volumétrica dos compartimentos testiculares tubular e	

intertubular .....	41
5.11.2 Volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular e índice tubulossomático .....	42
5.11.3 Diâmetros do túbulo seminífero e do lúmen tubular e altura do epitélio seminífero .....	43
5.11.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo .....	44
5.11.5 Densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular .....	45
5.12 Análise estatística .....	47
6. Referências .....	48
7. Resultados .....	58
Artigo 1	
O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb) não causa toxicidade sistêmica e não altera órgãos do sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos .....	58
Resumo.....	58
1. Introdução .....	59
2. Material e métodos .....	60
2.1 O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> .....	61
2.2 Animais .....	61
2.3 Grupos experimentais, doses do EGb, vias de administração e duração do tratamento .....	61
2.4 Peso dos animais e estimativa de consumo de ração .....	62
2.5 Análise hematológica .....	62
2.6 Análise bioquímica sérica .....	63
2.7 Peso dos órgãos .....	63
2.8 Análise estatística .....	63
3. Resultados .....	63
4. Discussão .....	68
5. Referências .....	70
Artigo 2	
O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb) não altera a morfometria testicular, concentração sérica de testosterona e a qualidade espermática em ratos Wistar adultos .....	74
Resumo .....	74

1. Introdução .....	75
2. Material e métodos .....	77
2.1 O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> .....	77
2.2 Animais .....	77
2.3 Grupos experimentais, doses do EGb, vias de administração e duração do tratamento .....	78
2.4 Contagem dos espermatozoides .....	78
2.5 Avaliação da vitalidade espermática .....	79
2.6 Avaliação da morfologia espermática .....	79
2.7 Preparo dos tecidos .....	79
2.8 Análise histométrica testicular .....	80
2.8.1 Densidade volumétrica dos compartimentos testiculares tubular e intertubular .....	80
2.8.2 Volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular e índice tubulossomático .....	81
2.8.3 Diâmetros do túbulo seminífero e do lúmen tubular e altura do epitélio seminífero .....	81
2.8.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo .....	82
2.8.4 Densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular .....	82
2.9 Dosagem hormonal sérica de testosterona .....	83
2.10 Análise estatística .....	83
3. Resultados .....	83
4. Discussão .....	89
5. Referências .....	91
8. Conclusão .....	96
9. Anexos .....	97
9.1 Certificado de aprovação do projeto “Efeito do extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb) sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar” na Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora .....	97

## 1. Introdução geral

Uma redução progressiva na concentração de espermatozoides em homens tem sido observada ao longo das últimas décadas. Relata-se que esse número reduziu de 113 milhões de espermatozoides/mL de ejaculado em 1940 para 66 milhões de espermatozoides/mL em 1990 (CARLSEN et al., 1992). Atualmente, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a concentração é de 15 milhões/mL (WHO, 2010). Apesar dessa comparação não ter considerado as diferenças regionais e étnicas da população humana, as diversas técnicas e a falta de padronização, compreendeu-se que houve redução da fertilidade humana ao longo dos anos. A modificação do estilo de vida e a exposição a novas substâncias podem ser as principais causas desse fenômeno biológico. Ao mesmo tempo, ocorreu aumento na incidência de anormalidades geniturinárias como tumores testiculares, criptorquidismo, hipospadias e outras malformações do sistema reprodutor masculino (SWAN; ELKIN; FENSTER, 2000; ANDERSON, 2005).

Evidências de que a exposição aos contaminantes químicos, categorizados como metais pesados, agroquímicos e químicos industriais possam causar efeitos sobre o sistema reprodutor masculino vem aumentando (HAUSER; SOKOL, 2008). Muitas dessas substâncias, incluindo também os fitoestrógenos presentes em muitos fitoterápicos, podem atuar como desreguladores endócrinos ao mimetizarem a ação do estrogênio endógeno e alterar a fisiologia reprodutiva (WARING et al., 2008; PATISAUL; ADEWALE, 2009).

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é um fitoterápico que vem sendo utilizado para distúrbios de disfunção erétil em pacientes com 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). Os componentes flavonólicos do extrato (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) apresentaram efeito estrogênico ao se ligarem a receptores estrogênicos *in vitro* (OH; CHUNG, 2004) e antiestrogênico por ativar as vias de catabolismo do estrogênio em doses elevadas (OH; CHUNG, 2006).

Estudos com animais utilizando o EGb ou de seus componentes isolados demonstraram efeitos contraditórios. Al-Yahya et al. (2006) relataram diminuição do

peso da cauda do epidídimo, da próstata, dos níveis de ácidos nucléicos testiculares, além da baixa taxa de prenhez e perdas pré-implantação de camundongos *Swiss* submetidos ao extrato. Taepongsorat et al. (2008) evidenciaram que a quercetina, um dos componentes do EGb, melhorou parâmetros reprodutivos como motilidade, vitalidade e concentração de espermatozoides, além de aumentar o peso testicular de ratos.

Devido ao risco populacional de exposição ao EGb e dos relatos contraditórios na literatura, buscou-se no presente trabalho, avaliar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino é constituído pelos testículos, epidídimos, ductos deferentes, pênis e glândulas acessórias (SETCHELL; BREED, 2006), representadas pela próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006). A função do sistema reprodutor masculino é a produção, maturação, armazenagem e condução dos gametas masculinos, denominados espermatozoides, além da produção de hormônios androgênicos.

#### 2.1.1 O testículo

O testículo é um órgão complexo que produz espermatozoides e andrógenos que servem para manter a função reprodutiva e as características sexuais secundárias (RUSSELL; FRANÇA, 1995). É um órgão maciço, ovalado, envolto por tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, e anatomicamente disposto em uma região chamada de escroto na maioria das espécies mamíferas. Estruturalmente, os testículos são divididos em dois compartimentos, o tubular e o intertubular ou intersticial. O compartimento tubular compreende a região formada pelos túbulos seminíferos, onde são formados os espermatozoides e que são estruturas tubulares enoveladas, delimitadas externamente por uma túnica própria, composta por elementos acelulares como fibras colágenas, células mióides e a membrana basal sobre a qual estão localizadas as células da linhagem germinativa dispostas em camadas e as células de Sertoli. São encontrados trinta túbulos seminíferos por testículo em ratos de laboratório (SETCHELL; BREED, 2006), cujas extremidades se abrem no mediastino testicular e este se comunica ao epidídimo via ductos eferentes.

As células de Sertoli são responsáveis pelo suporte físico e nutricional das células da linhagem germinativa, regulam o processo espermatogênico e produzem fluidos tubulares (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010a). Estruturas denominadas de especializações ectoplásmicas apicais e basais são encontradas nas células de Sertoli (VOGL et al., 2000). A especialização ectoplásmica basal promove a formação das junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes e, com isso, promovem a formação de dois ambientes no epitélio seminífero: o basal onde se encontram as espermatogônias e espermatócitos em estágios iniciais de



desenvolvimento e o adluminal, em que estão as células da linhagem germinativa em estágio mais avançado do processo espermatogênico. As junções de oclusão formam a barreira hemato-testicular que visa limitar a exposição das células germinativas do ambiente adluminal aos agentes lesivos provenientes da corrente sanguínea. A especialização ectoplásmica apical compreende modificações nas membranas citoplasmáticas da célula de Sertoli e demais células da linhagem germinativa para fornecer adesão e regulação do ciclo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990; KERR et al., 2006).

No compartimento intertubular ou intersticial, encontram-se os vasos sanguíneos e linfáticos, embora em algumas espécies animais como ratos, camundongos e cães, os capilares linfáticos se apresentem fenestrados e os espaços entre as células são considerados como espaços linfáticos. São também identificados no compartimento intertubular: tecido conjuntivo composto por fibras colágenas, fibroblastos, nervos, macrófagos, linfócitos e o tipo celular mais proeminente, as células de Leydig agrupadas próximos aos vasos sanguíneos para facilitar a passagem de testosterona para a corrente sanguínea (RUSSELL et al., 1990; KERR et al., 2006). Em humanos, há cerca de 8 milhões de células de Leydig/cm<sup>3</sup> e no rato de 14 a 22 milhões/cm<sup>3</sup>. As células de Leydig são ricas em retículo endoplasmático liso, em cujas membranas estão as enzimas necessárias para a síntese de testosterona. Adicionalmente, foi verificado que as células de Leydig também produzem estrógeno (KERR et al., 2006).

### 2.1.2 O epidídimo

O epidídimo é um órgão composto por um único ducto altamente enovelado e longo, variando de comprimento de um metro no camundongo, três metros em ratos e de três a seis metros em homens (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). O órgão é dividido em três regiões: a cabeça, o corpo e a cauda (CORNWAL, 2009). A cabeça do epidídimo liga-se ao testículo via ductos eferentes, que podem variar em quantidade de quatro a dez, dependendo da espécie animal, e apresenta continuidade para formar o corpo e a cauda. Histologicamente, as células principais são o tipo celular mais abundante, representando cerca de 65 a 80% de todas as células e tem função endocítica e secretória. Elas apresentam a parte apical com microvilosidades e estão presentes ao longo de todo o ducto dos segmentos epididimários, mas com diferenças estruturais da composição de seu aparato secretório e endocítico dependendo da região analisada. Os demais componentes celulares do epidídimo como as células basais,

apicais, estreitas e claras também possuem funções endocíticas e secretórias. Outro tipo celular epididimário denominado de células Halo foram descritas e atribuídas atividades imunológicas pela semelhança com os linfócitos e monócitos.

As células principais possuem junções de oclusão em seu citoplasma e o conjunto dessas junções entre as células principais adjacentes forma a barreira hemato-epididimária. À semelhança com a barreira hemato-testicular, essa estrutura serve para proteção dos espermatozoides de agentes lesivos e do sistema imunológico, que reconhece os gametas e proteínas intraluminais como não próprios (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

O epidídimo desempenha as seguintes funções quanto aos espermatozoides: desenvolvimento da motilidade e capacidade fertilizatória, criação de ambiente propício à maturação através da absorção e secreção de substâncias pelo epitélio epididimário e armazenagem e transporte (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). A importância desse órgão é reconhecida uma vez que 40% da infertilidade masculina podem advir de anormalidades na maturação dos espermatozoides (CORNWAL, 2009).

### 2.1.3 As glândulas acessórias

As glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino correspondem à próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006). O seu desenvolvimento e controle funcional estão sob influência da testosterona e diidrotestosterona (GONZÁLEZ, 2001).

#### 2.1.3.1 A próstata

A próstata é a maior glândula acessória do sistema reprodutor masculino (DIAZ et al., 2010). A sua posição anatômica é distal à base da bexiga e circunda completamente a parte proximal da uretra. É formada por lóbulos que são constituídos por inúmeros alvéolos de epitélio pseudoestratificado delimitados pelo estroma. A função da glândula prostática é produzir fluidos que contribuam para a formação do ejaculado e elementos como zinco, ácido cítrico, prostaglandinas, frutose e enzimas. As células secretórias formam a maior porção exócrina glandular e secretam proteínas, como por exemplo, o antígeno prostático específico (PSA) e fosfatase ácida prostática no lúmen glandular. Altos níveis de receptores androgênicos são expressos pelas células secretórias, evidenciando a necessidade da testosterona para sua fisiologia. Além das células secretórias, há a presença das células epiteliais basais que não apresentam

atividade secretória e se localizam justapostas à membrana basal e estroma, sob o epitélio. À semelhança com o testículo e epidídimo, as células basais possuem junções do tipo *gap* e formam a barreira hemato-prostática. Em humanos, há as células neuroendócrinas e são responsáveis pela secreção de proteínas de carreamento e hormônios peptídeos (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006).

#### 2.1.3.2 As vesículas seminais

As vesículas seminais são constituídas por epitélio secretor colunar, em glândulas com vilosidades, cuja secreção compõe de 60 a 80% do volume do ejaculado. A função das vesículas seminais é a secreção de frutose, enzimas e prostaglandinas para auxiliar na motilidade dos espermatozoides e proteínas para controlar a viscosidade do sêmen (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006). Além disso, a vesícula seminal produz as proteínas semenogelinas I e II, responsáveis pela coagulação do sêmen e componentes como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase e ácido ascórbico, ácido úrico e tióis que são antioxidantes e protegem os espermatozoides contra a atividade imune do sistema reprodutor feminino (GONZÁLEZ, 2001). Após a ejaculação, os espermatozoides consomem a frutose em um processo denominado de frutólise. Dessa maneira, existe uma correlação inversa da concentração desse carboidrato e a taxa de motilidade dos espermatozoides (GONZÁLEZ, 2001; GONZALEZ; VILLENA, 2001).

#### 2.1.3.3 As glândulas bulbouretrais

As glândulas bulbouretrais são formadas por estruturas tubuloalveolares e presentes na maioria dos mamíferos. Elas produzem secreções que são eliminadas próximas aos lobos prostáticos e contribuem na formação do ejaculado. Em roedores, elas possuem a função de produzir o tampão vaginal após a cópula (RISBRIDGER; TAYLOR, 2006).

### 2.2 O eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular

Um sistema glandular compreendido pelo hipotálamo, hipófise e pelos testículos, integram o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular e é responsável pela formação e controle da atividade do sistema reprodutor masculino (CUMMINGS; KAVLOCK, 2004). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é secretado pelas células do hipotálamo e estimula a secreção das gonadotrofinas pela hipófise e que

estimularão a gametogênese e esteroidogênese (GORBMAN; SOWER, 2003; SOWER; FREEMAN; KAVANAUGH, 2009). A secreção de GnRH varia significativamente ao longo da vida do animal, sendo regulado pelo ritmo circadiano nas espécies com reprodução sazonal, sob influência da melatonina (LÓPEZ et al., 2005). A secreção de GnRH aumenta no período inicial da adolescência, em pulsos de alta frequência, e induz o despertar das funções reprodutivas de ambos machos e fêmeas e são mantidos por toda a vida do animal (HARRIS; LEVINE, 2003; NAVARRO, 2012).

O hormônio folículo estimulante (FSH) e o luterinizante (LH) são produzidos pela adeno-hipófise e liberados na corrente sanguínea sob o estímulo do GnRH (LÓPEZ et al., 2005). Nos testículos, o FSH estimula a proliferação e a população das células de Sertoli no feto em formação. No indivíduo adulto o FSH, juntamente com a testosterona, regulam o processo espermatogênico desempenhado pelas células de Sertoli (GRISWOLD; MCLEAN, 2006). O LH atua sobre as células de Leydig e estimula a produção de testosterona que tem a função de promover os caracteres secundários masculinos, estimular a atividade das glândulas acessórias do sistema reprodutor e do processo espermatogênico (STOCCO; MCPHAUL, 2006).

Um processo denominado de retroalimentação, através do qual a testosterona presente na corrente sanguínea estimula os receptores androgênicos localizados no hipotálamo e hipófise e diminui a secreção de GnRH e gonadotropinas e oferece o controle endócrino. A inibina é um polipeptídeo secretado pelas células de Sertoli sobre o controle do FSH e atua sobre a hipófise e regula os níveis séricos de FSH (DEPUYDT et al., 1999).

### 2.3 Espermatogênese

A fertilidade masculina depende da produção de milhões de espermatozoides por ejaculado. Para tal, há a necessidade de um processo único, altamente complexo e ordenado, que dura cerca de seis a nove semanas e dependente de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos denominado de espermatogênese (O'DONNELL et al., 2006). Ela é definida por um processo de eventos celulares e sucessivos, que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, e que resulta na formação de espermatozoides maduros a partir de células precursoras (KERR et al., 2006). As células que compõem o processo espermatogênico são as espermatogônias, os espermátócitos e as espermátides. Baseado

em considerações funcionais, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: a proliferativa, a meiótica e a fase espermiogênica (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010a).

A fase proliferativa caracteriza-se pela multiplicação das espermatogônias por mitoses sucessivas e rápidas. A característica dessa fase é a geração de células não comprometidas ao processo de meiose para formar as células de reposição e manter o processo espermatogênico de forma regular. Além disso, a fase proliferativa é responsável pela multiplicação e geração das espermatogônias que se diferenciarão e darão origem aos espermátócitos primários e se destinarão à meiose e geração dos gametas maduros. Na fase meiótica, os espermátócitos primários entram em processo de meiose, o material genético é recombinado e segregado e as espermatídes, células haplóides, são geradas (HESS, 1999; HESS; FRANÇA, 2008; HERMO et al., 2010a). A fase espermiogênica, ou de diferenciação, é a fase em que as espermatídes se transformam em células estruturalmente equipadas para alcançar o ovócito (RUSSELL et al., 1990). As espermatídes haplóides, advindas do processo meiótico pelo qual os espermátócitos se submeteram, passam por 19 passos no rato, 16 no camundongo e 8 no ser humano até se transformarem no espermatozoide. As organelas citoplasmáticas se modificam: o complexo de Golgi se transforma no acrossoma; os centríolos migram e originam o flagelo; o núcleo se condensa e o citoplasma é reduzido de volume (HESS, 1999; HERMO et al., 2010b).

