

RAFAEL MORAES PINTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ESTROGÊNICO DO *GINKGO BILOBA* EM
RATAS WISTAR IMPÚBERES**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Martha de Oliveira Guerra

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Vera Maria Peters

Juiz de Fora
2009

Pinto, Rafael Moraes.

Avaliação do efeito estrogênico do Ginkgo biloba em ratas
Wistar impúberes / Rafael Moraes Pinto. – 2009.
110 f. : il.

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

1. Estrogênios. 2. Ginkgo biloba. I. Título.

CDU 615.256.4

RAFAEL MORAES PINTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ESTROGÊNICO DO *GINKGO BILOBA* EM
RATAS WISTAR IMPÚBERES**

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

Aprovado em: 10 de agosto de 2009

Banca examinadora:

Dra. Martha de Oliveira Guerra (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Luis Henrique Barbosa Boechat

Abbott Laboratórios do Brasil

Dr. João Evangelista de Paula Reis

Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, responsáveis por tudo o que sou, que sempre me incentivaram
e sempre pareciam segurar minhas mãos guiando meus caminhos para
alcançar meus sonhos,

Aos irmãos Marcelo e Teresa, amigos fiéis nessa longa caminhada, pela
contribuição em todos os momentos, por me darem forças para continuar
lutando,

À Martha e Vera, pelo acolhimento, ajuda, amizade e acima de tudo pelo
exemplo de profissionalismo e perseverança,

À Laura, companheira de todos os momentos, pela paciência, carinho e pelo
amor incondicional, por compreender a importância dessa conquista e apoiar-
me sempre, mesmo quando minha ausência era necessária.

AGRADECIMENTOS

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

Ao amigo Eduardo, que foi fundamental para que este trabalho fosse concretizado. Pela parceria intelectual e pelo auxílio em todas as tarefas. Por ter ajudado a dividir as angústias como também por ter compartilhado os sonhos. Por toda ajuda e, principalmente, pela grande amizade construída.

Aos amigos Paulo Sérgio, Evelise, Nathália, Roberto, Lúcia, Pedro e Graça, não só pelo auxílio prático, mas também pelas boas horas de convívio diário no CBR.

À Marcela, pelo processamento histológico do material do projeto, realizando um trabalho primoroso.

À JRPharma, na pessoa do Prof. Dr. João Evangelista, por gentilmente ter cedido o extrato utilizado neste trabalho.

Ao Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, por propiciar a estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários do CBR pelo auxílio técnico e organizacional prestado no desenvolvimento deste trabalho.

À REDE Mineira de Bioterismo e à REDE Mineira de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Terapêuticos - FAPEMIG, que permitiram a realização do trabalho através do financiamento concedido.

Aos amigos de Juiz de Fora, Diogo, Daniel, André, Diego e Fábio, que acompanharam e incentivaram a todo o momento.

Aos familiares e amigos de Itajubá que, mesmo de longe, sempre torceram e me apoiaram.

Ao Carlos, Aparecida e Talita pela amizade, ajuda e por terem me acolhido tão bem em todos os momentos.

RESUMO

O uso de terapia hormonal na menopausa não está isento de riscos sendo relatados eventos adversos como embolia pulmonar e câncer após seu uso. Nestes casos, os fitoestrogênios, compostos estrogênicos presentes nas plantas, podem ser utilizados como alternativa ao tratamento hormonal, já existindo comprovação da eficácia e segurança em seu uso. O extrato de *Ginkgo biloba*, um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo, utilizado para o tratamento de distúrbios circulatórios e neurológicos, produziu efeito estrogênico *in vitro* em células tumorais MCF7 e promoveu alteração do epitélio vaginal de camundongos, aventando a possibilidade do seu uso como um fitoestrogênio. Porém, ainda não existem estudos conclusivos *in vivo* indicando o efeito estrogênico do extrato, sendo este o objetivo do presente trabalho. Neste experimento, foram utilizadas 70 ratas Wistar, pré-púberes, com 22 dias de idade. As ratas foram pesadas e distribuídas aleatoriamente em sete grupos com 10 animais em cada. O grupo controle negativo recebeu 0,4mL de água destilada via intragástrica. O grupo controle positivo recebeu 1µg/Kg de 17α-estradiol em 0,3mL de óleo mineral, via subcutânea. Os grupos tratados receberam extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 4, 40, 100, 500 e 1000mg/Kg/dia, administrado em 0,4mL de solução aquosa via intragástrica. A administração das soluções ocorreu uma vez ao dia por três dias. Após 24 horas do último dia de tratamento foi analisada a presença de abertura vaginal e os animais foram eutanasiados para remoção do trato reprodutor. O útero foi separado da vagina e dos ovários e então pesado. Análise histomorfométrica dos cornos uterinos e vagina (espessura da mucosa vaginal e do epitélio superficial uterino) foi realizada. A análise estatística dos dados obtidos foi feita pelo teste ANOVA seguido de teste *post-hoc* de Tukey ou Dunnett T3 com nível de significância de $\alpha = 0,05$. O tratamento com *Ginkgo biloba* não alterou o peso corporal nem o peso uterino. A espessura da mucosa vaginal foi menor nos animais que receberam 1000mg/Kg do extrato. Nos animais tratados com 4, 40, 100 e 500mg/Kg de *G. biloba* observou-se aumento da espessura do epitélio superficial uterino. Podemos concluir que o extrato de *Ginkgo biloba* estudado apresentou indícios de efeito estrogênico quando administrado a ratas Wistar nas doses de 4, 40, 100 e 500mg/Kg e efeito antiestrogênico na dose de 1000mg/Kg. Palavras-chave: Estrogênios. *Ginkgo biloba*. Moduladores Seletivos do Receptor Estrogênico.

ABSTRACT

The use of hormonal therapy in menopause is not absent of risks being related to adverse effects such as pulmonary embolism and cancer due to its use. In these cases, phytoestrogens, the estrogenic compounds present in plants, can be used as an alternative to the hormonal treatment. There is already proof of efficacy and safety in their use. *Ginkgo biloba* extract, one of the most consumed phytotherapies in the world, used to the treatment of circulatory and neurologic disturbs, produced estrogenic effect *in vitro* in MCF7 tumoral cells and promoted alteration in the vaginal epithelium of mice, suggesting a possibility of being used as a phytoestrogen. However, there are not conclusive studies *in vivo* indicating the estrogenic effect of any *Ginkgo biloba* extract, being this the objective of this work. In this experiment seventy 22 day-old impuberal Wistar rats were used. The rats were weighed and randomly distributed into seven groups with ten animals each. The negative control group received 0.4mL of distilled water, by gavage. The positive control group received 1 µg/Kg of 17α-estradiol in 0.3mL of mineral oil, by subcutaneous injection. The treated groups received *Ginkgo biloba* extract in doses of 4, 40, 100, 500 and 1000mg/Kg/day, administered in 0.4mL of aqueous solution, by gavage. The administration of the solutions occurred once a day during three days. After 24 hours from the last day of treatment the presence of vaginal opening was analyzed and the animals were euthanized to remove the reproductive tract. The uterus was separated from the vagina and from the ovaries and then weighted. The uterine horns and the vagina were fixed to histomorphometric analysis and vaginal mucosa and uterine superficial epithelium thickness were measured. Statistical comparisons were made, using ANOVA, followed by *post hoc* Tukey or Dunnett T3. The level of significance of tests was $\alpha = 0.05$. The *Ginkgo biloba* treatment did not alter the body weight neither the uterine weight. The vaginal mucosa thickness was thinner in the animals that received 1000mg/Kg of the extract. In the animals treated with 4, 40, 100 and 500mg/Kg of *Ginkgo biloba* it was observed that the uterine superficial epithelium was thicker. We conclude that the *Ginkgo biloba* extract studied showed indications of an estrogenic effect when administered to Wistar rats with doses of 4, 40, 100 and 500mg/Kg and an anti-estrogenic effect with a dose of 1000mg/Kg.