As células germinativas, em suas fases de desenvolvimento, formam associações celulares ou estágios, definidos como estágios do ciclo do epitélio seminífero com 6, 12 e 14 estágios específicos reconhecidos em humanos, camundongos e ratos, respectivamente. Cada estágio possui entre quatro a cinco gerações de células germinativas em uma mesma secção transversal do túbulo seminífero. Um ciclo espermatogênico é definido como o período de tempo necessário para que determinada região do túbulo seminífero complete os 14 estágios que estão arranjados consecutiva e ordenadamente ao longo do túbulo seminífero, apresentando-se ascendente ao distanciar-se da rede testicular, denominada de onda espermatogênica (HESS, 1999; HESS; FRANÇA, 2008; HERMO et al., 2010a).

A condição para a ocorrência normal da espermatogênese depende da manutenção de um microambiente adequado no interior dos túbulos seminíferos e é desempenhada pelas células de Sertoli, que formam a barreira hemato-testicular e

direcionam as células germinativas em desenvolvimento que migram da base do túbulo para o interior, em direção ao lúmen (KERR et al., 2006).

#### 2.4 O papel do estrogênio na reprodução masculina

Segundo Sharpe (1998) e Hess (2003), a presença dos hormônios sexuais esteroidais, como a testosterona e o estrogênio como sendo exclusivos, respectivamente aos sistemas reprodutores masculino e feminino vem mudando. A identificação dos receptores estrogênicos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) e  $\beta$  (ER- $\beta$ ) no sistema reprodutor masculino, o entendimento do papel da enzima aromatase, que realiza a conversão da testosterona em estrogênio e a necessidade desse hormônio para o desenvolvimento do sistema reprodutor durante a vida intrauterina e na puberdade, demonstraram a importância do estrogênio e forneceram melhor compreensão do seu papel para o funcionamento no organismo masculino.

No sistema reprodutor masculino, o estrogênio possui a função de regular a reabsorção dos fluidos nos ductos eferentes e no epidídimo, através da absorção de íons e água e assim, concentrar os espermatozoides (JOSEPH; SHUR; HESS, 2011). Os ER- $\alpha$  foram identificados na *rete testis*, células de Leydig, epidídimo, ductos eferentes e glândulas bulbouretrais. Os ER- $\beta$  foram identificados no epidídimo e glândulas acessórias (SHARPE, 1998) e no testículo, nas células somáticas de Leydig e Sertoli e também nas células germinativas (SHARPE, 1998; SAUNDERS et al., 2002; CARREAU et al., 2006; CARREAU; VIENNE; GALERAUD-DENIS, 2008) o que indica a necessidade desse hormônio para a fisiologia. Também são encontrados em vários núcleos hipotalâmicos e gonadotrofos hipofisários atuando na regulação de secreção de hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (AKINGBEMI, 2005).

Recentemente, receptores estrogênicos intracelulares denominados de GPR30, que estão associados à proteína G, foram relatados como possíveis associações à expressão de marcadores como o *Bax* por espermátocitos em paquíteno e espermátides arredondadas e via apoptótica mitocondrial (CARREAU; BOURAIMA-LELONG; DELALANDE, 2012). Lucas et al. (2010) identificaram os receptores estrogênicos GP em células de Sertoli e indicaram o envolvimento desses receptores com apoptose celular.

Estudos correlacionaram a atividade da aromatase, enzima que converte irreversivelmente andrógenos em estrogênios e está presente no retículo endoplasmático de inúmeros tecidos, com a motilidade de espermatozoides (CARREAU et al., 2007). Em ratos, a atividade da aromatase está concentrada nas células de Sertoli em animais imaturos e nas células de Leydig nos animais adultos. Carreau; Vienne; Galeraud-Denis (2008) relataram redução de cerca de 30% da expressão gênica do gene CYP19, responsável pela síntese de aromatase em espermatozoides de ratos que se apresentaram com imobilidade. Os autores também relacionaram a menor expressão da aromatase com aumento de anormalidade morfológicas dos gametas, principalmente com microcefalia.

Sabe-se que a proporção de andrógenos/estrógenos tem efeito fisiológico no desenvolvimento e manutenção das funções gonadais masculinas e parece controlar especialmente a produção de espermátides (tanto aspectos qualitativos quanto quantitativos) e a maturação dos espermatozoides no epidídimo (CARREAU, 2000). Estudos em animais evidenciaram que tanto uma sub ou quanto uma super exposição a estrógenos refletem na função testicular. Camundongos *knockout* para aromatase, enzima que converte andrógenos em estrógenos, são inférteis porque as espermátides não se diferenciam normalmente (SIERENS et al., 2005). A utilização de exemestano, um inibidor de aromatase, promoveu redução do peso testicular, dos níveis de estrogênio plasmático e das taxas de proliferação de espermatogônias, ao mesmo tempo em que promoveu aumento dos níveis de hormônios androgênicos em peixes *Halichoeres trimaculatus* (KOBAYASHI; NOZU; NAKAMURA, 2011). Os autores verificaram que houve estímulo e retomada do processo espermatogênico e aumento da taxa de proliferação das espermatogônias após aplicação de estrogênio exógeno nesses mesmos animais, e demonstraram a necessidade do estrogênio para o processo espermatogênico.

Estudos em espécies que apresentam período reprodutivo sazonal podem fornecer entendimento do papel do estrogênio sobre o sistema reprodutor masculino. Cobellis et al. (1999) verificaram que em rãs *Rana esculenta*, a cessação da produção de espermatozoides no período não reprodutivo foi associado ao aumento de taxas proliferativas de espermatogônias e a altas taxas de estrogênio. O aumento de expressão dos ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  também foi demonstrado nos testículos de morcegos *Artibeus lituratus* no período de regressão gonadal do período não reprodutivo (OLIVEIRA et al., 2009).

## 2.5 Substâncias estrogênicas exógenas e o sistema reprodutor masculino

Vários agentes têm sido apontados por apresentarem efeitos adversos no sistema reprodutor masculino e as substâncias com possível atividade estrogênica tem sido relatadas como causadores desse fenômeno (KUIPER et al., 1998; PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004; SAFE, 2004; VIDAEFF; SEVER, 2005; HAUSER; SOKOL, 2008; WOODRUFF et al., 2008; SHARPE, 2010). Esses compostos podem ser denominados de desreguladores endócrinos, pois mimetizam a ação de hormônios endógenos, inibem a ação dos mesmos ou alteram a função regulatória do sistema endócrino (SIKKA; WANG, 2008). Delbès; Levacher; Habert (2006) denominaram essas substâncias de xenoestrógenos e apontaram a diversidade de tipos existentes e indicaram aumento de concentrações no meio ambiente e na alimentação.

Os Ftalatos, presentes em materiais plásticos (HU et al., 2009; SAILLENFAIT; SABATÉ; GALLISSOT, 2009; MARTINO-ANDRADE; CHAODUD, 2010), parabenos (HOBERMAN et al., 2008; TAVARES et al., 2009), pesticidas organoclorados, como o dicloro-difenil-tricloroetano ou DDT, kepone, toxafeno e dieldrin (BRETVELD et al., 2007; UZUN et al., 2009; VICTOR-COSTA et al., 2010) e bisfenóis, em plásticos e resinas epóxi (SAKAUE et al., 2001), além de derivados fenólicos (fenilfenóis, presentes em borrachas e desinfetantes), alquilfenóis presentes em herbicidas e detergentes e outros pesticidas como o endosulfan e atrazina (VIDAEFF; SEVER, 2005) podem exercer essa atividade sobre o sistema reprodutor masculino por mimetizarem a ação do estrogênio endógeno ou alterarem o seu metabolismo.

Uma sobrecarga estrogênica já foi demonstrada ser a causa de alterações no sistema reprodutor masculino, principalmente se a exposição for materna. Alterações na frequência dos ciclos do epitélio seminífero e peso da próstata (YAMAMOTO et al., 2005) e no desenvolvimento do epidídimo (YAMAMOTO et al., 2009) foram observados em ratos com redução dos níveis séricos de testosterona, cujas mães foram tratadas com dietilstilbestrol entre o 7<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dias de gestação. Shimomura et al. (2005) verificaram que estrógenos sintéticos como o etinilestradiol, usados como contraceptivos femininos e para terapia contra a hipertrofia e câncer de próstata, podem se ligar aos receptores estrogênicos na hipófise e hipotálamo e diminuir a secreção dos hormônios liberador de gonadotrofinas (GnRH), folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) e, conseqüentemente, os níveis de testosterona em ratos. Também utilizando o etinilestradiol por via oral em ratos, Kaneto et al. (1999) verificaram que



houve redução da contagem e da motilidade dos espermatozoides, além de atrofia severa dos túbulos seminíferos e Vosges; Braguer; Combarous (2008) relataram menor número de crias em ratos.

## 2.6 Síndrome da disgenesia testicular e exposição aos contaminantes ambientais

A perda de fertilidade masculina como a redução da concentração de espermatozoides, o aumento de incidências de anormalidades congênitas como hipospadias e criptorquidismo e tumores do sistema reprodutor masculino podem ser reunidos em uma única síndrome, denominada de síndrome da disgenesia testicular (SDT) e está associada, além de fatores genéticos, à exposição a fatores lesivos ao sistema reprodutor masculino no início da vida intrauterina (SKAKKEBAEK; MEYTS; MAIN, 2001; WOHLFAHRT-VEJE; MAIN; SKAKKEBAEK, 2009). A SDT é caracterizada pela irreversibilidade das lesões (JOENSEN et al., 2008). Em casos leves, mais comumente vistos, há apenas uma alteração da espermatogênese, refletido em baixa contagem de espermatozoides associada ou não à infertilidade. Nos casos mais severos e também mais raros, a síndrome da disgenesia testicular se manifesta com alterações congênitas e/ou presença de tumores testiculares (SKAKKEBAEK et al., 2003).

As anormalidades congênitas associadas à síndrome da disgenesia testicular são decorrentes da deficiência de androgênio durante o período de formação do sistema reprodutor masculino. O criptorquidismo, ou alteração do descenso testicular, pode ocorrer uni ou bilateralmente e os testículos podem se apresentar intra-abdominais ou em porção escrotal proximal. É a alteração congênita mais comum em neonatos do sexo masculino, afetando cerca de 2-9% dos indivíduos. Outra alteração comumente associada é a hipospadia, que acomete cerca de 0,2-1% dos neonatos, e se caracteriza pela posição anômala do orifício uretral externo no pênis, que pode-se localizar ao longo do corpo do pênis ou em posição escrotal ou perianal (TOPPARI et al., 2010).

A relação da síndrome da disgenesia testicular com tumores também foi descrita por Skakkebaek et al. (2003) ao relatar a presença de dois tipos de carcinoma de células germinativas em homens, o seminoma e o não seminoma. O autor cita que a formação desses tumores pode ser relativa à exposição dos gonócitos, células germinativas precursoras, aos agentes lesivos extrínsecos e não apenas às alterações cromossômicas

intrínsecas ao desenvolvimento embrionário. Sonne et al. (2008) verificaram a semelhança morfológica de células provenientes de carcinoma *in situ*, precursoras da maioria dos cânceres testiculares invasivos, com os gonócitos, evidenciando ainda mais a origem desses tumores. A hipótese mais discutida é uma falha de diferenciação dos gonócitos em espermatogônias devido a uma disfunção das células de Sertoli e de Leydig. Entretanto o potencial invasivo do carcinoma *in situ* não é atingido até que o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal seja ativado na puberdade (DALGAARD et al., 2012).

A alteração da capacidade funcional das células de Leydig também foi estudada por Joensen et al. (2008) como uma das consequências da SDT. Os autores verificaram que concentrações reduzidas de andrógenos podem estar presentes e podem explicar as alterações de formação dos demais órgãos do sistema reprodutor masculino.

Dalgaard et al. (2012) verificaram uma possível base genética da SDT ao associar polimorfismos em apenas um nucleotídeo nos genes TGFBR3 e BMP7 que pertencem à via de sinalização do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) em homens com SDT. Fisher et al. (2003) definiram um modelo experimental em ratos Wistar cujas mães foram tratadas com 500 mg/kg de dibutilftalato (DBP) por via oral no período gestacional compreendido entre o 13<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dias. Os autores verificaram alterações típicas da SDT humana com altas taxas de criptorquidismo, hipospadia e infertilidade. Anormalidades testiculares, como hiperplasia das células de Leydig e presença dessas células no interior dos túbulos seminíferos, cordões testiculares parcialmente formados, células de Sertoli imaturas e túbulos seminíferos compostos unicamente por células de Sertoli, atraso na diferenciação das células mióides peritubulares e ausência do processo espermatogênico foram relatados.

A importância da exposição aos contaminantes ambientais na formação da SDT é um fator amplamente estudado. Ao dibutilftalato (DBP) e estrogênicos sintéticos se atribuem atividades estrogênicas e/ou antiandrogênicas no organismo, responsáveis pelo desencadeamento da SDT (VIRTANEN et al., 2005; BAY et al., 2006; MARTIN et al.; 2008). Storgaard; Bonde; Olsen (2006) relacionaram as anormalidades encontradas na SDT com a exposição pré-natal às substâncias estrogênicas. Wohlfahrt-Veje et al. (2012) associaram a redução de tamanho de órgãos genitais externos de meninos cujas mães foram expostas a pesticidas na gestação.

## 2.7 Fitoterapia e fitoestrógenos

Estima-se que 80% da população mundial utilizem medicamentos à base de plantas (PANDEY et al., 2011). À medida que os estudos avançam na busca de novos fármacos, maior é o número de componentes químicos identificados com capacidade de produzir algum dano no organismo. Uma vez que o tratamento de doenças mediante o uso de plantas é muito popular, e com o aumento da procura por fitoterápicos, a segurança desses produtos também necessita ser estudada (NESS; SHERMAN; PAN, 1999).

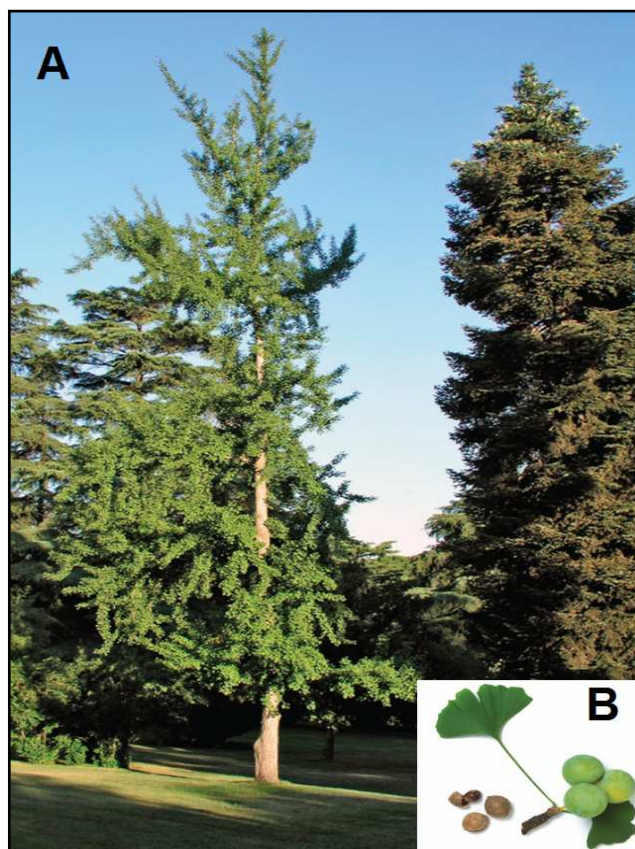
Muitos desses medicamentos são comercializados sem serem submetidos às análises toxicológicas recomendadas (MAR; BENT, 1999). A inocuidade, segurança e eficácia dos medicamentos tornaram-se de interesse das autoridades sanitárias e do público (WHO, 2000). Esse risco levou as entidades governamentais nacionais e internacionais a tomarem medidas que visam garantir a segurança e eficácia no uso dos fitoterápicos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu normas através da Portaria nº 116/MS/SNVS de 8 de agosto de 1996 para o estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos, em que se estabelece a realização de protocolos experimentais que permitam a demonstração de toxicidade desses produtos. Também é crescente a consciência da população em relação aos riscos da exposição a agentes ocupacionais, terapêuticos e ambientais na fertilidade masculina e no desenvolvimento da progênie (ANDERSON, 2005).

Kostelac; Rechkemmer; Briviba (2003) relataram que fitoestrógenos flavonólicos podem se ligar aos ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  e dessa maneira atuar nos diversos sistemas em que esses receptores estão localizados e, segundo Kuiper et al. (1998), os fitoestrógenos são um dos compostos xenoestrógenos mais potentes conhecidos e possuem maior afinidade de ligação aos ER- $\beta$ . Assinder et al. (2007) descreveram que ratos adultos expostos a elevadas concentrações de fitoestrógenos genistéina, gliciteína e daidzeína na dieta, tiveram a espermatogênese prejudicada, a taxa de apoptose de células germinativas aumentada e a contagem de espermatozoides reduzida.

## 2.8 *Ginkgo biloba*

O termo *Ginkgo* deriva-se do japonês “Ginkyo” que quer dizer damasqueiro de prata e do latim “biloba” – bi, dois, por causa de suas folhas em formato de leque dividido ao meio (STROMGAARD; NAKANISHI, 2004). O *Ginkgo biloba* L. (Figura 1) é uma planta considerada “fóssil vivo”, pois se originou há cerca de 200 milhões anos na região em que atualmente localiza-se a China e não apresenta espécie de parentesco próximo dentro do Reino Vegetal. É a espécie de árvore mais antiga e viva na face da Terra (BLUMENTHAL; BRINCKMANN; WOLLSCHLAEGER, 2003). Seu valor medicinal vem sendo utilizado pelo homem há pelo menos 5.000 anos, confirmado pela primeira prescrição para uso interno no livro de Chen Nounng (2.767 a 2.687 AC) (DIAMOND et al., 2000). Atualmente é considerado um dos fitoterápicos mais vendidos no mundo (MAR; BENT, 1999), comercializado nas formas de folhas secas, extratos em pó e tinturas. É caracterizado pela grande expectativa de vida, resistência a insetos, infecções virais e bacterianas (SINGH et al., 2008).

Figura 1 – A – Árvore de *Ginkgo biloba*. B – Demonstração de folhas, frutos e sementes.



Fonte: Adaptado de Baratto; Rodighero; Santos (2009)

O extrato de *Ginkgo biloba* é uma mistura de cerca de 300 compostos químicos extraídos das folhas das árvores. O extrato padrão (EGb) utilizado geralmente possui entre 22 a 27% de glicosídeos flavonólicos (*flavonas*: quercetina, kaempferol e isorhamnetina; *biflavonas*: bilobetina, ginkgetina, isoginkgetina e sciadopitysina) e entre 5 a 7% de terpeno trilactonas (*ginkgolídeos*: A, B, C e J; *sesquiterpena lactona*: bilobalídeo) (WHO, 1999; VAN BEEK, 2002; SMITH; LUO, 2004; OH; CHUNG, 2004).

O extrato apresenta atividade neuroprotetora, anti-inflamatória, antioxidante e estabilizadora de membranas o que o faz ser muito utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, demência (MAR; BENT, 1999) e melhoria de memória. Também apresenta atividade relaxante sobre o endotélio vascular, utilizado na insuficiência cerebrovascular e em oclusões de artérias periféricas (WHO, 1999; BLUMENTHAL; BRINCKMANN; WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003; SMITH; LUO, 2004). Popularmente, é utilizado como vermífugo, indutor do parto, no tratamento de bronquite, rinite crônica, artrite e edema (WHO, 1999). Entretanto, devido o efeito inibidor sobre o fator de ativação de plaquetas, o seu uso concomitante com agentes e ervas de efeito anticoagulante deve ser evitado (SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003). Dugoua et al. (2006) também não recomendam o uso próximo ao parto, por aumentar o tempo de sangramento.

O EGb é também utilizado na terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa (GOLD et al., 2007). Entretanto, a descrição de outros usos do extrato na reprodução é escassa. Estudos clínicos foram realizados por Paulus et al. (2002) em 45 mulheres com histórico prévio de insucesso em procedimentos de reprodução assistida e que apresentavam fluxo sanguíneo baixo nas artérias uterinas e ovarianas. A administração do extrato promoveu aumento significativo da espessura endometrial e em três casos, a gestação pôde ser obtida.

Nos estudos experimentais em reprodução, Chan (2005) demonstrou que os ginkgolídeos A e B induziram apoptose em blastocistos de camundongos *in vitro*. O ginkgolídeo B também foi capaz de reduzir o desenvolvimento dos ovócitos *in vitro* (SHIAO; CHAN, 2009) e aumentar os índices de reabsorções dos blastocistos e diminuir o peso fetal *in vivo* (CHAN, 2006; SHIAO; CHAN, 2009). Quando

administrado a ratas prenhes no período de transporte tubário e implantação (1-8<sup>o</sup> dia de gestação), não causou toxicidade materna, morte embrionária, retardo no crescimento e malformações (FERNANDES et al., 2010). Entretanto, retardo no crescimento foi notado nos fetos cujas mães foram tratadas entre o 8<sup>o</sup> e o 20<sup>o</sup> dia de gestação (PINTO et al., 2007). Em ratas lactantes também não causou toxicidade materna, nem alterou o desenvolvimento físico, motor e sensorial das crias (FARIA et al., 2008).

Efeitos estrogênicos para o EGb e seus principais componentes isolados (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) foram demonstrados por Oh; Chung (2004). Os autores verificaram afinidade dos compostos aos ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , embora tenham notado maior afinidade do EGb aos ER- $\beta$ . Contudo, o EGb também apresentou atividade anti-estrogênica (OH; CHUNG, 2006) pela ação agonista do EGb sobre os receptores aril-hidrocarbono (AhR) que estimulou a expressão do gene CYP1A1, relacionado com a síntese de enzimas envolvidas no catabolismo do estrógeno. Além disso, verificou-se que o EGb inibiu a enzima aromatase, responsável pela síntese dos hormônios estrogênicos a partir dos androgênicos. Dessa forma, os autores sugerem que os efeitos anti-estrogênicos que ocorrem pela vias independentes aos receptores de estrógeno podem ser causados pela redução dos níveis hormonais.

Com relação à reprodução masculina, existem indícios de que o extrato de *Ginkgo biloba* poderia ser utilizado no tratamento de 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). Paick; Lee (1996) demonstraram que o EGb apresentou efeito de relaxamento sobre a musculatura lisa do corpo cavernoso peniano de coelhos e humanos *in vitro*. Registrou-se também aumento no comportamento de cópula (YEH et al., 2008; YEH; WU; TSAI, 2011) e ereções (YEH et al., 2010; YEH et al., 2011) em ratos submetidos ao extrato, o que poderia evidenciar ainda mais o efeito sobre a disfunção erétil e libido.

Porém, elevadas doses de extrato de *Ginkgo biloba* induziram a diminuição da penetração de espermatozoides na zona pelúcida de ovócitos de hamster (ONDRIZEK et al., 1999a) e inibiram a motilidade de espermatozoides humanos (ONDRIZEK et al., 1999b). Khanduja; Verma; Bhardwaj (2001) verificaram que a quercetina, um dos componentes do EGb, promoveu diminuição de motilidade e vitalidade de espermatozoides humanos. 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. Os autores sugeriram que o mecanismo de toxicidade reprodutiva do EGb pode ser devido à geração de radicais livres, principalmente pela ação dos bilobalídeos na ativação do ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, aspartato e glicina e, conseqüentemente, aberrações cromossômicas nos testículos.

Contrariamente, 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. Taepongsorat et al. (2008) também evidenciaram que a quercetina melhorou parâmetros reprodutivos como motilidade, vitalidade e concentração de espermatozoides, além de aumentar o peso testicular de ratos. Faqi et al. (2004) não observaram alterações no sistema reprodutor de ratos machos tratados por 12 meses com isoflavonas.

Frente à escassez de estudos dos efeitos do EGb sobre o sistema reprodutor masculino, dos relatos contraditórios na literatura e da potencialidade de efeitos adversos do extrato, novas investigações fazem-se necessárias.

### 3. Hipótese

O extrato de *Ginkgo biloba* promove toxicidade sistêmica nos animais e apresenta efeito lesivo sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos.



## 4. Objetivos

### 4.1 Geral

Avaliar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos.

### 4.2 Específicos

- 4.2.1 Determinar a concentração, a vitalidade e a morfologia dos espermatozoides epididimários;
- 4.2.2 Avaliar o peso dos testículos, epidídimo, glândulas acessórias do sistema reprodutor dos animais, além dos rins, fígado e baço;
- 4.2.3 Avaliar histometricamente o testículo quanto a:
  - 4.2.3.1 Densidade volumétrica e volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular;
  - 4.2.3.2 Densidade volumétrica e volume dos componentes do compartimento intertubular;
  - 4.2.3.3 Diâmetro tubular total, diâmetro luminal e altura do epitélio do túbulo seminífero;
  - 4.2.3.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo;
- 4.2.4 Avaliar os perfis hematológico e bioquímico dos animais;
- 4.2.5 Determinar a concentração sérica de testosterona total;

## 5. Material e métodos

A metodologia proposta para este trabalho seguiu os princípios da OECD Series on Testing and Assessment No. 21 (OECD, 2002) para avaliação do efeito de desreguladores de hormônios sexuais e da ICH Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2) (ICH, 2005).

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 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora em 06 de Abril de 2010 e protocolado com o número 016/2010.

O estudo experimental foi realizado no biotério de experimentação animal do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora e todas as análises, com exceção do processamento histológico testicular, microtomia e coloração das lâminas histológicas, foram realizadas nos laboratórios do CBR.

### 5.1 O extrato de *Ginkgo biloba*

O extrato de *Ginkgo biloba* foi importado da China e fornecido pela JR Pharma. O teste de qualidade realizado pelo Laboratório Galena demonstrou que o extrato é composto de cerca de 28,2% de ginkgoflavoglicosídeos, 8,3% de terpenolactonas, 15% de glicosídeos quercetina, 10,9% de glicosídeos kaempferol, 2,3% de glicosídeos isorhamnetina e menos que 5 ppm de ácidos ginkgólicos. Esta composição corresponde ao extrato geralmente utilizado na terapia clínica (WHO, 1999; BLUMENTHAL; BRINCKMANN; WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003; SMITH; LUO, 2004).

### 5.2 Animais

Foram utilizados 80 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769), de 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 gaiolas de polipropileno (49×34×16 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<sup>®</sup> (Brasil) 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 mínima de animais por gaiola foi de um indivíduo e a máxima de cinco.

### 5.3 Procedimento experimental

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, um grupo Controle (n=20) e três grupos Tratados (n=20/grupo). O grupo Controle recebeu 1 mL de água destilada e os grupos tratados receberam: 3,5 mg/kg (EGb 3,5); 7,0 mg/kg (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) do Extrato aquoso de *Ginkgo biloba* (EGb) por dia. A menor dose correspondeu à dose terapêutica preconizada para humanos, que equivaleria à administração de 250 mg do extrato a uma pessoa de 70 kg (WHO, 1999; BLUMENTHAL; BRINCKMANN; WOLLSCHLAEGER, 2003; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003; SMITH; LUO, 2004; ANVISA, 2008). 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. Os animais foram tratados pelo período de 56 dias consecutivos, correspondente a um ciclo espermatogênico completo do rato (RUSSELL et al., 1990).

Os animais foram separados dos demais semanalmente e foram avaliados quanto ao peso corporal (g) e o consumo diário de ração (g), obtido pela diferença entre a quantidade disposta e a remanescente no cocho, 24 horas após o fornecimento (HOFFMAN et al., 2002). Durante todo o procedimento, os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Após a administração do extrato de *Ginkgo biloba*, os animais foram observados por 30 minutos para a detecção de possíveis sinais clínicos de toxicidade aguda como alterações da atividade locomotora e comportamentais. Durante todo o experimento, outros sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso, piloereção, diarreia, cromodaciorreia, estereotipias 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 (Kensol<sup>®</sup>, König – Brasil) e quetamina na dose de 90 mg/kg (Vetanarcol<sup>®</sup>, König – Brasil), aplicada por via intraperitoneal (WOLFENSOHN; LLOYD, 1994). Foi coletado o volume total de 7 mL de sangue por animal.

#### 5.4 Análise hematológica

Um mililitro do sangue coletado foi misturado a uma gota do anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e submetido à avaliação hematológica através de hemograma completo, com o aparelho analisador hematológico automático modelo pocH-100iV Diff (Sysmex<sup>®</sup> - Japão). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através da análise de 100 células em esfregaço sanguíneo corada pela técnica Panótico (Laborclin<sup>®</sup> - Brasil). Os parâmetros hematológicos analisados foram a hematimetria ( $10^6/\mu\text{L}$ ); hematócrito (%); hemoglobimetria (g/dL); volume globular médio (fL); hemoglobimetria globular média (pg); concentração de hemoglobina globular média (%); leucometria total ( $10^3/\mu\text{L}$ ) e específica representada por valores proporcionais dos monócitos, linfócitos, segmentados e eosinófilos. As análises hematológicas foram realizadas pelo corpo técnico do Laboratório de Hematologia e Bioquímica do CBR.

#### 5.5 Análise bioquímica sérica

O restante do sangue coletado dos animais foi destinado à obtenção de soro sanguíneo através de coagulação e centrifugação. Concentrações da enzima hepática alanina aminotransferase (UI/L) e das substâncias ureia (mg/dL) e creatinina(mg/dL) foram medidas no soro sanguíneo dos animais com o aparelho automático modelo Labmax Progress e kits (Labtest<sup>®</sup> - Brasil). As análises bioquímicas séricas foram realizadas pelo corpo técnico do Laboratório de Hematologia e Bioquímica do CBR.

### 5.6 Dosagem hormonal sérica de testosterona

Parte do soro sanguíneo dos animais foi armazenada em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior. Foi realizada dosagem sérica dos hormônios testosterona através do imunoenensaio ELISA (Kit Caymman Chemicals<sup>®</sup> - EUA) e do aparelho de leitor de microplacas ASYS HITECH GMBH (ASYS<sup>®</sup> - Áustria).

### 5.7 Contagem dos espermatozoides

Procedeu-se à contagem de espermatozoides epididimários através de amostras coletadas a partir da secreção da cauda do epidídimo direito (SEED et al., 1996), obtidas através de uma pequena incisão com tesoura cirúrgica oftálmica para Íris e obtenção de duas frações de secreção. As mesmas foram imediatamente colocadas em  $50\ \mu\text{L}$  de solução tampão salina fosfato (Sigma<sup>®</sup> - EUA) para cada fração, previamente preparado em uma placa de Petri disposta sobre uma placa aquecida a  $37^{\circ}\text{C}$ . Foi aguardado o tempo de 5 minutos para ocorrer a homogeneização do material. Essa amostra foi considerada a solução homogeneizada inicial. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, foi retirada uma alíquota de  $20\ \mu\text{L}$  da solução homogeneizada e colocado em  $6\ \text{mL}$  de água destilada para imobilização dos espermatozoides e diluição da ordem de um para 300. Essa amostra diluída foi acondicionada nos dois retículos da câmara de Neubauer e os espermatozoides foram contados em microscópio óptico modelo BX41TF (Olympus<sup>®</sup> - Japão) no aumento de  $100\times$ . De cada retículo da câmara, foram contados os espermatozoides localizados nos quatro quadrantes laterais. Para cada animal, foi realizada a contagem nos dois retículos da câmara. O valor total foi dividido por oito e obtido o valor médio de um quadrante lateral. A partir desse valor, foi obtida a concentração final de espermatozoides/mL a partir da fórmula 1:

$$x = a \times 300 \times 10^4 \quad (1)$$

Sendo:

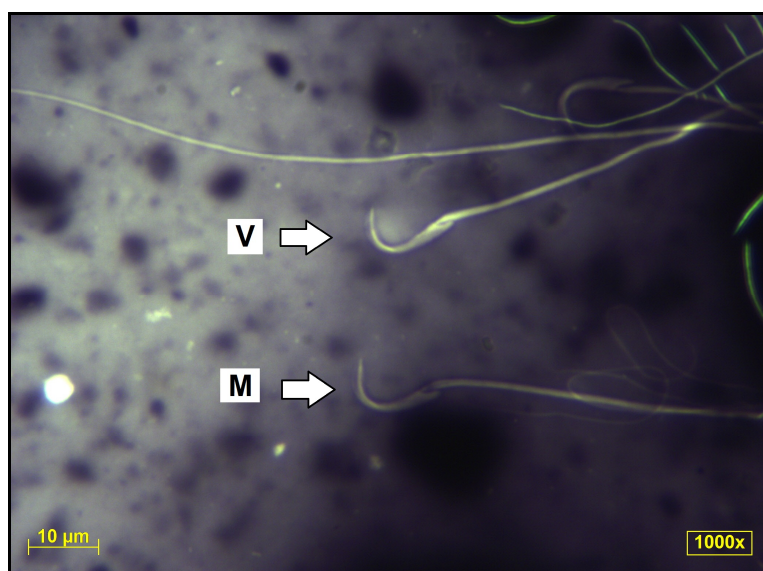
$x$  = concentração final de espermatozoides/mL

$a$  = média obtida de oito quadrantes laterais da câmara de Neubauer

### 5.8 Avaliação da vitalidade espermática

Foi realizada a contagem diferencial de espermatozoides vivos e mortos através da técnica de coloração de nigrosina-eosina (WHO, 2010). Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de solução de suspensão dos corantes de nigrosina-eosina foi previamente aquecido em placa de Petri a 37° C. Posteriormente, foi colocado o volume de 20  $\mu\text{L}$  da secreção epididimária homogeneizada inicial em solução tampão salina fosfato. Após 30 segundos da mistura com o corante nigrosina, foi realizado esfregaço em lâmina histológica e secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, foram avaliados e contados 200 espermatozoides íntegros em microscópio de luz com a lente objetiva de 100 $\times$  e uso de óleo de imersão. Os espermatozoides corados pelo corante eosina foram classificados como mortos e aqueles que aparecerem não corados e visualizados pelo fundo negro promovido pela nigrosina, foram classificados como vivos (Figura 2). Somente foram considerados os espermatozoides íntegros (que apresentaram cabeça e cauda). Os dados foram expressos em porcentagem de espermatozoides vivos.