Keywords: Estrogens. *Ginkgo biloba*. Selective Estrogen Receptor Modulators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Esquema 1 Esquematização da estrutura dos receptores de estrogênio (RE) α e β representando os domínios estruturais A/B, C, D, E, F. Na figura também estão representados os domínios funcionais DLD (domínio de ligação ao DNA) e DLH (domínio de ligação ao hormônio).....17
- Esquema 2 Esquematização da interação do estrogênio com o receptor e o DNA celular para a produção protéica.....18
- Esquema 3 Semelhança estrutural molecular entre o estradiol e os fitoestrogênios quercetina e genisteína.....26
- Quadro 1 Distribuição e predominância dos receptores α e β no organismo.....19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 ESTROGÊNIO	13
2.1.1 Ação no metabolismo ósseo	14
2.1.2 Ação no sistema cardiovascular	15
2.1.3 Ação no sistema nervoso central	16
2.1.4 Receptores de estrogênio – α e β	16
2.1.4.1 Distribuição dos receptores de estrogênio	19
2.2 MENOPAUSA	21
2.2.1 Terapia Hormonal da Menopausa	23
2.3 FITOESTROGÊNIOS	26
2.4 GINKGO BILOBA	30
2.4.1 Utilização clínica	30
2.4.2 Composição química	33
2.4.3 Propriedades estrogênicas do <i>Ginkgo biloba</i>	34
3 HIPÓTESE	37
4 OBJETIVO	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 MODELO ANIMAL	39
5.2 SUBSTÂNCIA TESTE	40
5.3 DOSES DA SUBSTÂNCIA TESTE	40
5.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	40
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6 RESULTADOS	43

6.1 ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	43
7 COMENTÁRIOS	45
8 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE.....	59

1 INTRODUÇÃO

Durante o período da menopausa, ocorrem profundas transformações hormonais decorrentes da queda gradual da produção do estrogênio nas mulheres (FERNANDES *et al.*, 2004). Essa mudança endócrina provoca sinais e sintomas indesejáveis como fogachos, atrofia urogenital, alteração do humor e diminuição da libido, pois ocorre a perda natural da ação exercida pelo estrogênio, sendo necessária, muitas vezes, a instituição de terapia hormonal para o tratamento destes sintomas (ABERNETHY, 2003). Porém, o uso de estrogênio para amenizar os sintomas na menopausa não está isento de riscos, sendo relatadas algumas contra-indicações e até mesmo efeitos adversos graves como embolia pulmonar e desenvolvimento de câncer estrogênio-dependente (BLAKE, 2006).

A descoberta do receptor β de estrogênio (KUIPER *et al.*, 1996) revitalizou a pesquisa do mecanismo de ação do estrogênio e proporcionou novas esperanças para o campo farmacêutico na busca do desenvolvimento de novos compostos estrogênicos que possam agir em tecidos alvo específicos. A ligação específica a receptores e tecidos poderia proporcionar os benefícios da terapia evitando efeitos adversos e colaterais indesejáveis causados pelo estrogênio, sendo utilizados, portanto, para prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa, osteoporose, doença cardiovascular ou câncer de mama (OSBORNE *et al.*, 2000).

Há, portanto, interesse considerável no desenvolvimento de medicamentos seletivos que aliviem os sintomas da menopausa e que sejam seguros no sentido de não provocar proliferação celular na mama ou no endométrio.

Os fitoestrogênios possuem afinidades diferentes entre os dois tipos de

receptores de estrogênio tendo uma maior afinidade pelos receptores β de estrogênio do que os receptores α , podendo agir seletivamente (KUIPER *et al.*, 1998). Alguns fitoestrogênios, dentre eles os obtidos da soja, já se mostraram como alternativa válida para o tratamento dos sintomas da menopausa mostrando eficácia e segurança com seu uso (HAN, K. K. *et al.*, 2002).

O extrato de *Ginkgo biloba*, um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo, que possui comprovada eficácia em doenças circulatórias e cerebrais (SIERPINA *et al.*, 2003), surge neste contexto como uma alternativa para o tratamento dos sintomas da menopausa. Já foram relatados efeito estrogênico *in vitro* (OH; CHUNG, 2004) e ação no epitélio vaginal de camundongos com esse extrato (LEE *et al.*, 2000). Porém, ainda não existem estudos conclusivos indicando o efeito estrogênico *in vivo* do *Ginkgo biloba*, sendo este o objetivo do presente trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrogênio

O estrogênio é um hormônio esteróide cuja produção pode ocorrer no tecido adiposo, no músculo esquelético, na pele, nos folículos capilares e no tecido ósseo, mas ocorre, principalmente, nas células da granulosa do ovócito maduro (PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), um hormônio polipeptídico produzido no hipotálamo, atua sobre a hipófise e causa a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que, por fim atuarão nos ovários para a produção de estrogênio. Neste local, o FSH promove a maturação do folículo ovariano que passa a produzir e secretar estrogênio na corrente sanguínea (BRITT; FINDLAY, 2002; FRIEDLANDER, 2002; ABERNETHY, 2003) através da aromatização dos androgênios provenientes das células da teca interna, realizada pela enzima aromatase (PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001).

Apesar do estrogênio não ser essencial para a sobrevivência após o nascimento, ou para a formação do trato reprodutivo, é fundamental para a fertilidade normal em ambos os sexos (BRITT; FINDLAY, 2002) promovendo a proliferação endometrial, favorecendo a secreção do muco cervical e aumentando as contrações tubárias no sexo feminino (BRITT; FINDLAY, 2002; ABERNETHY, 2003). Além disso, o estrogênio promove o desenvolvimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários na mulher, causa mudanças durante a gestação (proliferação

celular uterina, crescimento vascular, relaxamento dos ligamentos uterinos durante o parto), influencia a pele, os ossos, sistema cardiovascular e imune (PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001; CLAPAUCH *et al.*, 2002), além de provocar o crescimento do epitélio vaginal visto através da formação de células queratinizadas com núcleo picnótico (FERNANDES *et al.*, 2004).

Os estrogênios endógenos têm, em geral, meia-vida curta, não se acumulam nos tecidos, são facilmente metabolizados no fígado e são mais potentes que qualquer estrogênio sintético. Estes, por sua vez, possuem característica lipofílica e tendem a se acumular na gordura e tecidos (CLAPAUCH *et al.*, 2002).

2.1.1 Ação no metabolismo ósseo

Durante a adolescência, o estrogênio está envolvido com a formação óssea. Ele inicia o crescimento puberal e mais tarde limita o crescimento longitudinal ósseo induzindo o fechamento da placa de crescimento epifisária (NILSSON *et al.*, 2001). Nos adultos, o estrogênio influencia a remodelação óssea através da estimulação da formação óssea pelo osteoblasto e inibição da reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos. Na estimulação dos osteoblastos, o estrogênio promove a síntese e secreção do fator de crescimento IGF-I, inibindo, nestas mesmas células, a produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF envolvidas na reabsorção óssea. O estrogênio promove ainda aumento da produção de TGF- β e da osteoprotegerina, potentes inibidores da função osteoclástica (NILSSON *et al.*, 2001; CARLSTEN, 2005; WEITZMANN; PACIFICI, 2006).

O estrogênio pode também aumentar a absorção do cálcio e diminuir a sua excreção. O efeito poderia ser realizado indiretamente pela modulação do

paratormônio, pelo aumento de produção de calcitonina ou pelo aumento da síntese e atividade da vitamina D (FERNANDES *et al.*, 2004). Desta forma, os estrogênios diminuem a remodelação óssea, preservando a massa óssea e a qualidade da microarquitetura do tecido (NILSSON *et al.*, 2001; CARLSTEN, 2005; WEITZMANN; PACIFICI, 2006).

2.1.2 Ação no sistema cardiovascular

O estrogênio endógeno atua sobre o sistema cardiovascular, em especial, sobre a função do endotélio. O hormônio promove vasodilatação através da elevação da síntese de óxido nítrico e, ainda, inibição da vasoconstrição induzida pela endotelina e pela atividade simpática. Atua também como antiproliferativo no músculo liso vascular (MATURANA *et al.*, 2007).

Na proteção contra a aterosclerose age através da redução da formação das células espumosas nos vasos, diminuindo a captura do LDL-colesterol oxidado pelos macrófagos e aumentando a produção de apolipoproteína A pelo fígado, principal constituinte protéico do HDL-colesterol (FERNANDES *et al.*, 2004; MATURANA *et al.*, 2007).

O tromboembolismo relatado quando do uso de terapia hormonal na pós-menopausa parece ser um fenômeno idiossincrásico desencadeado pelos esteróides, pois, em geral, o estrogênio atua ainda na redução do fibrinogênio plasmático, do fator VII e do fator inibidor da ativação do plasminogênio, o que reduziria o risco de coagulação sanguínea (FERNANDES *et al.*, 2004).

2.1.3 Ação no sistema nervoso central

Estudos comprovam que o estrogênio influencia uma série de funções do sistema nervoso central como o aprendizado, a memória, a consciência, a habilidade motora fina, a regulação da temperatura corpórea, o humor e as funções reprodutivas (NILSSON; GUSTAFSSON, 2000; MCEWEN, 2001; MCEWEN, 2002).

O declínio na produção de estrogênio leva a uma queda na concentração de endorfina no hipotálamo e conseqüente aumento da liberação de noradrenalina e serotonina no núcleo termorregulatório promovendo alterações na perda de calor pelo organismo (NELSON *et al.*, 2006).

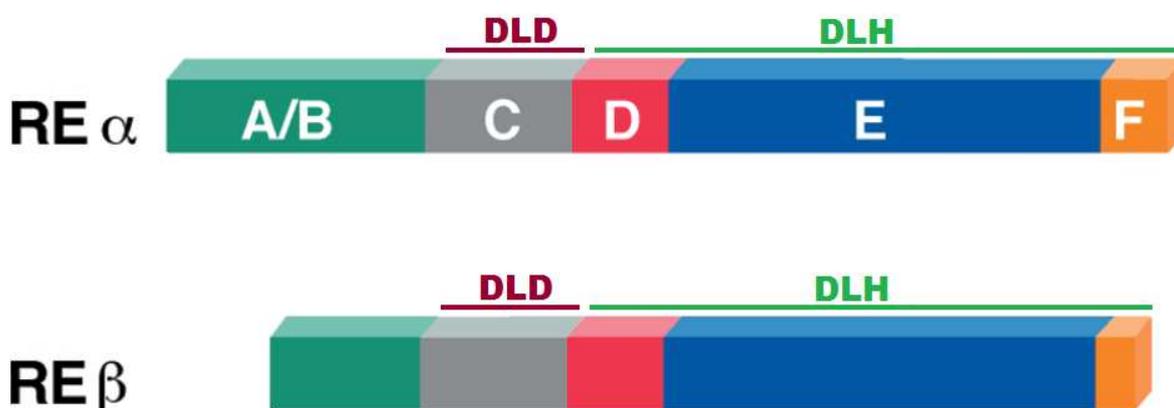
Todas as ações descritas provocadas pelo estrogênio são mediadas primariamente por um processo que envolve a ligação do hormônio a receptores de estrogênio específicos em células alvo, promovendo a ativação da transcrição de genes responsivos aos esteróides e, subseqüentemente, a modificações na resposta celular. A resposta celular varia de acordo com a função exercida pela célula e com o tipo de receptor ao qual o estrogênio se ligou (WANG *et al.*, 2000).

2.1.4 Receptores de estrogênio – α e β

Em 1986, Greene e cols. isolaram e clonaram o receptor de estrogênio (GREENE *et al.*, 1986). Em 1996, Kuiper e cols. descobriram um segundo receptor de estrogênio, clonado em humanos, sendo denominado receptor β (KUIPER *et al.*, 1996).

Ambos os receptores de estrogênio, α e β , pertencem à superfamília de

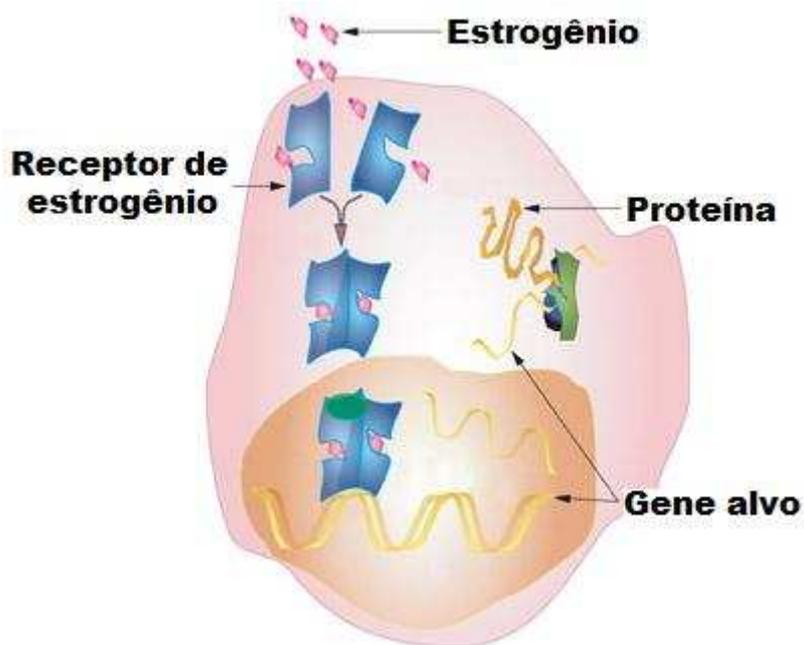
receptores nucleares esteróides/tireóideos, que possuem uma arquitetura estrutural em comum. Eles são compostos por três domínios funcionais independentes, mas que interagem entre si para realizar sua função (figura 1). Os domínios são formados pelo domínio amino-terminal ou domínio A/B, o domínio de ligação ao DNA ou domínio C e o domínio de ligação ao hormônio ou domínio D/E/F (HALL; MCDONNELL, 1999; NILSSON *et al.*, 2001; PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001). O domínio N-terminal (domínio A/B) dos dois receptores possui apenas 20% de homologia. Por outro lado, a área que se liga ao DNA (domínio C) é similar entre os dois receptores diferindo apenas em três aminoácidos. O domínio de ligação ao substrato (domínio D/E/F) possui aproximadamente 53% de homologia entre eles (GUSTAFSSON, 2000; OSBORNE *et al.*, 2000).



Esquema 1. Esquemática da estrutura dos receptores de estrogênio (RE) α e β representando os domínios estruturais A/B, C, D, E, F. Na figura também estão representados os domínios funcionais DLD (domínio de ligação ao DNA) e DLH (domínio de ligação ao hormônio); Fonte: Adaptado de OSBORNE, 2000.

A conformação do receptor de estrogênio é determinada pela natureza do ligante que pode promover variação na função exercida por ele (CLAPAUCH *et al.*, 2002). Com a ligação do composto estrogênico ao receptor (figura 2), ocorrem

mudanças conformacionais no mesmo, promovendo, no núcleo celular, uma interação cujo resultado dependerá do tipo de receptor (α ou β) e do tipo de composto estrogênico ligado, determinando a ação biológica celular (HALL; MCDONNELL, 1999; NILSSON *et al.*, 2001; PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001).