Figura 2 – Esfregaço de espermatozoides de rato Wistar corado pela técnica de Nigrosina e Eosina para avaliação de vitalidade. M – espermatozoide morto. V – espermatozoide vivo. Aumento de 1.000 $\times$ .



Fonte: Arquivo do CBR/UFJF

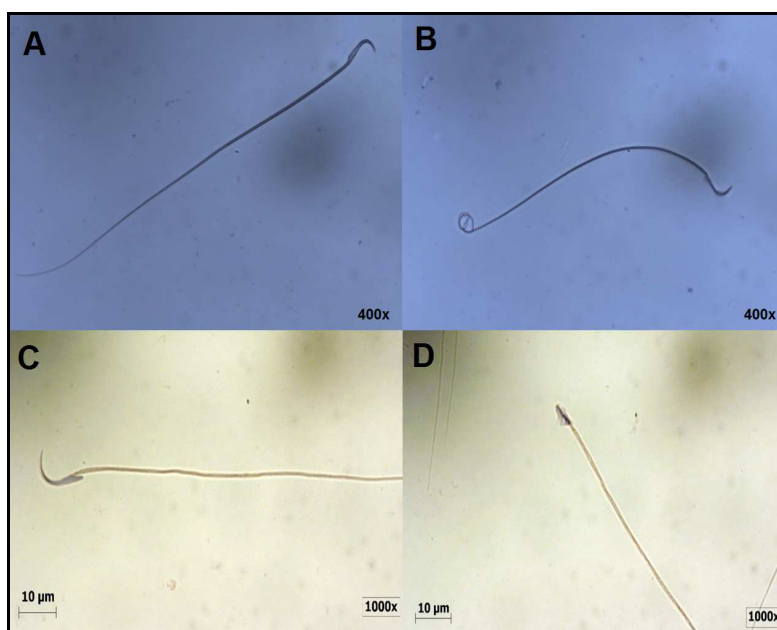
### 5.9 Avaliação da morfologia espermática

Foi retirado um volume de 20  $\mu\text{L}$  da secreção epididimária da segunda fração e diluído em 0,5 mL de solução tampão salina fosfato em tubo de ensaio e previamente aquecido a 37° C. Uma gota dessa diluição foi colocada uma lâmina de vidro para realização do esfregaço. Após secagem em temperatura ambiente, a lâmina foi fixada com mistura de álcool absoluto e éter dietílico a 50% v/v e corada pela técnica de Shorr para realização de contagem e classificação morfológica dos espermatozoides a fim de determinar os índices de anormalidades (WHO, 2010) (Figura 3). Foram contados e analisados 200 espermatozoides íntegros e classificados em normais e anormais em microscópio de luz com a lente objetiva de 100 $\times$  e uso de óleo de imersão. O resultado dos dados foi expresso em porcentagem de espermatozoides normais para cada animal. As alterações morfológicas dos espermatozoides consideradas segundo Seed et al. (1996) e Perreault; Cancel (2001) foram:

5.9.1 Cabeça amorfa: perda da forma de foice, característica dos espermatozoides de ratos;

5.9.2 Defeitos de cauda: enrolada ou quebrada;

Figura 3 – Esfregaço de espermatozoides corado pela técnica de Shorr para avaliação morfológica. A – espermatozoide evidenciando a cauda normal; B – espermatozoide com a cauda enrolada; C – espermatozoide com a cabeça normal; D – espermatozoide com a cabeça disforme. A e B: aumento de 400 $\times$ . C e D: aumento de 1000 $\times$ .



Fonte: arquivo do CBR/UFJF

### 5.10 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 - Brasil): testículos esquerdo e direito, epidídimo esquerdo, vesículas seminais repletas e próstata ventral (Figura 4), rins esquerdo e direito, fígado e baço (Figura 5). Foi calculado o índice gonadossomático (IGS), que é o peso testicular expresso como porcentagem do peso corporal (Fórmula 2):

$$x = (a \div b) \times 100 \quad (2)$$

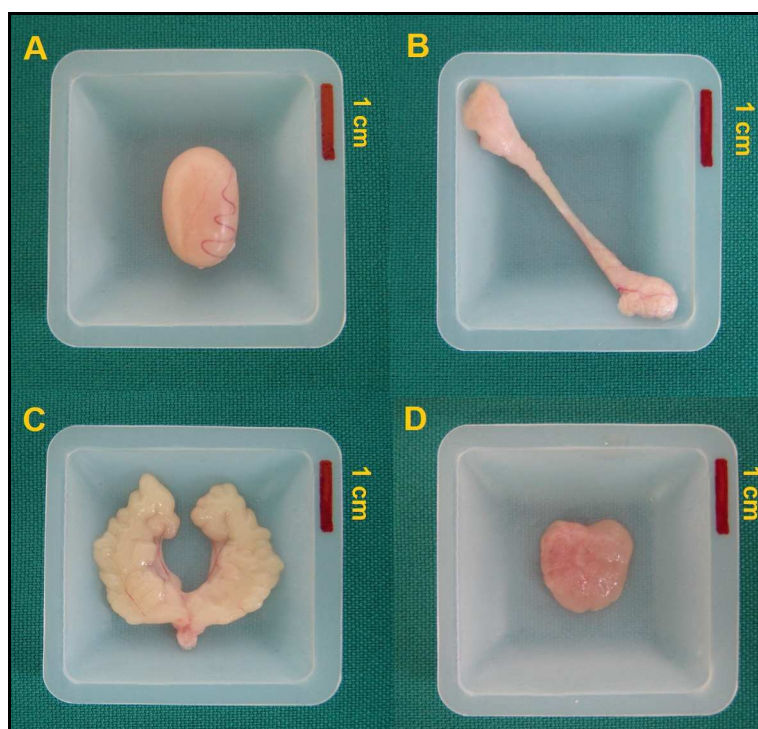
Sendo:

$x$  = índice gonadossomático (IGS)

$a$  = peso total dos testículos (g)

$b$  = peso corporal (g)

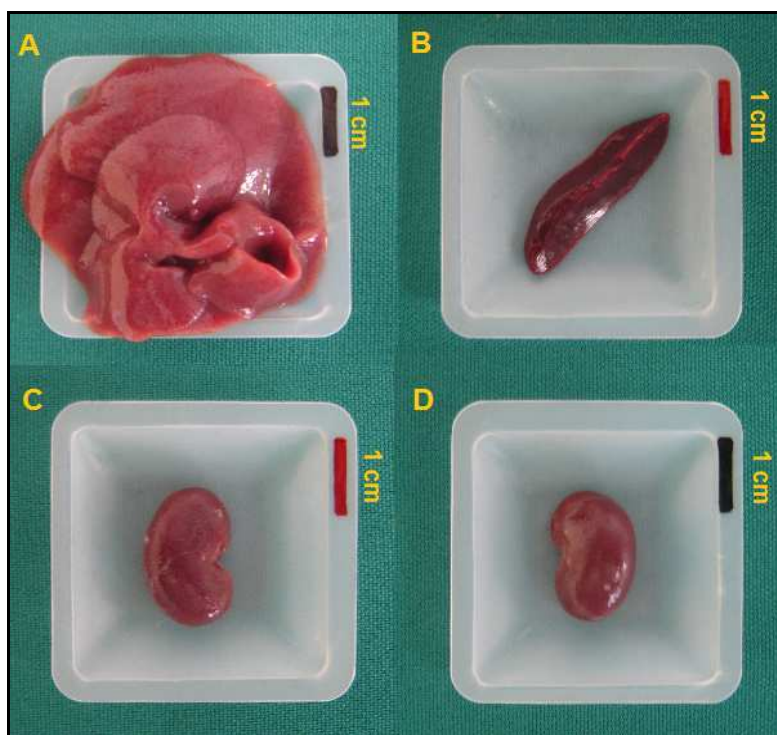
Figura 4 – Órgãos e glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino de ratos Wistar. A – Testículo; B – Epidídimo; C – Vesículas seminais repletas; D – Próstata ventral.



Fonte: arquivo pessoal



Figura 5 – Órgãos de ratos Wistar. A – Fígado; B – Baço; C – Rim esquerdo; D – Rim direito.



Fonte: arquivo pessoal

### 5.11 Análise histométrica testicular

Após pesagem, os testículos foram fixados através da imersão em fixador modificado de Karnovsky (paraformaldeído a 4%: glutaraldeído a 4% em tampão salina fosfato 0,1 mL/L, pH 7,4). Vinte e quatro horas após o início da fixação, o testículo direito teve a túnica albugínea removida e pesada e o parênquima testicular também foi pesado. O testículo esquerdo foi seccionado, retirando-se cerca de 3 mm de suas extremidades, em sentido transversal com auxílio de lâmina afiada, 4, 24 e 48 horas após o início do processo de fixação a fim de proporcionar penetrabilidade do agente fixador no parênquima testicular. Após essa última secção, os fragmentos testiculares foram transferidos e mergulhados em solução de álcool 70% até o processamento histológico.

O processamento histológico testicular, microtomia e coloração foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Sérgio Luis Pinto da Matta.

Os fragmentos testiculares foram incluídos em resina histológica (2-hidroxietil metacrilato, Leica<sup>®</sup> - Alemanha) e submetidos à microtomia. Os cortes foram realizados em espessura de 3 µm, mantendo-se uma distância de 12 cortes entre os escolhidos para o estudo. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro e corados com o corante azul de toluidina – borato de sódio a 1%. As lâminas foram montadas e tiveram as lamínulas fixadas com o auxílio de resina (Entellan<sup>®</sup> - Brasil). Os cortes histológicos foram fotografados em microscópio óptico modelo AXIOPHOT HBO50 (Zeiss<sup>®</sup>) dotado de câmera acoplada para captura modelo AXIOCAM ICc3 (Zeiss<sup>®</sup>). Foi utilizado o programa de captura de imagem e sistema de mensuração digital Axiovision versão 4.7 (Zeiss<sup>®</sup> - Alemanha).

#### 5.11.1 Densidade volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares

Para a avaliação de densidade de volume dos compartimentos tubular e intertubular testiculares, foram utilizadas as fórmulas 3 e 4, respectivamente.

Foram contados 2.660 pontos, utilizando uma grade padronizada de 266 pontos aplicada sobre as fotografias histológicas com o programa Image-Pro Plus<sup>®</sup> versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics - EUA) (Figura 6). A grade é composta por linhas longitudinais e transversais, considerando-se como pontos, as interseções das linhas. Os 2.660 pontos foram obtidos em 10 fotografias tiradas de campos escolhidos de forma aleatória por animal. Cada ponto foi analisado e classificado como pertencente ao compartimento tubular ou intertubular.

$$x = (a \div 2.660) \times 100 \quad (3)$$

$$y = (b \div 2.660) \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

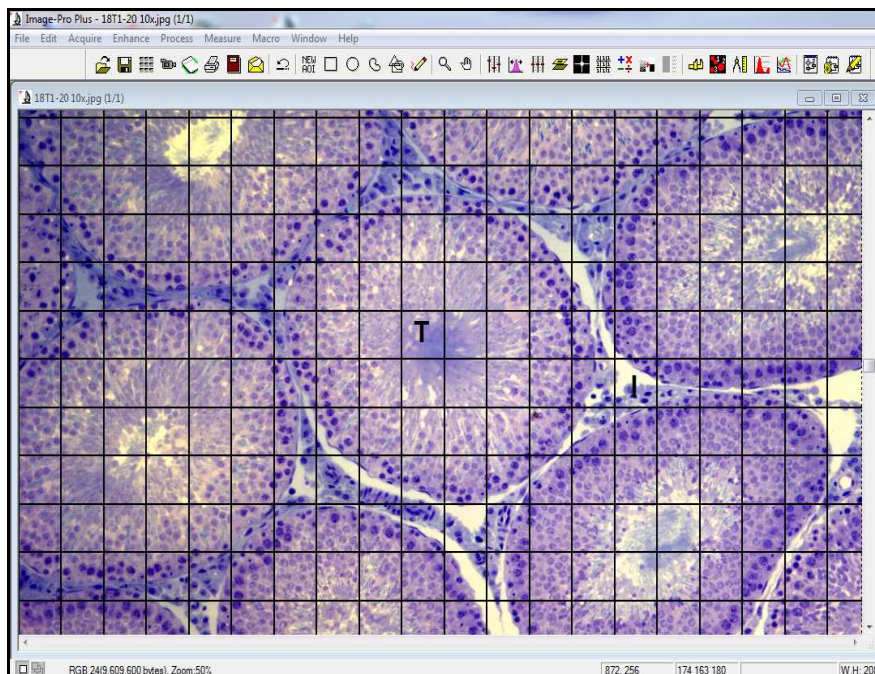
$x$  = densidade volumétrica do compartimento tubular

$y$  = densidade volumétrica do compartimento intertubular

$a$  = soma total dos pontos sobrepostos no compartimento tubular

$b$  = soma total dos pontos sobrepostos no compartimento intertubular

Figura 6 – Determinação da densidade volumétrica dos compartimentos testiculares tubular e intertubular através do Programa Image-Pro Plus®. A contagem de pontos caracterizados pelas interseções das linhas longitudinais e verticais de uma grade ortogonal padronizada de 266 pontos sobre as fotomicrografias forneceu a densidade volumétrica dos compartimentos. T – Compartimento testicular tubular; I – Compartimento testicular intertubular.



Fonte: arquivo pessoal

### 5.11.2 Volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular e índice tubulossomático

Para a determinação do volume dos compartimentos tubular e intertubular, foram utilizadas, respectivamente as fórmulas 5 e 6. Foi considerada a densidade específica testicular igual a 1 (JOHNSON; PETTY; NEAVES, 1981), dessa maneira, o peso do parênquima (g) foi considerado igual ao seu volume (mL).

$$x = (a \times z) \div 100 \quad (5)$$

$$y = (b \times z) \div 100 \quad (6)$$

Sendo:

$x$  = volume do compartimento tubular (mL)

$y$  = volume do compartimento intertubular (mL)

$z$  = peso do parênquima testicular (g)

$a$  = densidade volumétrica do compartimento tubular

$b$  = densidade volumétrica do compartimento intertubular

Também foi calculado o índice tubulossomático (ITS), determinado a partir da fórmula 7:

$$x = (a \div y) \times 100 \quad (7)$$

Sendo:

$x$  = índice tubulossomático (ITS)

$a$  = volume do compartimento testicular tubular

$y$  = peso corporal

### 5.11.3 Diâmetros do túbulo seminífero e do lúmen tubular e altura do epitélio seminífero

Vinte secções transversais dos túbulos seminíferos mais circulares possíveis por animal foram fotografadas com a lente objetiva de 10×. As medidas obtidas de cada túbulo seminífero foram o diâmetro e, dividindo-se este por dois, determinou-se o raio tubular. Paralelamente à medida do diâmetro tubular, foram realizadas duas medidas da altura do epitélio seminífero, tomadas em posições opostas e foi considerado o valor médio dessas duas medidas. Também foi determinado o diâmetro luminal através da diferença entre o valor do diâmetro do túbulo e a soma das duas alturas do epitélio seminífero (Figura 7).

Figura 7 – Determinação de medidas histométricas de túbulo seminífero em corte histológico de testículo de rato Wistar. DT – Diâmetro total tubular; DL – Diâmetro luminal tubular, determinado pela diferença entre a medida do diâmetro total e a soma das duas medidas de altura de epitélio; AE – Altura do epitélio seminífero, tomada pela média de duas medidas diametralmente opostas. Coloração de azul de toluidina – borato de sódio a 1%, espessura de 3  $\mu\text{m}$ .



Fonte: arquivo pessoal

#### 5.11.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo

Com a determinação da medida do raio do túbulo seminífero e do volume ocupado pelos mesmos, foi obtido o comprimento total dos túbulos seminíferos pela fórmula 8 (ATTAL; COUROT, 1963):

$$x = a \div (\pi \times r^2) \quad (8)$$

Sendo:

$x$  = comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo

$a$  = volume do compartimento tubular

$\pi$  = valor de  $pi$ , sendo considerado = 3,14

$r$  = raio do túbulo seminífero

Dividiu-se o comprimento total dos túbulos seminíferos pelo peso total dos testículos e obteve-se o comprimento dos túbulos por grama de testículo.

### 5.11.5 Densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular

Foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região intertubular nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal com aumento de 400× utilizando uma grade padronizada de 609 pontos. Os pontos foram classificados e quantificados conforme estivessem sobre as células de Leydig, vasos sanguíneos, espaços linfáticos, tecido conjuntivo e macrófagos (Figura 8). A densidade volumétrica desses elementos foi calculada a partir da seguinte fórmula 9:

$$x = (a \div 1.000) \times 100 \quad (9)$$

Sendo:

$x$  = densidade volumétrica dos elementos do compartimento intertubular

$a$  = soma total dos pontos sobrepostos sobre cada elemento do compartimento intertubular

O volume dos elementos intertubulares foi calculado a partir da fórmula 10:

$$x = (a \times z) \div 100 \quad (10)$$

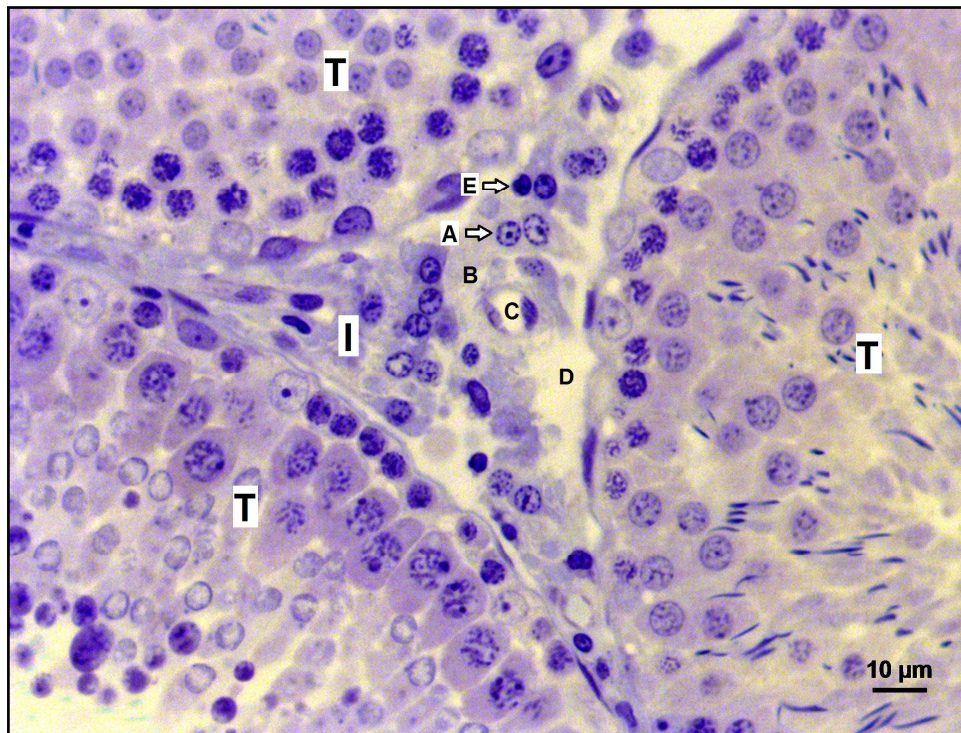
Sendo:

$x$  = volume do elemento intertubular

$a$  = densidade volumétrica de um elemento do compartimento intertubular

$z$  = volume do espaço total intertubular

Figura 8 – Identificação dos componentes do compartimento testicular intertubular em fotomicrografia de corte histológico de testículo de rato Wistar. I – Compartimento intertubular constituído por: A – Células de Leydig (seta); B – Tecido conjuntivo; C – Vaso sanguíneo; D – Espaço linfático; E – Macrófago (seta). T – Compartimento tubular constituído pelos túbulos seminíferos. Coloração de azul de toluidina – borato de sódio a 1%, espessura de 3 µm.



Fonte: arquivo pessoal

### 5.12 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 (Statistical Package for the Social Sciences<sup>®</sup> - EUA), versão 13.0.



## 6. Referências

AKINGBEMI, B. T. Estrogen regulation of testicular function. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.51, p.1-13, 2005.

AL-YAHYA, A. A. et al. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107 p.222–228, 2006.

ANDERSON, D. Male-mediated developmental toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, S506-S513, 2005.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Diário Oficial da União, Resolução RDC nº 95, de 11 de dezembro de 2008 - Brasil. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>>. Acesso: 12 jul. 2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Norma para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996 - Brasil. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116\\_96.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm)>. Acesso: 10 jul 2012.

ASSINDER, S. et al. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. **Reproduction**, v.133, p.11-9, 2007.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénese chez le taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v.3, n.3, p. 219-241, 1963.

BARATTO, L. C.; RODIGHERO, J. C.; SANTOS, C. A. M. Ginkgo. **Ciência Hoje**, v.45, n.266, p.52-56, 2009.

BAY, K. et al. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.20, n.1, p.77-90, 2006.

BLUMENTHAL, M.; BRINCKMANN, J.; WOLLSCHLAEGER, B. *Ginkgo biloba*. In: **The ABC Clinical Guide to Herbs**. New York: Thieme, 2003. p.185-200.

BRETVELD, R. et al. Influence of pesticides on male fertility. **Scandinavian Journal of Work Environment and Health**, v.33, n.1, p.13–28, 2007.

CARLSEN, E. et al. Evidence of decreasing quality of semen during past 50 years. **British Journal of Medicine**, v.305, p.609-913, 1992.

CARREAU, S. Estrogens and male reproduction. **Folia Histochemia Cytobiologica**, v.38, p.47-52, 2000.

CARREAU, S. et al. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.246, p.65-68, 2006.

CARREAU, S. et al. Estrogens: a new player in spermatogenesis. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v.45, supp.1, p.5-10, 2007.

CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. **Advances in Medical Sciences**, v.57, p.1-6, 2012.

CARREAU, S.; VIENNE, C.; GALERAUD-DENIS, I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. **Advances in Medical Sciences**, v.53, n.2, p.139-144, 2008.

CHAN, W. -H. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts. **Human Reproduction**, 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**, v.338, p.1263-1267, 2005.

COBELLIS, G. et al. *c-fos* activity in *Rana esculenta* testis: seasonal and estradiol-induced changes. **Endocrinology**, v.140, n.7, p.3238-3244, 1999.

CORNWAL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v.15, n.2, p.213-227, 2009.

CUMMINGS, A. M.; KAVLOCK, R. J. Function of sexual glands and mechanism of sex differentiation. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.29, n.3, p.167-178, 2004.

DALGAARD, M. D. et al. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. **Journal of Medical Genetics**, v.49, p.58-65, 2012.

DELBÈS, G.; LEVACHER, C.; HABERT, R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. **Reproduction**, v.132, p.527-538, 2006.

DEPUYDT, C. E. et al. Hormonal regulation of Inhibin B secretion by immature rat Sertoli cells *in vitro*: possible use as a bioassay for estrogen detection. **Journal of Andrology**, v.20, n.1, p.54-62, 1999.

DIAMOND, B. J. et al. *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v.81, n.5, 668-678, 2000.

DIAZ, R. et al. Histological modifications of the rat prostate following transection of somatic and autonomic nerves. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.82, n.2, p.397-404, 2010.

DUGOUA, J. J. et al. Safety and efficacy of ginkgo (*Ginkgo biloba*) during pregnancy and lactation. **Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v.13, n.3, p.e277-284, 2006.

FAQI, A. S. et al. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. **Reproductive toxicology**, v.18, p.605-611, 2004.

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.

FISHER, J. N. et al. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. **Human Reproduction**, v.18, n.7, p.1383-1394, 2003.

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

GONZÁLEZ, G. F. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v.3, p.251-258, 2001.

GONZÁLEZ, G. F.; VILLENA, A. O. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. **International Journal of Andrology**, v.24, p.255-260, 2001.

GORBMAN, A; SOWER, S. A. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. **General and Comparative Endocrinology**, v.134, p.207-213, 2003.

GRISWOLD, M. D.; MCLEAN, D. The Sertoli cell. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.2061-2126.

HARRIS, G. C.; LEVINE, J. E. Pubertal acceleration of pulsatile gonadotropin-releasing hormone release in male rats as revealed by microdialysis. **Endocrinology**, v.144, n.1, p.163-171, 2003.

HAUSER, R.; SOKOL, R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. **Fertility and Sterility**, v.89, supplement 1, e59-65, 2008.

HERMO, L. et al. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. **Microscopy Research and Technique**, v.73, p.243-278, 2010a.

HERMO, L. et al. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v.73, p.279-319, 2010b.

HESS, R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, n.52, p.1-14, 2003.

HESS, R. A. Spermatogenesis, overview. **Encyclopedia of Reproduction**, v.4, p.539-545, 1999.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y (ed). **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Austin: Landes Bioscience, 2008. p.1-15.

HOBERMAN, A. M. et al. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 83, p.123–133, 2008.

HOFFMAN, W. P. et al. Analysis of rodent growth data in toxicology studies. **Toxicological Sciences**, v.66, p.313-319, 2002.

HU, G. –X. et al. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.20, n.3, p.139–145, 2009.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5 (R2), p.1-21, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>>. Acesso: 12 de jul. 2012.

JOENSEN, U. N. et al. Testicular dysgenesis syndrome and Leydig cell function. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.102, p.155-161, 2008.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v.25, p.217-226, 1981.

JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biology of Reproduction**, v.84, p.207-217, 2011.

KANETO, M. et al. Epididymal sperm motion as a parameter of male reproductive toxicity: sperm motion, fertility, and histopathology in ethinylestradiol-treated rats. **Reproductive Toxicology**, v.13, p.279-289, 1999.

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.

KERR, J. B. et al. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.827-947.

KHANDUJA, K. L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. Impairment of human motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. **Andrologia**, v.33, p.277-281, 2001.

KOBAYASHI, Y.; NOZU, R.; NAKAMURA, M. Role of estrogen in spermatogenesis in initial phase males of the three-spot wrasse (*Halichoeres trimaculatus*): effect of aromatase inhibitor on the testis. **Developmental Dynamics**, v.240, p.116-121, 2011.

KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  to the estrogen response element. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7632-7635, 2003.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . **Endocrinology**, v.139, n.10, p.4252-4263, 1998.

LÓPEZ, B. D. et al. Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1057, p.337-364, 2005.

LUCAS, T. F. G. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v.83, p.307-317, 2010.

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 Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v.68, n.1, p.3-8, 2011.

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.

MARTIN, O. et al. Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1601-1618, 2008.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.54, p.148-157, 2010.

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.

NAVARRO, V. M. New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. **Frontiers in Endocrinology**, v.3, n.48, Epud 2012.

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

O'DONNELL, L. et al. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.1017-1069.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Testing and Assessment No. 21 – Appraisal of Test Methods of Sex Hormone

Disrupting Chemicals, 2002. Disponível em: <<http://lysander.sourceoecd.org/vl=5044671/cl=19/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n5/s19/p1>>. Acesso: 12 jul. 2012.

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](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_9789264071209-en;jsessionid=1t5rnshjgi83k.epsilon)> Acesso: 13 jun. de 2012.

OH, S. M.; CHUNG, K. H. Antiestrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.100, p.167–176, 2006.

OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sciences**, v.74, p.1325–1335, 2004.

OLIVEIRA, R. L. et al. Distribution of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression. **General and Comparative Endocrinology**, v.161, p.283-292, 2009.

ONDRIZEK, R. R. et al. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. **Fertility and Sterility**, v.71, p.517–522, 1999a.

ONDRIZEK, R. R. et al. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.16, p.87–91, 1999b.

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

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.

PATISAUL, H. B.; ADEWALE, H. B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.3, p.1-18, 2009.

PAULUS, W. E. et al. Application of *Ginkgo biloba* in Assisted Reproduction Therapy. **Fertility and Sterility**, v.78, S124, 2002.

PERREAULT, S. D.; CANCEL, A. M. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. **Reproduction**, v.121, p.207-216, 2001.

PFLIEGER-BRUSS, S.; SCHUPPE, H. -C.; SCHILL, W. -B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia**, v.36, p.337–345, 2004.

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.

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.

RISBRIDGER, G. P.; TAYLOR, R. A. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.1149-1172.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. -C. The Epididymis. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.1071-1148.

RUSSELL, L. D. et al. Mammalian spermatogenesis. In : \_\_\_\_\_. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Florida: Cache River Press, 1990. p.1-40.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Bulding a testis. **Tissue & Cell**, v.27, n.2, p.129-147, 1995.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, v.205, p.3-10, 2004.

SAILLENFAIT, A. M.; SABATÉ, J. P.; GALLISSOT, F. Effects of *in utero* exposure to di-*n*-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. **Reproductive Toxicology**, v.28, p.468-476, 2009.

SAKAUE, M. et al. Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. **Journal of Occupational Health**, v.43, p.185-190, 2001.

SAUNDERS, P. T. K. et al. ER $\beta$ 1 and the ER $\beta$ 2 splice variant (ER $\beta$ cx/ $\beta$ 2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.6, p.2706-2715, 2002.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v.10, n.3, p.237-244, 1996.

SETCHELL, B. P.; BREED, W. G. Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.771-825.

SHARPE, R. M. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.365, p.1697-1712, 2010.

SHARPE, R. M. The roles of oestrogen in the male. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.9, n.9, p.371-377, 1998.

SHIAO, N. -H.; CHAN, W. -H. Injury effects of ginkgolide B on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology Letters**, v.188, p.63-69, 2009.

SHIMOMURA, K. et al. K. Insight into testicular damage induced by ethinylestradiol in rats. **Reproductive Toxicology**, v.20, p.157-163, 2005.

SIERENS, J. E. et al. Estrogens in testis biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1061, p.65-76, 2005.

SIERPINA, V. S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. *Ginkgo biloba*. **American Family Physician**, v. 68, p.923-926, 2003.

SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian Journal of Andrology**, v.10, n.1, p.134-145, 2008.

SINGH, B. et al. Biology and Chemistry of *Ginkgo biloba*. **Fitoterapia**, v.79, p.401-418, 2008.

SKAKKEBAEK, N. E. et al. Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. **APMIS**, v.111, p.1-11, 2003.

SKAKKEBAEK, N. E.; MEYTS, E. R.; MAIN, K. M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction**, v.16, n.5, p.972-978, 2001.

SMITH, J. V.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.465-72, 2004.

SONNE, S. B. et al. Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma *in situ* testis. **International Journal of Andrology**, v.31, p.275-287, 2008.

SOWER, S. A.; FREMAT, M.; KAVANAUGH, S. I. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: New insights from lampreys. **General and Comparative Endocrinology**, v.161, p.20-29, 2009.

STOCCO, D. M.; MCPHAUL, M. J. Physiology of testicular steroidogenesis. In: NEILL, J. D. et al. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego: Elsevier, 2006. p.977-1016.

STORGAARD, L.; BONDE, J. P.; OLSEN, J. Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. **Reproductive Toxicology**, v.21, p.4-15, 2006.

STROMGAARD, K.; NAKANISHI, K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. **Angewandte Chemie International Edition**, v.43, n.13, p.1640-1658, 2004.

SWAN, S. H.; ELKIN, E. P.; FENSTER, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. **Environmental Health Perspectives**, v.108, n.10, 961-966, 2000.



TAEPOONGSORAT, 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.

TAVARES, R. S. et al. Parabens in male infertility – Is there a mitochondrial connection? **Reproductive Toxicology**, v.27, p.1–7, 2009.

TOPPARI, J. et al. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. **Birth Defects Research (Part A)**, v.88, p.910-919, 2010.

UZUN, F. G. et al. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1903–1908, 2009.

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

VICTOR-COSTA, A. B. et al. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to atrazine. **Reproductive Toxicology**, v.29, p.323-331, 2010.