Esquema 2. Esquemática da interação do estrogênio com o receptor e o DNA celular para a produção proteica. Fonte: Adaptado de <https://www.llnl.gov/str/December05/gifs/Kulp1.jpg> <acesso em 01 de agosto de 2009>.

Alguns órgãos podem expressar os dois tipos de receptores de estrogênio e, no mesmo órgão, geralmente estão em células diferentes. Porém, em alguns casos, podem também ser expressos em uma mesma célula nas formas de heterodímeros. A diferença de distribuição dos receptores variará de acordo com as funções biológicas executadas pelas diferentes células e tecidos do organismo (GUSTAFSSON, 2000).

2.1.4.1 Distribuição dos receptores de estrogênio

Já foram encontrados os dois tipos de receptores de estrogênio em determinados órgãos do corpo humano e, em alguns deles, existe uma maior predominância da expressão de um tipo de receptor em relação ao outro (quadro 1).

	Localidade	Predominância do tipo de receptor
Órgãos do sistema reprodutor	ovário mama útero vagina testículo epidídimo próstata	α α α
Órgãos dos diversos sistemas	osso endotélio rins trato urinário pulmão sistema nervoso central	β β

Quadro 1. Distribuição e predominância dos receptores α e β no organismo.

Já foi descrita a presença de ambos os tipos de receptores de estrogênio no tecido mamário, no trato urogenital, no tecido ósseo, nas células endoteliais, (COUSE *et al.*, 1997; NILSSON; GUSTAFSSON, 2000; NILSSON *et al.*, 2001), rins, pulmão (KUIPER *et al.*, 1997) e no sistema nervoso central com predominância no hipotálamo e na hipófise (COUSE *et al.*, 1997; NILSSON; GUSTAFSSON, 2000; NILSSON *et al.*, 2001). Estudos mostram também que os dois tipos de receptores de estrogênio estão presentes na vagina (WANG *et al.*, 2000), ovário (PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001) e útero bem como no testículo, epidídimo e próstata (COUSE

et al., 1997; KUIPER *et al.*, 1997).

Os α -receptores são os principais receptores encontrados na mama (KUIPER *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000; CLAPAUCH *et al.*, 2002) e no útero (GUSTAFSSON, 2000; CLAPAUCH *et al.*, 2002). No ovário, o receptor não é encontrado nas células da granulosa, mas está presente nas células da teca e epitélio germinativo. No estroma uterino está presente tanto nas células epiteliais glandulares quanto nas células do lúmen do órgão (PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001). Grande parte da estimulação uterina, do crescimento mamário, do controle da ovulação, da manutenção da densidade mineral óssea e do feedback negativo no hipotálamo e na hipófise é mediada por esse receptor (HARRIS, 2007).

Já os β -receptores exibem maior concentração do que os α -receptores no osso e no sistema cardiovascular (NILSSON *et al.*, 2001; CLAPAUCH *et al.*, 2002). No ovário, o receptor está presentes nas células da granulosa de folículos primários, secundários e maduros, variando de acordo com a mudança hormonal e no estroma uterino é encontrado nas células epiteliais glandulares (PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001). No tecido ósseo, além do conhecido efeito do estrogênio sobre os osteoclastos (CARLSTEN, 2005) também foram encontrados receptores β de estrogênio nos osteoblastos (TOESCA *et al.*, 2000; NILSSON *et al.*, 2001).

A diferença de distribuição e de afinidade a compostos entre os diferentes tipos de receptores contribui para a seletividade de ação em alguns tecidos, variando de acordo com o local no organismo (KUIPER *et al.*, 1997). Com o conhecimento dos diversos órgãos que expressam tais receptores, pode-se prever qual ação benéfica será resultante da ação do estrogênio (GUSTAFSSON, 2000; NILSSON *et al.*, 2001) bem como os problemas causados pela falta deste no organismo, como ocorre na menopausa (FERNANDES *et al.*, 2004).

2.2 Menopausa

Menopausa é o termo derivado das palavras gregas *men* (mês) e *pausis* (cessação) utilizado para definir o evento representado pela última menstruação da mulher. Embora a menopausa seja evento pontual e facilmente identificável, ocorrem alterações significativas no organismo tanto antes quanto após a cessação da menstruação. Durante esse período, denominado climatério, ocorrem profundas alterações endócrinas e sistêmicas provocando diversas modificações físicas e psíquicas na mulher (FERNANDES *et al.*, 2004).

As principais alterações biológicas que aparecem nessa fase são decorrentes do gradual esgotamento da população folicular ovariana com diminuição dos ciclos ovulatórios e da produção estrogênica (ABERNETHY, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005). Durante o período do climatério, ocorrem autólise e fagocitose das células germinativas pelas células da granulosa, e conseqüente formação de folículos atrésicos no ovário. Há redução do tamanho dos ovários devido ao esgotamento folicular e às alterações involutivas, tais como esclerose arteriolar, fibrose cortical e redução de fluxo sanguíneo (FERNANDES *et al.*, 2004). Com a redução dos folículos funcionantes observa-se queda gradual dos níveis de estrogênio e, quando estes não são mais suficientes para estimular crescimento endometrial, a menstruação cessa e instala-se a menopausa. A queda do nível de estrogênio também provoca a eliminação da retroalimentação negativa exercida anteriormente no hipotálamo e na hipófise e aumento dos níveis de inibina B secretada pelos pequenos folículos antrais, ocorrendo, conseqüentemente, aumento dos níveis de FSH e do hormônio luteinizante (LH) sanguíneos (ABERNETHY, 2003;

NELSON *et al.*, 2005; NIH, 2005; BLAKE, 2006).

Os distúrbios que mais freqüentemente incomodam as pacientes na menopausa são a instabilidade vasomotora, distúrbios menstruais, sintomas psicológicos, a atrofia gênito-urinária e a diminuição do tamanho das mamas (ABERNETHY, 2003; NELSON *et al.*, 2005; NIH, 2005; BLAKE, 2006).

Os fogachos ou ondas de calor, muito comuns nessa fase, parecem ser produzidos por variação no sistema termorregulatório hipotalâmico. A deficiência de estrogênio causa disfunção nos neurotransmissores envolvidos na termorregulação, principalmente na região localizada na parte anterior do hipotálamo (FERNANDES *et al.*, 2004; BLAKE, 2006). Sintomas como transpiração noturna também podem ocorrer causando distúrbio do sono e, conseqüentemente, levar a outros sintomas como a fadiga (ABERNETHY, 2003; BLAKE, 2006). Diversos sintomas genitais decorrem do hipoestrogenismo, tais como, secura vaginal, dispareunia, sangramento durante o coito, prurido vulvar e corrimento vaginal. Os sintomas urológicos descritos são a disúria, polaciúria, noctúria, urgência urinária, e em especial a incontinência urinária (BLAKE, 2006). Estes sintomas decorrem da perda da atividade elástica e da contratilidade da mucosa uretral e do trígono vesical ocasionado pela hipotrofia e perda da tonicidade causada pela queda hormonal (FERNANDES *et al.*, 2004).

O hipoestrogenismo persistente também causa importantes alterações a longo prazo, tais como a osteoporose e alterações cardiocirculatórias (ABERNETHY, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004). O hipoestrogenismo que se segue à menopausa leva a um aumento da reabsorção óssea, com perda da massa óssea e aumento de fraturas de corpos vertebrais, do radio distal e de colo do fêmur (MARINHO *et al.*, 2001).

Os sintomas mencionados promovem uma profunda queda na qualidade de

vida da mulher, sendo necessária, muitas vezes, a instituição de tratamento específico para o controle dos sintomas indesejáveis (NELSON *et al.*, 2005; NIH, 2005).