VIDAEFF, A. C.; SEVER, L. E. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. **Reproductive Toxicology**, v.20, p.5-20, 2005.

VIRTANEN, H. E. et al. Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, S501-S505, 2005.

VOGL, A. W. et al. Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. **Archives of Histology and Cytology**, v.63, n.1, p.1-15, 2000.

VOSGES, M.; BRAGUER, J. –C.; COMBARNOUS, Y. Long-term exposure of male rats to low-dose ethinylestradiol (EE2) in drinking water: Effects on ponderal growth and on litter size of their progeny. **Reproductive Toxicology**, v.25, p.161-168, 2008.

WARING, R. H. et al. Phytoestrogens and xenoestrogens: the contribution of diet and environment to endocrine disruption. **Journal of Steroid and Biochemistry & Molecular Biology**, v.108, p.213-220, 2008.

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). 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.

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5. ed. Geneva: WHO Press, 2010. 287p.

WOHLFAHRT-VEJE, C. et al. Smaller genitals at school age in boys whose mothers were exposed to non-persistent pesticides in early pregnancy. **International Journal of Andrology**, v. 35, p.265-272, 2012.

WOHLFAHRT-VEJE, C.; MAIN, K. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. **Clinical Endocrinology**, v.71, p.459-465, 2009.

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

WOODRUFF, T. J. et al. Proceedings of the summit on environmental challenges to reproductive health and fertility: executive summary. **Fertility and Sterility**, v.89, n.2, p.281-300, 2008.

YAMAMOTO, M. et al. Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on epididymal development in rat offspring. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.71, n.3, p.375-378, 2009.

YAMAMOTO, M. et al. Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.30, n.1, p.7-18, 2005.

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 Journal of Pharmacology**, v.156, p.48-61, 2009.

YEH, K. –Y. et al. *Ginkgo biloba* extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats. **Hormones and Behavior**, v.53, p.225-231, 2008.

YEH, K. –Y. et al. *Ginkgo biloba* extract enhances noncontact erection in rats: the role of dopamine in the paraventricular nucleus and mesolimbic system. **Neuroscience**, v.189, p.199–206, 2011.

YEH, K. –Y. et al. *Ginkgo biloba* extract treatment increases noncontact erections and central dopamine levels in rats: role of the bed nucleus of the stria terminalis and the medial preoptic area. **Psychopharmacology**, v.210, n.4, p.585-590, 2010.

YEH, K. –Y.; WU, C. –H.; TSAI, Y. –F. *Ginkgo biloba* treatment increases copulation but not nNOS activity in the medial preoptic area in male rats. **Neurosciences Letters**, v.500, p.182-186, 2011.

## 7. Resultados

### Artigo 1

#### **O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) não causa toxicidade sistêmica e não altera órgãos do sistema reprodutor masculino de ratos Wistar adultos**

##### **Resumo**

O Extrato de *Ginkgo biloba* (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 *Ginkgo biloba* nas seguintes doses: 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/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). Indícios de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso, piloereção, diarreia, cromodacriorreia, estereotipias, 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 órgãos 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:** *Ginkgo biloba*, ratos, toxicidade, fitoterapia.

## 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 *Ginkgo biloba* (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 5 ppm 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.

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 *Ginkgo biloba*. Al-Yahya et al. (2006) relataram diminuição do peso da cauda do epidídimo, da próstata, dos níveis de ácidos nucléicos 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 antioxidativas. 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 espermatídes de ratos. Taepongsorat et al. (2008) evidenciaram que a quercetina, um dos componentes do EGb, melhorou parâmetros reprodutivos como motilidade, vitalidade e concentração de espermatozoides, além de aumentar o peso testicular de ratos.

O trabalho objetivou verificar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba*, 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 *Ginkgo biloba***

O extrato de *Ginkgo biloba* 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 5 ppm 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  $22\pm 2^\circ$  C, iluminação com ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49×34×16 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  $22\pm 2^\circ$  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 1 mL de água destilada e os grupos tratados receberam: 3,5 mg/kg (EGb 3,5); 7,0 mg/kg (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) do extrato aquoso de *Ginkgo biloba* (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 *Ginkgo biloba*, os animais foram observados por 30 minutos para a detecção de possíveis sinais clínicos de toxicidade aguda como alterações da atividade locomotora e comportamentais. Indícios de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso, piloereção, diarreia, cromodacriorreia, 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<sup>®</sup> - Japão). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através da análise de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico (Laborclin<sup>®</sup> - Brasil). Os parâmetros hematológicos analisados foram a hematimetria ( $10^6/\mu\text{L}$ ); hematócrito (%); hemoglobimetria (g/dL); volume globular médio (fL); hemoglobimetria globular média (pg); concentração de hemoglobina globular média (%); leucometria total ( $10^3/\mu\text{L}$ ) 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 Labmax Progress (Labtest<sup>®</sup> - Brasil) e kits Labtest<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> - 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 (Statistical Package 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, estereotípias 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



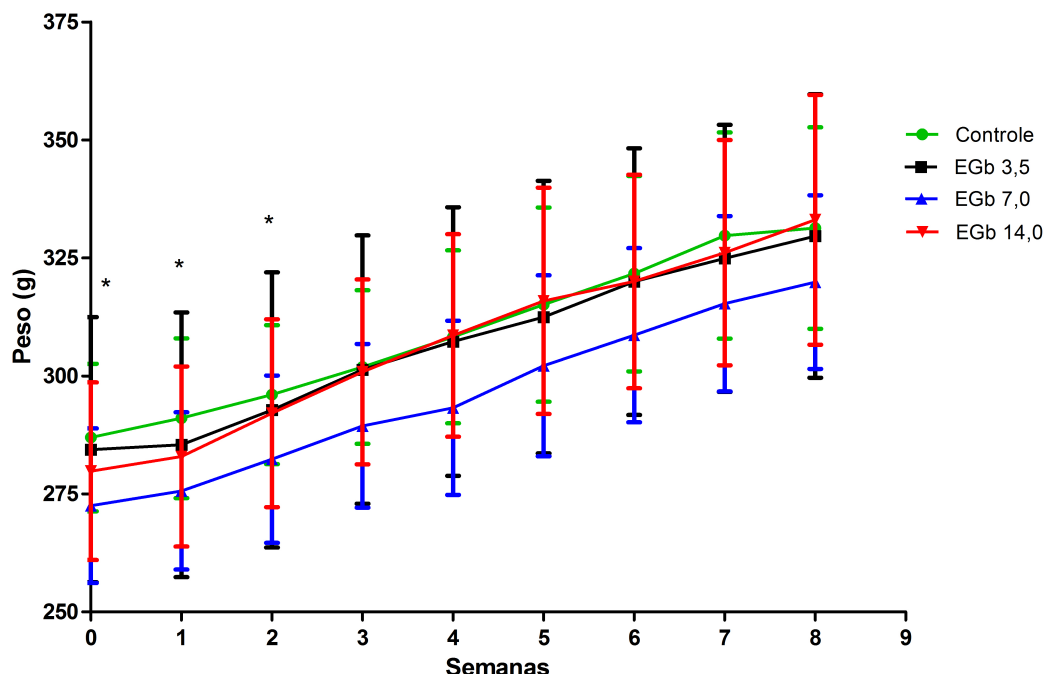
controle, com exceção da sexta semana de tratamento, em que o grupo controle ingeriu uma quantidade inferior do que os grupos tratados e da oitava semana em que o grupo controle apresentou um consumo inferior ao EGb 14,0 (Figura 2).

Na avaliação hematológica dos animais, houve diferença estatística significativa na 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 (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).

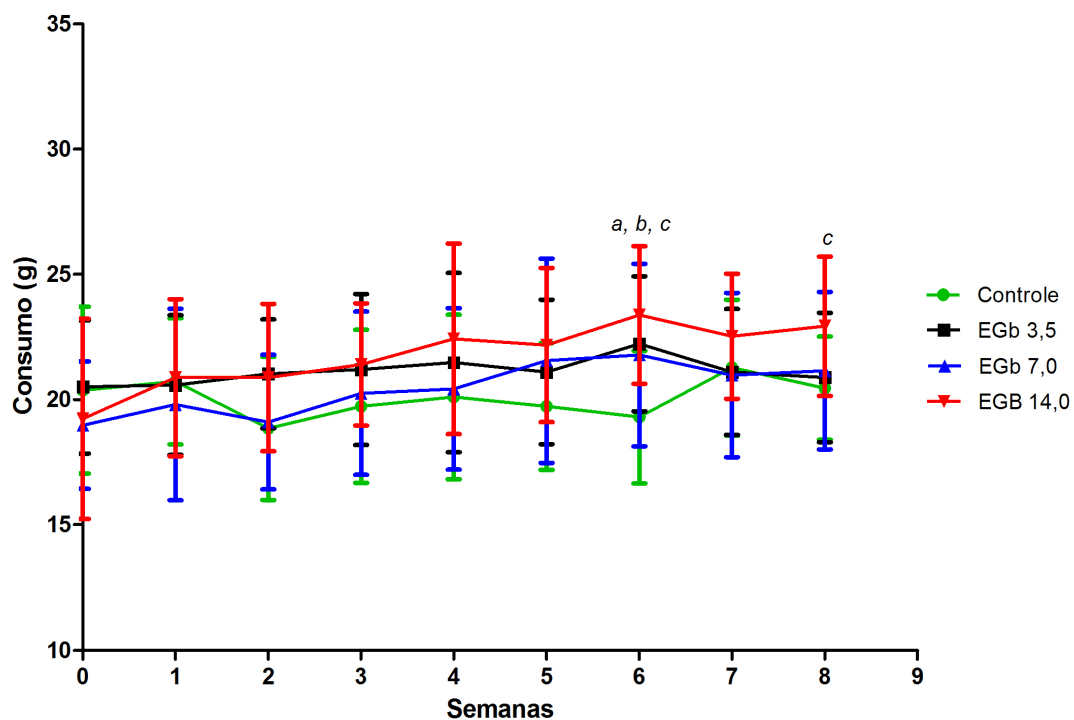
Figura 1 – Peso corporal (g), avaliado semanalmente, de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (1 mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) por 8 semanas. Dados expressos em média±desvio-padrão.



$p > 0,05$

\*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 (1 mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) por 8 semanas. Dados expressos em média±desvio-padrão.



Foi utilizado o teste estatístico ANOVA em todas as avaliações;

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

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

<sup>c</sup>  $p \leq 0,05$ . 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 (1 mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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 ( $10^6/\mu\text{L}$ )	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 <sup>b</sup>	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 <sup>a,b</sup>	36,35±0,41	36,40±0,51 <sup>c</sup>
LEU ( $10^3/\mu\text{L}$ )	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;

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$ . O Grupo EGb 3,5 difere do EGb 7,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

<sup>b</sup>  $p \leq 0,05$ . O Grupo EGb 3,5 difere do EGb 14,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

<sup>c</sup>  $p \leq 0,05$ . O Grupo Controle difere do EGb 14,0 pelo teste *post hoc* de Tukey.

HEM – Hematimetria ( $10^6/\mu\text{L}$ ); 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 ( $10^3/\mu\text{L}$ ); 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 (1 mL) (Grupo Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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)
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 (SELLERS et 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 Panunto et al. (2010) utilizando *Terminalia chebula*, 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 (SELLERS et 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* in 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 *Phyllanthus niruri*. **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* leave 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 Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v.68, n.1, p.3-8, 2011.
- MANGELSDORF, 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.
- 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](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* to 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: OrganWeight 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 Microbiol and Biotechnology**, v.64, p.465-72, 2004.

STROMGAARD, K.; NAKANISHI, K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. **Angewandte Chemie International Edition**, v.43, n.13, p.1640-1658, 2004.

TAEPOONGSORAT, 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 Journal of Pharmacology**, v.156, p.48-61, 2009.

## Artigo 2

### **O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) não altera a morfometria testicular, concentração sérica de testosterona e a qualidade espermática em ratos Wistar adultos**

#### **Resumo**

O Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é um fitoterápico usado principalmente para quadros de demência, melhoria da circulação sanguínea periférica e doença de Alzheimer. Entretanto, esse fitoterápico tem sido utilizado no tratamento da disfunção erétil e como afrodisíaco. Ratos Wistar de três meses de idade foram tratados com água destilada (Grupo Controle) e extrato aquoso de *Ginkgo biloba* nas seguintes doses: 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) uma vez ao dia, por 56 dias consecutivos. Após a eutanásia, espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo e foram submetidos à contagem e avaliados quanto à vitalidade e morfologia. Os testículos foram pesados, fixados e processados para histologia e tiveram as seguintes medidas histométricas tomadas: densidade volumétrica e volume dos compartimentos testiculares, tubular e intertubular. No compartimento tubular, foram analisados os diâmetros total e luminal, altura do epitélio, comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo. No compartimento intertubular, foram tomados os valores de densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular como as células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos. Foi medida a concentração de testosterona total sérica pelo método de ELISA. Os resultados não demonstraram diferença estatística significativa em todos os parâmetros analisados, exceto no volume das células de Leydig, que se apresentaram estatisticamente inferiores nos grupos EGb 3,5 e EGb 7,0, quando comparados aos grupos controle e EGb 14,0. A redução do volume ocupado pelas células de Leydig nesses grupos poderia sugerir algum déficit funcional dessa célula, resultando em queda da concentração sérica de testosterona, o que não foi observado, sugerindo que o extrato não exerceu efeito sobre sua capacidade funcional. Conclui-se, portanto, que ratos Wistar adultos, expostos às doses de EGb utilizadas nesse trabalho, não apresentaram alteração da morfometria testicular nem da contagem, vitalidade e morfologia dos espermatozoides.

**Palavras-chave:** *Ginkgo biloba*, túbulo seminífero, célula de Leydig, testículo, espermatozoides, fitoterapia.

## 1. Introdução

O Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) é um fitoterápico 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) e entre 5 a 7% de terpeno trilactonas (*ginkgolídeos*: A, B, C e J) (WHO, 1999; VAN BEEK, 2002; SMITH; LUO, 2004; OH; CHUNG, 2004).

Entretanto, esse fitoterápico tem sido utilizado no tratamento da disfunção erétil, principalmente se causada pelo uso de antidepressivos (KANG et al., 2002; MACKAY, 2004; MOYAD et al., 2004; WHEATLEY, 2004; TAMLER; MECHANICK, 2007) e como afrodisíaco (MALVIYA et al., 2011) o que levou a um crescente consumo do extrato por homens. Estudos experimentais por Paick; Lee (1996) demonstraram que o EGb apresentou efeito de relaxamento sobre a musculatura lisa do corpo cavernoso peniano de coelhos e humanos, *in vitro*. Registrou-se também aumento no comportamento de cópula (YEH et al., 2008; YEH; WU; TSAI, 2011) e ereções (YEH et al., 2010; YEH et al., 2011) em ratos submetidos ao extrato, o que poderia evidenciar ainda mais o efeito sobre a disfunção erétil e libido.

A espermatogênese é um processo complexo que ocorre no interior dos túbulos seminíferos e é responsável pela produção de células haplóides altamente especializadas, os espermatozoides a partir das células indiferenciadas. Este processo ocorre sob influência de da testosterona, hormônio produzido pela células de Leydig e que estão localizadas no tecido intersticial (O'DONNELL et al., 2006). Entretanto, tem sido demonstrado que a fertilidade masculina também é dependente de um equilíbrio na ação dos hormônios androgênicos e estrogênicos e, cada vez mais, tem sido evidenciada a importância desse último na espermatogênese (CARREAU et al., 2007). A identificação dos receptores estrogênicos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) e  $\beta$  (ER- $\beta$ ) no sistema reprodutor

masculino (Sharpe, 1998) e a importância da enzima aromatase que realiza a conversão da testosterona em estrógeno nas células de Leydig, são indícios da necessidade desse hormônio para o processo espermatogênico (CARREAU; BOURAIMA-LELONG; DELALANDE, 2012).

Muitas substâncias, como os contaminantes ambientais, têm sido relatadas como possíveis causadores de efeitos lesivos sobre o sistema reprodutor masculino por atuarem como disruptores endócrinos (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004; SAFE, 2004; HAUSER; SOKOL, 2008; WOODRUFF et al., 2008; SHARPE, 2010). Os Ftalatos (HU et al., 2009; SAILLENFAIT; SABATÉ; GALLISSOT, 2009; MARTINO-ANDRADE; CHAOD, 2010), parabenos (HOBERMAN et al., 2008; TAVARES et al., 2009), pesticidas organoclorados (BRETVELD et al., 2007; UZUN et al., 2009; VICTOR-COSTA et al., 2010) e bisfenóis (SAKAUE et al., 2001) podem exercer essa atividade sobre o sistema reprodutor masculino por mimetizarem a ação do estrogênio endógeno ou alterarem o seu metabolismo.

Efeitos estrogênicos para o EGb e seus principais componentes flavonólicos isolados (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) foram demonstrados por Oh; Chung (2004) que verificaram afinidade dos compostos aos receptores estrogênicos recombinantes humanos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) e, principalmente, aos  $\beta$  (ER- $\beta$ ) *in vitro*. Estudos experimentais demonstraram que houve diminuição do peso da cauda do epidídimo, da próstata, dos níveis de ácidos nucléicos testiculares, além da baixa taxa de prenhez e perdas pré-implantação de camundongos *Swiss* submetidos ao extrato aquoso de EGb (AL-YAHYA et al., 2006). Adicionalmente, elevadas doses de extrato de *Ginkgo biloba* induziram a diminuição da penetração de espermatozoides na zona pelúcida de ovócitos de hamster (ONDRIZEK et al., 1999a) e inibiram a motilidade de espermatozoides humanos (ONDRIZEK et al., 1999b). Devido à possibilidade dos componentes flavonólicos do EGb se ligarem aos receptores  $\beta$  estrogênicos (ER- $\beta$ ) e atuarem como desreguladores endócrinos e alterarem a fisiologia de órgãos do sistema reprodutor masculino, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* sobre os testículos de ratos Wistar adultos.

## 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 *Ginkgo biloba*

O extrato de *Ginkgo biloba* 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 5 ppm 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  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , iluminação com ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49×34×16 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  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . 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 1 mL 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 *Ginkgo biloba* (EGb) por dia. A menor dose correspondeu à dose terapêutica preconizada para humanos (WHO, 1999; BLUMENTHAL; BRINCKMANN; WOLLSCHLAEGER, 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).

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).

### 2.4 Contagem dos espermatozoides

Os espermatozoides foram coletados através de uma incisão na cauda do epidídimo direito (SEED et al., 1996). A secreção epididimária foi imediatamente colocada em 50 µL de solução tampão salina fosfato (Sigma<sup>®</sup>), previamente aquecida a 37° C e depositada em placa de Petri. Essa amostra foi diluída na ordem de 1:300 com água destilada e os espermatozoides foram contados em câmara de Neubauer, em microscópio óptico modelo BX41TF (Olympus<sup>®</sup> Tóquio, Japão), no aumento de 100×. O valor do quadrante lateral do retículo do hematocítômetro foi aplicado na fórmula 1:

$$x = a \times 300 \times 10^4 \quad (1)$$

Sendo:

$x$  = concentração final de espermatozoides/mL

$a$  = média obtida de oito quadrantes laterais da câmara de Neubauer

## 2.5 Avaliação da vitalidade espermática

Foi realizado esfregaço de espermatozoides e corado pela técnica de nigrosina-eosina (WHO, 2010). Duzentos espermatozoides de cada animal foram avaliados como vivos ou mortos em microscópio de luz em aumento 1.000×. Somente foram considerados os espermatozoides íntegros (que apresentaram cabeça e cauda). Os dados foram expressos em porcentagem de espermatozoides vivos.

## 2.6 Avaliação da morfologia espermática

Esfregaços dos espermatozoides foram corados pela técnica de Shorr, para contagem e classificação morfológica dos espermatozoides a fim de determinar os índices de anormalidades (WHO, 2010). Foram contados e analisados 200 espermatozoides íntegros e classificados em normais e anormais em microscópio de luz no aumento de 1.000×. As alterações morfológicas consideradas, segundo Seed et al. (1996) e Perreault; Cancel (2001) foram:

2.6.1 Cabeça amorfa: perda da forma de foice ou gancho, característica dos espermatozoides de ratos;

2.6.2 Defeitos de cauda: enrolada ou quebrada;

O resultado dos dados foi expresso em porcentagem de espermatozoides normais para cada animal.

## 2.7 Preparo dos tecidos

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à necropsia e tiveram os testículos removidos e pesados em balança de precisão. Foi calculado o índice gonadossomático (IGS), que é o peso testicular expresso como porcentagem do peso corporal (Fórmula 2):

$$x = (a \div b) \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

$x$  = índice gonadossomático (IGS)

$a$  = peso total dos testículos (g)

$b$  = peso corporal (g)



Os testículos foram fixados através da imersão em fixador modificado de Karnovsky (paraformaldeído a 4%: glutaraldeído a 4% em tampão salina fosfato 0,1ml/L, pH 7,4). Vinte e quatro horas após o início da fixação, o testículo direito teve a túnica albugínea removida e pesada e o parênquima testicular também foi pesado. O testículo esquerdo foi seccionado e fragmentos testiculares foram incluídos em resina histológica (Leica<sup>®</sup>) e submetidos à microtomia. Os cortes foram realizados em espessura de 3 µm, mantendo-se uma distância de 12 cortes entre os escolhidos para o estudo. Foram dispostos em lâminas de vidro e corados com o corante azul de toluidina - borato de sódio a 1%. Os cortes histológicos foram fotografados em microscópio óptico modelo AXIOPHOT HBO50 (Zeiss<sup>®</sup> - Alemanha), dotado de câmera acoplada para captura modelo AXIOCAM ICc3 (Zeiss<sup>®</sup> - Alemanha). Foi utilizado o programa de captura de imagem e sistema de mensuração digital Axiovision versão 4.7 (Zeiss<sup>®</sup> - Alemanha).

## 2.8 Análise histométrica testicular

### 2.8.1 Densidade volumétrica dos compartimentos testiculares tubular e intertubular

Para a avaliação de densidade volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares, foram utilizadas as fórmulas 3 e 4, respectivamente.

Foram contados 2.660 pontos com o programa Image-Pro Plus<sup>®</sup> versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics – EUA) utilizando uma grade padronizada de 266 pontos aplicada sobre 10 imagens tomadas utilizando a lente objetiva de 10× e obtidas de campos escolhidos de forma aleatória. Os pontos foram classificados como pertencentes ao compartimento tubular ou intertubular.

$$x = (a \div 2.660) \times 100 \quad (3)$$

$$y = (b \div 2.660) \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

$x$  = densidade volumétrica do compartimento tubular

$y$  = densidade volumétrica do compartimento intertubular

$a$  = soma total dos pontos sobrepostos no compartimento tubular

$b$  = soma total dos pontos sobrepostos no compartimento intertubular

### 2.8.2 Volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular e índice tubulossomático

Para a determinação do volume dos compartimentos tubular e intertubular, foram utilizadas, respectivamente as fórmulas 5 e 6. Foi considerada a densidade específica testicular igual a 1 (JOHNSON; PETTY; NEAVES, 1981), dessa maneira, o peso do parênquima (g) foi considerado igual ao seu volume (mL).

$$x = (a \times z) \div 100 \quad (5)$$

$$y = (b \times z) \div 100 \quad (6)$$

Sendo:

$x$  = volume do compartimento tubular (mL)

$y$  = volume do compartimento intertubular (mL)

$z$  = peso do parênquima testicular (g)

$a$  = densidade volumétrica do compartimento tubular

$b$  = densidade volumétrica do compartimento intertubular

Também foi calculado o índice tubulossomático (ITS), determinado a partir da fórmula 7:

$$x = (a \div y) \times 100 \quad (7)$$

Sendo:

$x$  = índice tubulossomático (ITS)

$a$  = volume do compartimento testicular tubular

$y$  = peso corporal

### 2.8.3 Diâmetros do túbulo seminífero e do lúmen tubular e altura do epitélio seminífero

Vinte secções transversais de túbulos seminíferos mais circulares possíveis foram fotografadas para cada animal com a lente objetiva de 10× e em cada secção mediram-se o diâmetro e o raio. Paralelamente à medida do diâmetro tubular, foram realizadas duas medidas da altura do epitélio seminífero, tomadas em posições opostas e foi considerado o valor médio dessas duas medidas. Também foi determinado o diâmetro luminal através da diferença entre o valor do diâmetro do túbulo e a soma das duas alturas do epitélio seminífero.

#### 2.8.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo

Com a determinação da medida do raio do túbulo seminífero e do volume ocupado pelos mesmos, foi obtido o comprimento total dos túbulos seminíferos pela fórmula 8 (ATTAL; COUROT, 1963):

$$x = a \div (\pi \times r^2) \quad (8)$$

Sendo:

$x$  = comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo

$a$  = volume do compartimento tubular

$\pi$  = valor de  $pi$ , sendo considerado = 3,14

$r$  = raio do túbulo seminífero

Dividiu-se o comprimento total dos túbulos seminíferos pelo peso total dos testículos e obteve-se o comprimento dos túbulos por grama de testículo.

#### 2.8.5 Densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular

Foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região intertubular nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal com a lente objetiva de 40× utilizando uma grade padronizada de 609 pontos. Os pontos foram classificados e quantificados conforme estivessem sobre as células de Leydig, vasos sanguíneos, espaços linfáticos, tecido conjuntivo e macrófagos. A densidade volumétrica desses elementos foi calculada a partir da seguinte fórmula 9:

$$x = (a \div 1.000) \times 100 \quad (9)$$

Sendo:

$x$  = densidade volumétrica dos elementos do compartimento intertubular

$a$  = soma total dos pontos sobrepostos sobre cada elemento do compartimento intertubular

O volume dos elementos intertubulares foi calculado a partir da fórmula 10:

$$x = (a \times z) \div 100 \quad (10)$$

Sendo:

$x$  = volume do elemento intertubular

$a$  = densidade volumétrica de um elemento do compartimento intertubular

$z$  = volume do espaço total intertubular

## **2.9 Dosagem hormonal sérica de testosterona**

O soro sanguíneo dos animais foi armazenado em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da concentração sérica de testosterona através do imunoensaio ELISA com kit da marca Caymman Chemicals<sup>®</sup> e aparelho de leitor de microplacas ASYS HITECH GMBH<sup>®</sup> (Áustria).

## **2.10 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 (Statistical Package for the Social Sciences), versão 13.0.

## **3. Resultados**

O tratamento com o EGb, em todas as doses, por 56 dias consecutivos, não alterou significativamente as análises dos espermatozoides epididimários na contagem, vitalidade e morfologia (Tabela 1).

O peso médio dos testículos direito e esquerdo e o das estruturas testiculares como a túnica albugínea e o parênquima testicular e o índice gonadossomático (IGS), não apresentaram diferença estatística significativa entre o grupo controle e os tratados e entre os grupos tratados (Tabela 2).

A análise diferencial dos compartimentos testiculares tubulares e intertubulares, quanto à densidade volumétrica e volume ocupado no órgão, bem como o índice

tubulossomático (ITS) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Tabela 3).

Os diâmetros total e luminal, altura do epitélio seminífero, comprimento total do túbulo por testículo e comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo não apresentaram diferença significativa quando se compararam os grupos tratados com o controle e entre os grupos tratados (Tabela 4).

Não houve diferença estatística nas proporções volumétricas das células de Leydig, vasos sanguíneos, espaços linfáticos, tecido conjuntivo e macrófagos, no volume dos vasos sanguíneos, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos. Entretanto, houve diferença estatística no volume das células de Leydig em que os grupos EGb 3,5 e 7,0 apresentaram-se com médias estatisticamente inferiores aos grupos controle e 14,0 (Tabela 5; Figura 1).

As concentrações séricas de testosterona apresentaram grande variação (Figura 2). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 1 – Concentração, vitalidade e morfologia espermáticas de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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)
CE (10 <sup>6</sup> /mL)	232,20±59,60	224,06±53,38	263,31±84,49	234,93±61,81
VE (% vivos)	84,58±5,24	83,55±8,30	85,71±7,18	84,50±7,89
ME (% normais)	98,71±0,73	98,82±0,99	98,18±1,04	98,63±0,83

$p > 0,05$

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA em todas as avaliações;

CE – Concentração de espermatozoides (10<sup>6</sup>/mL); VE – Vitalidade espermática (% de espermatozoides vivos); ME – Morfologia espermática (% de espermatozoides normais).

Tabela 2 – Pesos médio dos testículos, da albugínea testicular direita e do parênquima testicular e índice gonadossomático de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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)
PT (g)	1,39±0,10	1,33±0,11	1,38±0,15	1,40±0,11
PA (mg)	42,85±3,50	40,15±4,11	42,75±4,38	41,35±4,45
PPT (g)	1,21±0,11	1,16±0,12	1,21±0,11	1,21±0,13
IGS	0,84±0,09	0,81±0,07	0,88±0,07	0,84±0,08

$p>0,05$

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA em todas as avaliações;

PT – peso médio dos testículos (g); PA – Peso da túnica albugínea testicular direita (mg); PPT – peso do parênquima testicular (g); IGS – Índice gonadossomático.

Tabela 3 – Densidade volumétrica e volume dos compartimentos testiculares e índice tubulossomático de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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=5)	EGb 3,5 (n=5)	EGb 7,0 (n=5)	EGb 14,0 (n=5)
DTT (%)	89,10±2,66	90,31±4,04	90,47±2,64	88,56±1,85
DTI (%)	10,90±2,66	9,69±4,04	9,53±2,64	11,44±1,85
VTT (mL)	1,07±0,03	1,04±0,05	1,08±0,03	1,07±0,02
VTI (mL)	0,13±0,03	0,11±0,05	0,11±0,03	0,14±0,02
ITS	0,32±0,01	0,32±0,00	0,33±0,01	0,32±0,01

$p>0,05$

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA em todas as avaliações;

DTT – Densidade volumétrica do compartimento testicular tubular; DTI – Densidade volumétrica do compartimento testicular intertubular; VTT – volume do compartimento testicular tubular (mL); VTI – volume do compartimento testicular intertubular (mL); ITS – Índice tubulossomático.

Tabela 4 – Dados histométricos dos túbulos seminíferos de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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=5)	EGb 3,5 (n=5)	EGb 7,0 (n=5)	EGb 14,0 (n=5)
DT (µm)	222,59±8,64	221,52±7,17	226,62±7,74	230,39±5,47
DL (µm)	122,62±5,31	122,10±3,69	125,90±4,01	124,92±3,04
AE (µm)	49,99±2,56	49,71±2,82	49,01±1,14	52,74±1,58
CT (m)	27,70±1,93	27,21±2,43	26,91±2,25	25,73±1,36
CG (m/g)	10,00±0,70	10,23±0,92	9,72±0,81	9,19±0,49

$p > 0,05$

Foi utilizado o teste estatístico ANOVA em todas as avaliações;

DT – Diâmetro total (µm); DL – Diâmetro luminal (µm); AE – Altura do epitélio (µm); CT – comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (m); CG – Comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo (m/g).