2.2.1 Terapia Hormonal da Menopausa

A terapia hormonal da menopausa refere-se à administração de fármacos contendo um composto estrogênico ministrado às mulheres durante a transição menopausal e na pós-menopausa para amenizar os efeitos do hipoestrogenismo. O tratamento hormonal visa, em geral, combater os sintomas vasomotores, o ressecamento vaginal, amenizar os efeitos do hipoestrogenismo na pele, bem como, preservar a massa óssea, melhorar a qualidade de sono, impedir o declínio da função cognitiva e estimular a libido (CLAPAUCH *et al.*, 2005; NIH, 2005; USPSTF, 2005).

As preparações hormonais mais utilizadas em mulheres climatéricas são os estrogênios naturais (17β estradiol), o seu derivado sintético (valerato de estradiol) e os estrogênios conjugados equinos. Os progestagênios são administrados conjuntamente com os estrogênios visando a proteção endometrial, para neutralizar o aumento da incidência de hiperplasias e adenocarcinoma do endométrio em mulheres que faziam uso da estrogênio terapia isolada. O progestagênio mais utilizado nos Estados Unidos é o acetato de medroxiprogesterona e na Europa, o mais utilizado é o acetato de noretisterona (SOBRAC, 2004).

Há vários tipos de esquemas terapêuticos para a reposição hormonal. Em mulheres histerectomizadas, geralmente utiliza-se tratamento com estrogênio isolado e em mulheres com útero intacto utiliza-se o hormônio conjugado com um

progestágeno (CHRISTIANSEN, 2001). A terapia pode ser administrada por diversas vias. Quando administrado por via oral, é necessário aumento da dosagem, pois ocorre efeito de primeira passagem no fígado. A via transdérmica, apesar de fácil aplicação pode causar dermatite na área de aplicação e a aplicação via vaginal não produz ação sistêmica melhorando apenas os sintomas de ressecamento e hipotrofia locais (AL-AZZAWI, 2001).

Durante o climatério podem ainda ser utilizados androgênios associados à terapia estrogênica ou estro-progestativa. Os hormônios androgênicos são utilizados especialmente em pacientes ooforectomizadas e naquelas que apresentam indícios de insuficiência androgênica, muito comuns em pacientes com diminuição do desejo sexual (SOBRAC, 2004).

O uso de estrogênio na menopausa está contra-indicado nos casos de câncer de mama ou de endométrio, presença de outros tumores hormônio-dependentes, tromboflebite aguda, alteração tromboembólica, sangramento vaginal de origem indeterminada e doença hepática aguda (CLAPAUCH *et al.*, 2005; SPRITZER; WENDER, 2007)

Durante o tratamento com o uso de hormônios na menopausa, as mulheres devem ser acompanhadas pois o estrogênio pode estimular o crescimento de determinados tipos de cânceres que expressam receptores de estrogênio como alguns tipos de carcinoma ductal (VASSILOPOULOU-SELLIN, 2003). Além disso, o tratamento está associado a aumento de duas a três vezes no risco para trombose venosa e embolia pulmonar (MARINHO *et al.*, 2001; BLAKE, 2006). Existe ainda uma relação bem estabelecida entre a utilização de estrogênio, sem a oposição da progesterona, e o câncer endometrial (BLAKE, 2006).

O tratamento dos sintomas característicos da menopausa pode também ser

feito com medicamentos outros além dos compostos estrogênicos. Os produtos denominados Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERM), que são compostos que interagem com o receptor de estrógeno, possuindo atividades tecido-específica, são também medicamentos utilizados durante a menopausa (OSBORNE *et al.*, 2000). Esta ação tecido seletiva foi primeiramente descrita com o tamoxifeno, um SERM de primeira geração, que possui uma ação antiestrogênica na mama, efeitos benéficos na massa óssea de mulheres pós-menopausadas, reduz o colesterol (SINGH *et al.*, 2007), porém estimula a proliferação endometrial (SENKUS-KONEFKA *et al.*, 2004). O raloxifeno, substância considerada um SERM de segunda geração por não promover estimulação uterina, é uma droga eficaz para tratamento na menopausa sendo relatada diminuição de 50% na incidência de novas fraturas vertebrais em 36 meses de tratamento, em comparação com placebo, devido, principalmente à sua alta afinidade de ligação com o receptor de estrógeno (ETTINGER *et al.*, 1999). O raloxifeno é capaz de estimular as vias estrogênicas através do receptor beta, antagonizando a via do receptor alfa, podendo este ser um dos mecanismos pelos quais este fármaco exerce ação diferencial nos tecidos (BRZOZOWSKI *et al.*, 1997; JISA *et al.*, 2001).

Para as mulheres com intolerância ou contra-indicação aos estrogênios como terapia medicamentosa pode-se ainda indicar o uso de fitoestrogênios para o tratamento de alguns sintomas (CHENG *et al.*, 2007). A Sociedade Norte Americana de Menopausa indica como primeira linha terapêutica para os sintomas vasomotores característicos do período de transição menopausal a mudança do estilo de vida com a prática de exercícios e dieta regular acompanhada da utilização de alguns medicamentos ditos “naturais” como as isoflavonas e fitoestrogênios (NAMS, 2004).

Devido aos relatos indicando a relação entre terapia estrogênica e eventos

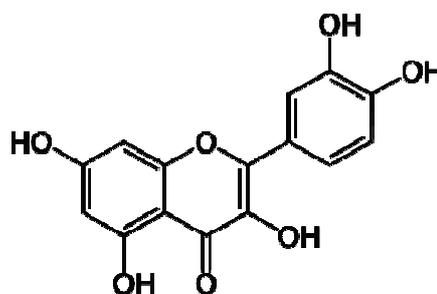
adversos e efeitos colaterais, há aumento significativo no uso de outros compostos além do estrogênio para o tratamento de sintomas da menopausa (KURZER, 2003; LOW DOG, 2007). Com isso, é crescente a procura por terapias com ervas para o tratamento de tais sintomas (PRESTWOOD, 2003; USUI, 2006).

2.3 Fitoestrogênios

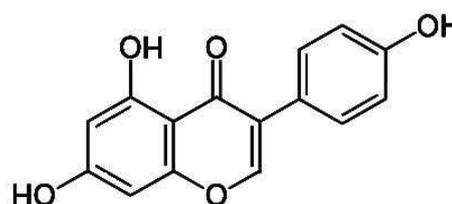
Dá-se a denominação de fitoestrogênios às substâncias presentes nas plantas que possuem efeito estrogênico, dentre estas, os flavonóides (KURZER; XU, 1997; CORNWELL *et al.*, 2004).

A propriedade estrogênica dos fitoestrogênios decorre de sua composição química que contém anéis fenólicos heterocíclicos, similares aos dos estrogênios naturais e sintéticos (figura 3) (IBARRETA *et al.*, 2001).

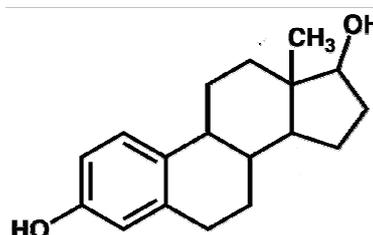
Quercetina



Genisteína



Estradiol



Esquema 3. Semelhança estrutural molecular entre o estradiol e os fitoestrogênios quercetina e genisteína. Fonte: Adaptado de MENSE, 2008.

Os fitoestrogênios, na forma de compostos apolares ou conjugados à albumina sérica podem passar através da membrana plasmática e estimular os receptores esteróides citoplasmáticos sendo carreados para o núcleo celular até o complexo de transcrição genética, agindo de forma semelhante aos compostos estrogênicos conhecidos (HAVSTEEN, 2002). Devido à semelhança estrutural dos fitoestrogênios com os estrogênios naturais, eles podem se ligar aos receptores de estrógenos, podendo competir com os hormônios endógenos (MIKSICEK, 1993; SKIBOLA; SMITH, 2000; IBARRETA *et al.*, 2001) assim como inibir enzimas envolvidas no metabolismo hormonal (SKIBOLA; SMITH, 2000).