Tabela 5 – Densidade volumétrica e volume dos componentes do compartimento testicular intertubular de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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=5)	EGb 3,5 (n=5)	EGb 7,0 (n=5)	EGb 14,0 (n=5)
LEY (%)	44,30±3,91	49,52±7,44	50,08±2,69	45,32±3,53
VSA (%)	5,30±0,73	5,98±0,95	6,32±0,44	6,10±1,07
LIN (%)	20,18±1,60	17,48±1,72	19,38±4,79	20,24±4,13
TCO (%)*	29,18±0,70	23,38±9,89	23,72±4,70	24,82±6,68
MAC (%)	2,36±0,54	1,98±0,27	1,90±0,42	1,88±0,29
VLEY (μL)	61,00±6,78	46,00±6,93 <sup>a</sup>	46,40±1,82 <sup>b</sup>	64,40±6,88 <sup>c,d</sup>
VVSA (μL)	7,00±1,58	6,00±2,12	7,60±1,67	8,20±1,30
VLIN (μL)	24,80±6,06	16,60±3,72	22,40±9,76	28,60±9,74
VTCO (μL)	33,80±6,69	25,60±11,52	26,20±6,54	34,60±10,67
VMAC (μL)*	2,60±0,55	2,40±1,14	2,00±0,00	2,4±0,55

\*Foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis nos dados de densidade volumétrica do tecido conjuntivo e volume de macrófagos.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$ . O Grupo Controle difere do EGb 3,5 pelo teste *post hoc* de Tukey;

<sup>b</sup>  $p < 0,05$ . O Grupo Controle difere do EGb 7,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

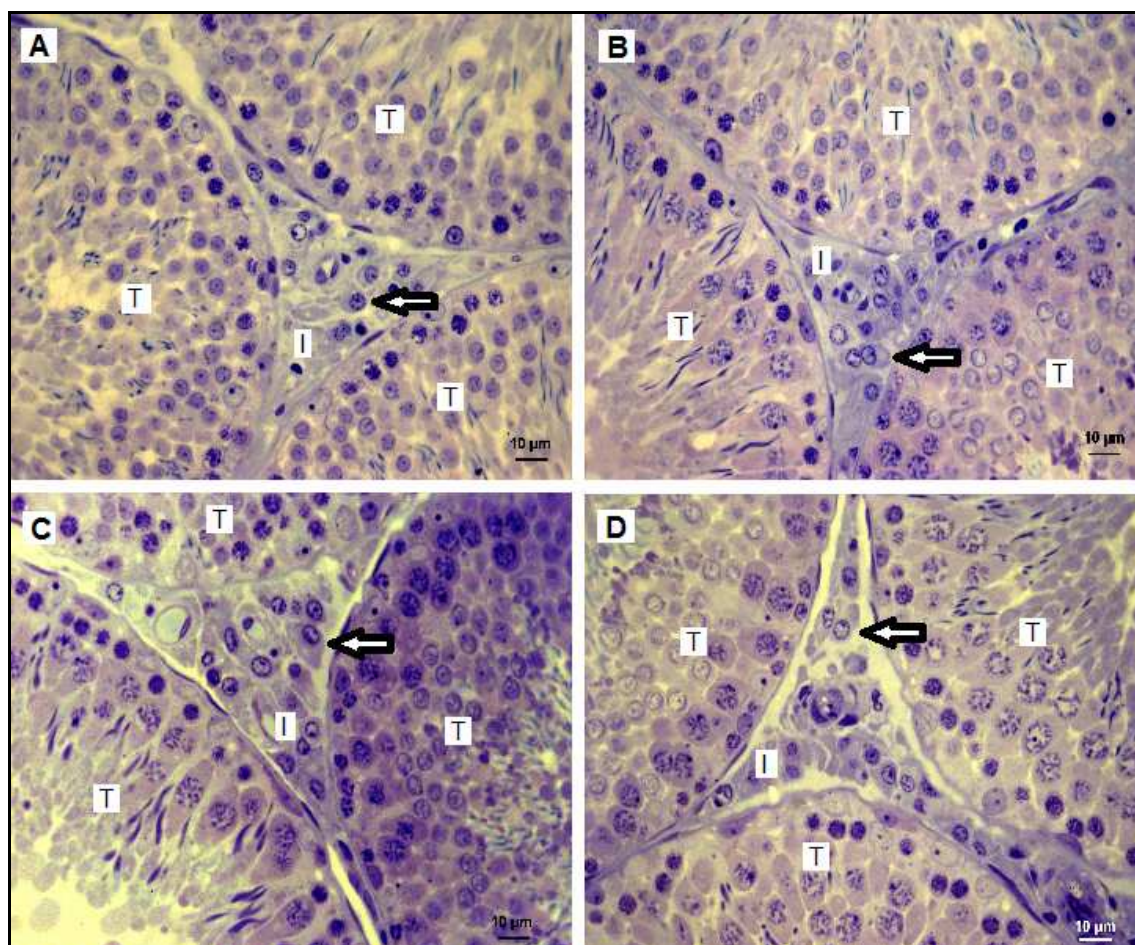
<sup>c</sup>  $p < 0,05$ . O Grupo EGb 3,5 difere do EGb 14,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

<sup>d</sup>  $p < 0,05$ . O Grupo EGb 7,0 difere do EGb 14,0 pelo teste *post hoc* de Tukey;

LEY – Densidade volumétrica das células de Leydig; VSA – Densidade volumétrica dos vasos sanguíneos; LIN – Densidade volumétrica do espaço linfático; TCO – Densidade volumétrica do tecido conjuntivo; MAC – Densidade volumétrica dos macrófagos; VLEY – volume de células de Leydig (mL); VVSA – volume dos vasos sanguíneos (mL); VLIN – volume do espaço linfático (mL); VTCO – volume do tecido conjuntivo (mL); VMAC – volume de macrófagos (mL).

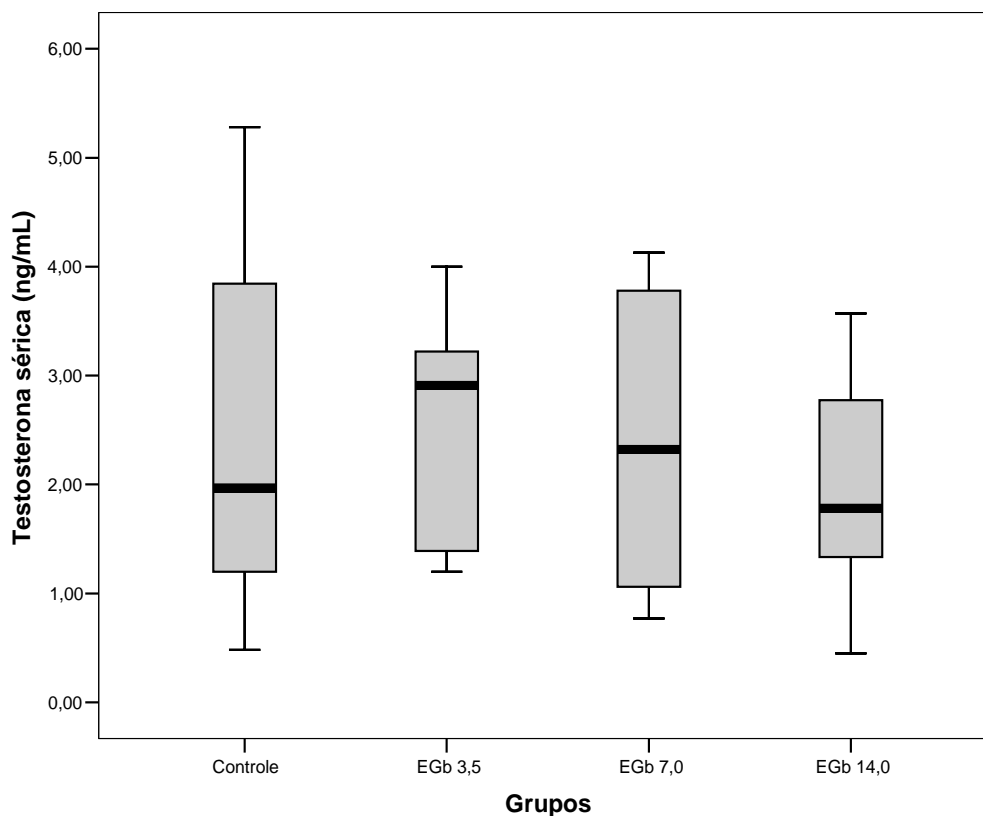


Figura 2 – Fotomicrografias de testículos de ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 3,5 (EGb 3,5); 7,0 (EGb 7,0) e 14,0 mg/kg (EGb 14,0) por 56 dias consecutivos. Coloração de azul de toluidina – borato de sódio a 1%. Espessura de 3  $\mu\text{m}$ . A – Grupo controle; B – EGb 3,5; C – EGb 7,0 e D – EGb 14,0.



T – Compartimento testicular tubular; I – Compartimento testicular intertubular. Setas indicam as Células de Leydig.

Figura 2 – Concentração de testosterona total sérica (ng/mL) pelo método ELISA em ratos Wistar tratados por via intragástrica com água destilada (Controle) e extrato de *Ginkgo biloba* 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. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA.  $p > 0,05$ .



#### 4. Discussão

Substâncias com efeito estrogênico podem causar danos no sistema reprodutor masculino (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004; SAFE, 2004) atuando diretamente na atividade dos hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, ou nas estruturas testiculares. Shimomura et al. (2005) verificaram que estrógenos sintéticos como o etinilestradiol, usados como contraceptivos femininos e para terapia contra a hipertrofia e câncer de próstata, podem se ligar aos receptores estrogênicos na hipófise e hipotálamo e diminuir a secreção dos hormônios liberador de gonadotrofinas (GnRH), folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) e, conseqüentemente, os níveis de testosterona. A redução do volume ocupado pelas células de Leydig nos grupos tratados com o extrato de *Ginkgo biloba*, EGb 3,5 e EGb 7,0 poderia sugerir algum déficit funcional dessas células, resultando em queda da concentração sérica de

testosterona, o que não foi observado, sugerindo que o extrato não exerceu efeito sobre a capacidade funcional dessas células.

São crescentes os indícios de que os fitoestrógenos atuem como moduladores de receptores estrogênicos (PATISAUL; ADEWALE, 2009). Assinder et al. (2007) verificaram que uma dieta rica em genisteína, gliciteína e daidzeína, flavonóides com atividade estrogênica, aumentou a taxa de apoptose de células germinativas testiculares e foi capaz de alterar o processo espermatogênico em ratos.

Das et al. (2004) verificaram que o extrato metanólico da planta *Vitex negundo*, rica em flavonóides, atuou negativamente na qualidade espermática de ratos, diminuindo a contagem e a motilidade. Estudos com o extrato de *Ginkgo biloba* demonstraram a diminuição da capacidade de penetração dos espermatozoides na zona pelúcida de ovócitos de hamster (ONDRIZEK et al., 1999a) e de inibição de motilidade de espermatozoides humanos (ONDRIZEK et al., 1999b). Contudo, alterações quanto à concentração, vitalidade, e normalidade morfológica dos gametas não foram notadas e tais achados sugerem que o extrato não exerceu efeito direto sobre a produção e a maturação dos espermatozoides.

Segundo Sharpe (1998), existem receptores estrogênicos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) e  $\beta$  (ER- $\beta$ ) no sistema reprodutor masculino e Oh e Chung (2004) verificaram afinidade dos principais componentes flavonólicos isolados do EGb (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) para os receptores estrogênicos recombinantes humanos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) e principalmente, aos  $\beta$  (ER- $\beta$ ) *in vitro*. Assim, seria de esperar que houvesse uma “sobrecarga” estrogênica pela união dos componentes do EGb a seus receptores e que isto resultasse em alteração da espermatogênese como já demonstrado para outros disruptores como os Ftalatos (HU et al., 2009; SAILLENFAIT; SABATÉ; GALLISSOT, 2009; MARTINO-ANDRADE; CHAOUUD, 2010), parabenos (HOBERMAN et al., 2008; TAVARES et al., 2009), pesticidas organoclorados (BRETVELD et al., 2007; UZUN et al., 2009; VICTOR-COSTA, et al., 2010) e bisfenóis (SAKAUE et al., 2001). Entretanto, os dados observados nos testículos de ratos tratados com EGb não mostraram diferença estatística no peso médio gonadal, diâmetros total e luminal e altura do epitélio dos túbulos seminíferos comparados ao grupo controle e entre os grupos tratados com o extrato de *Ginkgo biloba*. A medida do peso testicular possui uma forte correlação com o número de células germinativas presentes na gônada (RUSSELL et al., 1990) e, segundo França; Russell (1998) existe correlação positiva também entre a atividade espermatogênica e

diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio. Portanto, supõe-se que o EGb não ocasionou modificação na morfologia dos túbulos seminíferos e tecido intertubular. O presente estudo não apresentou dados que fossem de acordo com o de Al-Yahya et al. (2006) que encontraram efeitos negativos do EGb sobre o sistema reprodutor masculino.

Conclui-se, portanto, que no presente trabalho, ratos Wistar adultos, expostos ao EGb não apresentaram alteração da morfometria testicular, concentração de testosterona total sérica e nem da contagem, vitalidade e morfologia dos espermatozoides.

## 5. Referências

AL-YAHYA, A. A. et al. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107 p.222–228, 2006.

ASSINDER, S. et al. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. **Reproduction**, v.133, p. 11–19, 2007.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénese chez le taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v.3, n.3, p. 219-241, 1963.

BLUMENTHAL, M.; BRINCKMANN, J.; WOLLSCHLAEGER, B. *Ginkgo biloba*. In: **The ABC Clinical Guide to Herbs**. New York: Thieme, 2003. p.185-200.

BRETVELD, R. et al. Influence of pesticides on male fertility. **Scandinavian Journal of Work Environment and Health**, v.33, n.1, p.13–28, 2007.

CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. **Advances in Medical Sciences**, v.57, Epud. 2012.

CARREAU, S. et al. Estrogens and male reproduction: a new concept. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.761-768, 2007.

DAS, S. et al. Reproduction in male rats is vulnerable to treatment with the flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.8–13, 2004.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. **Male reproduction – a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications, 1998. pp. 198-219.

HAUSER, R.; SOKOL, R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. **Fertility and Sterility**, v.89, supplement 1, e59-65, 2008.

HOBERTMAN, A. M. et al. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 83, p.123–133, 2008.

HU, G. –X. et al. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.20, n.3, p.139–145, 2009.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v.25, p.217–226, 1981.

KANG, B. -J. et al. A placebo-controlled, double-blind trial of *Ginkgo biloba* for antidepressant-induced sexual dysfunction. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v.17, p.279–284, 2002.

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 Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v.68, n.1, p.3-8, 2011.

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.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.54, p.148-157, 2010.

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.

O'DONNELL, L. et al. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: NEILL, J. D. et al. (eds). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. San Diego, CA: Elsevier, 2006. 3230p.

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.

ONDRIZEK, R. R. et al. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. **Fertility and Sterility**, v.71, p.517–522, 1999a.

ONDRIZEK, R. R. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.16, p.87–91, 1999b.

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

PANUNTO, W. et al. Acute and chronic toxicity studies of the water extract from dried fruits of *Terminalia chebula* Rezt. in rats. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.3, n.4, p.36-43, 2010.

PATISAUL, H. B.; ADEWALE, H. B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.3, p.1-18, 2009.

PERREAULT, S. D.; CANCEL, A. M. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. **Reproduction**, v.121, p.207-216, 2001.

PFLIEGER-BRUSS, S.; SCHUPPE, H. -C.; SCHILL, W. -B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia**, v.36, p.337–345, 2004.

RUSSELL, L. D. et al. **Histopathology of the testis**. 1st ed. Cache River Press, Clearwater, 1990.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, v.205, p.3-10, 2004.

SAILLENFAIT, A. M.; SABATÉ, J. P.; GALLISSOT, F. Effects of *in utero* exposure to di-*n*-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. **Reproductive Toxicology**, v.28, p.468–476, 2009.

SAKAUE, M. et al. Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. **Journal of Occupational Health**, v.43, p.185-190, 2001.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v.10, n.3, p.237-244, 1996.

SHARPE, R. M. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.365, p.1697-1712, 2010.

SHARPE, R. M. The roles of oestrogen in the male. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.9, n.9, p.371-377, 1998.

SHIMOMURA, K. et al. Insight into testicular damage induced by ethinylestradiol in rats. **Reproductive Toxicology**, v.20, p.157-163, 2005.

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 terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. **Angewandte Chemie International Edition**, v.43, n.13, p.1640–1658, 2004.

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.

TAVARES, R. S. et al. Parabens in male infertility – Is there a mitochondrial connection? **Reproductive Toxicology**, v.27, p.1–7, 2009.

UZUN, F. G. et al. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1903–1908, 2009.

VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography A**, v.967, n.1, p.21–55, 2002.

VICTOR-COSTA, A. B. et al. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to atrazine. **Reproductive Toxicology**, v.29, p.323–331, 2010.

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

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5. ed. Geneva: WHO Press, 2010. 287p.

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

WOODRUFF, T. J. et al. Proceedings of the summit on environmental challenges to reproductive health and fertility: executive summary. **Fertility and Sterility**, v.89, n.2, p.281–300, 2008.

YEH, K. –Y. et al. *Ginkgo biloba* extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats. **Hormones and Behavior**, v.53, p.225–231, 2008.

YEH, K. –Y. et al. *Ginkgo biloba* extract enhances noncontact erection in rats: the role of dopamine in the paraventricular nucleus and mesolimbic system. **Neuroscience**, v.189, p.199–206, 2011.

YEH, K. –Y. et al. *Ginkgo biloba* extract treatment increases noncontact erections and central dopamine levels in rats: role of the bed nucleus of the stria terminalis and the medial preoptic area. **Psychopharmacology**, v.210, n.4, p.585–590, 2010.

YEH, K. -Y.; WU, C. -H.; TSAI, Y. -F. *Ginkgo biloba* treatment increases copulation but not nNOS activity in the medial preoptic area in male rats. **Neurosciences Letters**, v.500, p.182-186, 2011.



## 8. Conclusão

Conclui-se que o extrato de *Ginkgo biloba*, no presente trabalho, não promoveu alteração sobre os órgãos do sistema reprodutor masculino e nem promoveu toxicidade sistêmica, negando, portanto a hipótese nula.

## 9. Anexos

9.1 Certificado de aprovação do projeto “Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar” na Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão de Ética na Experimentação Animal

**CERTIFICADO -**

Certificamos que o Protocolo nº 016/2010 – CEEA sobre “Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Vera Maria Peters, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/04/2010.

**C E R T I F I C A T E**

We certify that the protocol nº 016/2010 - CEEA about “Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar” – Vera Maria Peters - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 06/04/2010.

Juiz de Fora, 06 de Abril de 2010

  
Presidente/CEEA

  
p/ Secretário/CEEA