Na dieta humana normal a presença de tais flavonóides é considerada inofensiva pois, geralmente, nenhum fitoestrogênio está presente nos alimentos em quantidade necessária para produzir efeitos fisiológicos. Porém, este pode não ser o caso dos vegetarianos que ingerem uma grande quantidade de alimentos ricos em isoflavonas como a soja e outros cereais (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Os fitoestrogênios são menos potentes do que o 17- β -estradiol mas mostram boa eficácia farmacológica quando em concentrações ideais, sendo equivalentes aos hormônios naturais (MIKSICEK, 1993; HARBORNE; WILLIAMS, 2000), podendo produzir efeito estrogênico próximo daquele produzido pelo hormônio endógeno (MIKSICEK, 1993; IBARRETA *et al.*, 2001).

O uso clínico de fitoestrogênios deve ser indicado em pacientes selecionadas, obtendo-se melhor resultado naquelas com pouca sintomatologia e no início da menopausa (TEMPFER *et al.*, 2007). O alto teor de fitoestrogênios em algumas

plantas caracteriza alternativa promissora para a terapia hormonal na menopausa (BECK *et al.*, 2003).

Dentre os flavonóides com efeito estrogênico, o grupo das isoflavonas é o mais estudado, tendo a soja como principal fonte alimentar. O interesse no estudo das isoflavonas como alternativa para as mulheres que não aderem, se recusam, apresentam contra-indicações ou têm efeitos adversos com a terapia hormonal clássica, veio de estudos epidemiológicos mostrando os efeitos clínicos causados pelo consumo de soja (FERNANDES *et al.*, 2004). As isoflavonas em mulheres na pós-menopausa aliviam os sintomas vasomotores, sendo, portanto, uma alternativa no combate desses sintomas (CARROLL, 2006; CASSIDY *et al.*, 2006).

Um estudo clínico mostrou que mulheres que receberam 60mg de isoflavonas por dia durante três meses tiveram redução de fogachos e sudorese noturna de 57% e 43% respectivamente. Neste mesmo estudo não foram encontradas mudanças no endométrio nem alteração no tecido mamário após a mamografia indicando uma possível segurança no uso destas substâncias (CHENG *et al.*, 2007).

De acordo com o Algoritmo para o Tratamento de Sintomas Vasomotores proposto por Panay (2007), o uso de isoflavonas provenientes de trevo vermelho, *Cimicifuga racemosa* e soja está indicado para o tratamento dos sintomas vasomotores em pacientes com queixas leves (PANAY, 2007).

Em um estudo clínico randomizado, controlado e duplo cego, as isoflavonas reduziram os fogachos em mulheres pós-menopausadas provavelmente devido à conhecida ação estrogênica destes compostos. Foi encontrado também aumento da concentração sérica de 17- β -estradiol sugerindo ação do fitoestrogênio através da ligação das isoflavonas às globulinas ligadoras de hormônios sexuais. Foi encontrada ainda redução do colesterol LDL e ausência de aumento da espessura

endometrial, constituindo uma alternativa segura para o tratamento de sintomas da menopausa (HAN, K. K. *et al.*, 2002).

O uso de fitoestrogênios também pode reduzir fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose como a hiperlipidemia e a hipertensão (DUNCAN *et al.*, 2003; CASSIDY *et al.*, 2006; TEMPFER *et al.*, 2007) através dos efeitos estrogênico e antioxidante (ADLERCREUTZ, 1995; KURZER; XU, 1997; DUNCAN *et al.*, 2003; CORNWELL *et al.*, 2004) sendo demonstrada diminuição dos níveis séricos de colesterol em ratas impúberes e ooforectomizadas que receberam soja (KISHIDA *et al.*, 2006).

Existe também uma proposta do uso de isoflavonas durante a menopausa para prevenir a perda óssea (SETCHELL; LYDEKING-OLSEN, 2003; CORNWELL *et al.*, 2004; CASSIDY *et al.*, 2006). De fato, as isoflavonas contidas na soja foram responsáveis, em ratos, pela prevenção da perda da densidade mineral óssea (ARJMANDI *et al.*, 1998) e, em camundongos, pelo aumento da densidade mineral óssea (ERLANDSSON *et al.*, 2005; PIE *et al.*, 2006; POWER *et al.*, 2006). Outra função terapêutica durante a menopausa seria na prevenção contra alguns tipos de câncer através da inibição do crescimento e da angiogênese tumoral promovido por alguns fitoestrogênios (ADLERCREUTZ, 1995; DUNCAN *et al.*, 2003; RICE; WHITEHEAD, 2006).

Não há consenso, entretanto, entre risco/benefício do uso de fitoestrogênios na menopausa. Estudos clínicos controlados e com longa duração devem ser feitos para melhor avaliar tal conduta (KRONENBERG; FUGH-BERMAN, 2002; POWLES, 2004; LOW DOG, 2005; CARROLL, 2006; NELSON *et al.*, 2006) bem como a segurança do seu uso (STRAUSS *et al.*, 1998).

2.4 *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba é a espécie viva de árvore mais antiga da terra, datando do período Paleozóico, há mais de 225 milhões de anos (DIAMOND *et al.*, 2000; BLUMENTHAL *et al.*, 2003). É a única planta pertencente à família Ginkgoaceae, ordem Ginkgoales da classe Gymnospermae (WHO, 1999; SMITH; LUO, 2004). O nome Ginkgo é derivado do chinês Yin-Kuo, que significa “damasco de prata” e biloba se refere à forma bilobulada das folhas em forma de leque (DIAMOND *et al.*, 2000).

A árvore de *Ginkgo biloba* é nativa da China mas já foi difundida, com função ornamental, para outros países como Austrália, Japão, Estados Unidos e países da Europa, sendo comercialmente cultivada na França e nos Estados Unidos (WHO, 1999). A árvore de Maidenhair, como também é chamada (KLEIJNEN; KNIPSCHILD, 1992), é considerada um fóssil vivo (SMITH; LUO, 2004) podendo viver de 2000 a 4000 anos (DIAMOND *et al.*, 2000; SMITH; LUO, 2004), alcançar mais de 30 metros de altura e possuir um diâmetro variando de 3 a 4 metros (WHO, 1999).

A árvore de *Ginkgo biloba* também é conhecida por sua grande resistência genética, apresentando defesa contra insetos, microorganismos e toxinas ambientais (TESCH, 2003; SMITH; LUO, 2004), fato comprovado na cidade japonesa de Hiroshima, já que foi a primeira planta a crescer na região após a explosão da bomba atômica (TESCH, 2003).

2.4.1 Utilização clínica

Há séculos o *Ginkgo biloba* tem sido utilizado com funções medicinais. Os primeiros relatos do uso clínico do *Ginkgo biloba* remontam mais de 5000 anos, na China antiga (SMITH; LUO, 2004). As indicações incluíam tratamentos para doenças do coração e pulmão através da inalação de vapores ou ingestão do chá de *Ginkgo biloba* (DIAMOND *et al.*, 2000). O chá das partes da planta era utilizado para o tratamento de asma, bronquite (KLEIJNEN; KNIPSCHILD, 1992; DIAMOND *et al.*, 2000), tosse e enurese (SMITH; LUO, 2004).

Nos dias de hoje, o extrato obtido a partir das folhas da árvore de *Ginkgo biloba* tem sido utilizado largamente pela população para o tratamento de diversas patologias. Atualmente, o extrato fabricado a partir das folhas de *Ginkgo biloba*, está entre os fitoterápicos mais freqüentemente utilizados em países Europeus (BLUMENTHAL *et al.*, 2003; SIERPINA *et al.*, 2003) como Alemanha e França (KLEIJNEN; KNIPSCHILD, 1992) e tem sido uma das 10 ervas mais vendidas nos Estados Unidos (MAR; BENT, 1999).

Na utilização folclórica do extrato de *Ginkgo biloba* também é citado o uso popular para o tratamento da inflamação, alergia (WHO, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2003), bronquite, rinite crônica, artrite e edema além de ser utilizado como vermífugo e indutor do trabalho de parto (WHO, 1999).

No presente momento, as principais indicações do uso do *Ginkgo biloba* são na “insuficiência cerebral” (confusão, redução da memória, distração, vertigem, zumbido, cefaléia, baixa energia, humor depressivo, baixa concentração, fadiga, ansiedade e diminuição da atividade física), doença de Alzheimer; doenças vasculares periféricas (claudicação intermitente, trombose venosa profunda), demência vascular (WHO, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2003); neuropatia diabética, oclusão venosa retiniana, degeneração macular senil, doença de Raynaud (DUBEY

et al., 2004), disfunção sexual (associado ao inibidor seletivo da recaptção de serotonina), reação vascular causada pelo frio, ação protetora na hipóxia (BLUMENTHAL *et al.*, 2003; SIERPINA *et al.*, 2003) e surdez coclear aguda (BLUMENTHAL *et al.*, 2003; SMITH; LUO, 2004).

O emprego do *Ginkgo biloba* nos casos citados é devido, principalmente, à ação na inibição do fator de ativação plaquetária e na importante atuação como antioxidante. Na primeira, o *Ginkgo biloba* impede a agregação plaquetária e causa um aumento da fluidez sangüínea. Já como antioxidante, o extrato age na diminuição do nível de espécies reativas de oxigênio (WHO, 1999) além de atenuar a peroxidação lipídica da membrana (SMITH; LUO, 2004).

Além disso, foram comprovadas diversas ações atribuídas ao *Ginkgo biloba* que poderiam estar relacionadas com os efeitos observados clinicamente tais como: inibição da enzima 3'5'-GMPc fosfodiesterase, provocando relaxamento endotelial (BLUMENTHAL *et al.*, 2003; SIERPINA *et al.*, 2003) através da estimulação da produção de óxido nítrico, promovendo aumento da circulação em artérias, veias e capilares (WHO, 1999; SMITH; LUO, 2004); aumento da liberação e recaptção de serotonina (BLUMENTHAL *et al.*, 2003); inibição da redução senil dos receptores muscarínicos colinérgicos e dos receptores α -adrenérgicos; estimulação da recaptção de colina no hipocampo; inibição da deposição de β -amilóides (SIERPINA *et al.*, 2003); aumento da plasticidade neuronal; aumento da captação e o consumo de glicose pelo cérebro (SMITH; LUO, 2004).

O extrato de *Ginkgo biloba*, apesar de ser geralmente bem tolerado, deve ser contra-indicado para pessoas que tiveram história de alergia ao fitoterápico (WHO, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2003) bem como para pacientes usuários de anticoagulantes (ERNST, 2002) ou que irão se submeter a algum procedimento

cirúrgico dada à possibilidade de causar hemorragias (BLUMENTHAL *et al.*, 2003). Outra precaução que deve ser tomada em pacientes usuários do *Ginkgo biloba* é em relação às possíveis interações medicamentosas que podem ocorrer causando potencialização das ações dos inibidores da MAO, agentes antiplaquetários como a aspirina e de anticoagulantes como a warfarina (DIAMOND *et al.*, 2000; BLUMENTHAL *et al.*, 2003).

Os efeitos adversos relatados após o uso do extrato de *Ginkgo biloba* são distúrbios do trato gastrointestinal (WHO, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2003) como diarreia, náuseas e vômitos (BLUMENTHAL *et al.*, 2003; DUBEY *et al.*, 2004) e distúrbios vasculares como cefaléia, reação cutânea alérgica (KLEIJNEN; KNIPSCHILD, 1992; WHO, 1999), vertigem e palpitação. São descritas ainda adinamia (STRAUSS *et al.*, 1998) e insônia após o uso do extrato (BLUMENTHAL *et al.*, 2003; DUBEY *et al.*, 2004).

2.4.2 Composição química

As preparações do extrato de *Ginkgo biloba* são realizadas com a folha verde e seca com a utilização de acetona e água para formulação do produto final (VAN BEEK, 2002). O extrato padronizado geralmente é administrado por via oral nas formas líquida e em tablete ou por via endovenosa (DIAMOND *et al.*, 2000).

O extrato padrão 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). Os alkyphenols também estão presentes no extrato de

Ginkgo biloba sendo encontrados nas formas de ácidos ginkgólicos, predominantemente, e ginkgols. Estes compostos possuem propriedades alergênicas, citotóxicas, mutagênicas e neurotóxicas possuindo, por isso, concentração limitada a 5ppm (partes por milhão) nos extratos, quantidade que não causa toxicidade ao organismo (VAN BEEK, 2002).

Os flavonóides presentes no extrato de *Ginkgo biloba* são absorvidos e metabolizados pelo organismo, tendo sido encontrados metabólitos dos flavonóides na urina, fezes e no sangue de ratos Wistar (PIETTA *et al.*, 1995) assim como na urina humana após ingestão oral do extrato (PIETTA *et al.*, 1997).

2.4.3 Propriedades estrogênicas do *Ginkgo biloba*

Recentemente aventou-se a possibilidade do extrato de *Ginkgo biloba* ser utilizado como um fitoestrogênio no tratamento de sintomas da menopausa (OH; CHUNG, 2004), porém pouco se sabe sobre o uso deste fitoterápico durante esta fase.

Sabe-se que mulheres já utilizam o extrato de *Ginkgo biloba* para tratamento dos principais sintomas da menopausa. Da parcela de 52,7% da população norte-americana que utiliza algum composto alternativo em substituição aos medicamentos tradicionais, 6,8% relatou fazer uso de *Ginkgo biloba* como terapia complementar durante a menopausa. Dentre as mulheres que utilizavam alguma terapia alternativa para o tratamento de sintomas vasomotores durante a menopausa, o *Ginkgo biloba* era utilizado por 7,2% delas. Já nas mulheres que utilizavam alguma terapia alternativa para tratamento de sintomas psicológicos e sintomas somáticos, o *Ginkgo biloba* era consumido por 8,3% e 7,8% das mulheres,

respectivamente (GOLD *et al.*, 2007).

O efeito estrogênico da quercetina e do kaempferol (flavonóides presentes no extrato de *Ginkgo biloba*) já foi comprovado *in vitro* (HAN, D. H. *et al.*, 2002). O kaempferol é especialmente eficaz na indução do receptor β de estrogênio (KUIPER *et al.*, 1998) agindo de maneira semelhante ao fitoestrogênio quercetina na maior competição pelo receptor β de estrogênio do que para o receptor α (SCAMBIA *et al.*, 1993; HAVSTEEN, 2002).

Recentemente, um estudo *in vitro*, comprovou a ação estrogênica do extrato de *Ginkgo biloba* e seus principais flavonóides (quercetina, kaempferol e isorhamnetina). As substâncias presentes no extrato se ligaram diretamente ao receptor de estrogênio mostrando afinidade maior para o receptor β de estrogênio em comparação com o α e promoveram inibição da ligação do estradiol em ambos os receptores α e β , indicando uma possível competição com o mesmo receptor. O extrato de *Ginkgo biloba* causou ainda efeito estrogênico visto através da proliferação em modelos de células de tumor de mama e da expressão do gene pS2, regulado pela resposta ao estrogênio (OH; CHUNG, 2004).

O *Ginkgo biloba* foi administrado a fêmeas de camundongos para avaliação do possível efeito estrogênico *in vivo*. Neste estudo preliminar, 18 animais foram castrados e divididos em três grupos que receberam água destilada (n=4) e diferentes doses do extrato de *Ginkgo biloba* (1,4mg, n=6; 2,8mg, n=8) via intraperitoneal por 15 dias. Foi encontrada citologia vaginal compatível com fase estrogênica em cinco dos seis animais que receberam 1,4mg do extrato e em quatro dos oito animais que receberam 2,8mg de *Ginkgo biloba* (LEE *et al.*, 2000).

Em estudo prévio, o extrato de *Ginkgo biloba* causou retardo de crescimento intra-uterino em ratos, quando administrado no período de organogênese e

fetogênese. Tal fato pode sugerir ação estrogênica do extrato (PINTO *et al.*, 2007) uma vez que estradiol administrado durante a gestação pode causar esse distúrbios de desenvolvimento (JONES; HAJEK, 1995; IGUCHI *et al.*, 2001).

Estudo clínico com quarenta e cinco pacientes que possuíam redução do fluxo sanguíneo arterial uterino e uma longa história de insucesso na terapia de reprodução assistida mostrou que as mulheres que receberam extrato de *Ginkgo biloba* na dose de 243mg/dia tiveram aumento significativo da espessura endometrial sem alteração do fluxo sanguíneo uterino e ovariano (PAULUS *et al.*, 2002).

Sabe-se também que a quercetina e o kaempferol alteram a fisiologia do metabolismo ósseo, provavelmente mediados pela ação estrogênica intrínseca destas substâncias, podendo ser utilizados para a prevenção e tratamento da osteoporose causada pela menopausa. O kaempferol impediu a produção de citocinas osteoclastogênicas pelos osteoblastos e ambas as substâncias alteraram a diferenciação celular dos osteoclastos (PANG *et al.*, 2006). A quercetina e o kaempferol também mostraram inibir a reabsorção óssea pelos osteoclastos bem como induzir a apoptose dessa célula, provavelmente via efeito estrogênico (WATTEL *et al.*, 2003). A quercetina e o kaempferol induziram o aumento da ação da fosfatase alcalina em osteoblastos, promovendo aumento da atividade do osteoblasto (PROUILLET *et al.*, 2004).

Apesar dos indícios do efeito estrogênico do extrato de *Ginkgo biloba*, não existem estudos conclusivos que comprovem a ação estrogênica *in vivo* do fitoterápico, sendo este o objetivo do presente trabalho.

3 HIPÓTESE

O extrato de *Ginkgo biloba* causa efeito estrogênico em ratas Wistar impúberes.

4 OBJETIVO

Avaliar o efeito estrogênico do extrato de *Ginkgo biloba* em ratas Wistar impúberes

5 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia proposta para este trabalho seguiu os princípios da OECD Guidelines for the Testing of Chemicals n. 440 (OECD, 2007) baseado nos relatórios da OECD Series on Testing and Assessment n. 21 e 38 para a avaliação do efeito estrogênico de substâncias (OECD, 2002; 2003). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo número 047/2005 - CEEA) que segue os princípios internacionais de ética na experimentação animal.

5.1 Modelo animal

Para a realização do trabalho foram utilizadas 70 ratas Wistar, com 22 dias de idade, com peso variando entre 28 e 32 gramas. O dia do nascimento foi considerado como o dia 1. Os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF. As ratas foram colocadas individualmente em caixas de polipropileno, forradas com maravalha selecionada e providas de cocho para ração e bebedouros. As caixas foram armazenadas em armários climatizados, com umidade e fluxo de ar controlados. Os armários estavam localizados em alojamentos com fotoperíodo controlado de 12h de ciclo claro/escuro e temperatura controlada por aparelhos de ar condicionado. Água e ração foram oferecidos à vontade.

5.2 Substância teste

O extrato de *Ginkgo biloba* foi gentilmente fornecido pela empresa JR Pharma (Juiz de Fora – Minas Gerais – Brasil). O extrato utilizado, originário da China (lote 20051126), possuía 25,32% de flavonas glicosídeos e 6,33% de terpenolactonas, concentrações semelhantes ao extrato padrão utilizado (VAN BEEK; MONTORO, 2009).

5.3 Doses da substância teste

A dose do extrato de *Ginkgo biloba* utilizada no presente trabalho baseou-se na maior dose utilizada em humanos (240 mg/dia) (WHO, 1999), sendo aproximadamente 4mg/Kg/dia para uma pessoa de 60Kg. As concentrações utilizadas neste experimento foram 4, 40, 100, 500 e 1000mg/Kg/dia, que representam, respectivamente, uma, 10, 25, 125 e 250 vezes a dose máxima recomendada em humanos. Foram utilizadas doses crescentes do extrato iniciando-se com a dose geralmente utilizada em humanos até o limite de 1000mg/Kg/dia conforme determinado no guideline da OECD (OECD, 2007).

5.4 Procedimento experimental

As ratas foram pesadas e distribuídas aleatoriamente em sete grupos com 10 animais em cada, sendo um controle negativo, um controle positivo e cinco grupos tratados com extrato de *Ginkgo biloba*. Os animais do grupo controle negativo (Controle) receberam 0,4mL de água destilada via intragástrica e os do grupo controle positivo (Estrogênio) receberam 1µg/Kg de α -estradiol (CAS no. 57-91-0, \geq

98% purity, Sigma Aldrich, USA) em 0,3mL de óleo mineral (CAS no. 8042-47-5, Sigma Aldrich, USA), via subcutânea. Os animais dos grupos tratados com GBE (Gb) receberam 4, 40, 100, 500 e 1000mg/Kg/dia, administrado em 0,4mL de solução aquosa via intragástrica. A administração das soluções ocorreu uma vez ao dia, às 10h, por três dias consecutivos.

Após 24 horas do último dia de administração as ratas foram inspecionadas para identificar abertura vaginal. Logo após, as ratas foram pesadas e eutanasiadas por deslocamento cervical, sob sedação com Ketamina (90mg/Kg de peso corporal, via i.p.).

O trato reprodutor foi cuidadosamente dissecado e removido em bloco. Os cornos uterinos, juntamente com a cérvix, foram pesados em balança analítica após separação da vagina e dos ovários. Calculou-se o peso uterino relativo dividindo-se o peso dos cornos uterinos pelo respectivo peso do animal.

Os cornos uterinos e a vagina foram fixados em solução de formol cálcio de Baker e posteriormente processados para confecção dos blocos de parafina. Foram feitos cortes longitudinais (5 μ m) de vagina e útero, que foram corados com Hematoxilina-Eosina. De cada animal foi confeccionado uma lâmina histológica de útero e outra do tecido vaginal. A lâmina referente ao tecido uterino foi confeccionada no plano do maior diâmetro deste órgão. As lâminas foram observadas e analisadas utilizando o sistema de análise de imagens Axiovision, capturadas em microscópio de luz (Carl Zeiss, Software Release 4.7.1, 2008, Alemanha).

Os cortes histológicos de vagina foram observados com aumento de 10x. Em cada corte foram realizadas 15 medidas aleatórias da espessura da mucosa vaginal. Já os cortes histológicos de útero foram observados com aumento de 40x e também

foram realizadas em cada corte 15 medidas aleatórias do epitélio superficial até a lâmina própria.

5.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi feita pelo teste ANOVA seguido de teste post-hoc de Tukey para variáveis homocedásticas e Dunnett T3 para variáveis não homocedásticas. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Artigo submetido para publicação

Artigo enviado à revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia” (ABEM)

Avaliação do efeito estrogênico do *Ginkgo biloba* em ratas Wistar imaturas
Assessment of estrogenic effect of *Ginkgo biloba* on immature Wistar rats

Rafael Moraes Pinto, Eduardo Siqueira Fernandes, Vera Maria Peters, Martha de
Oliveira Guerra

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

Corresponding author: Martha de Oliveira Guerra. Universidade Federal de Juiz de Fora. Centro de Biologia da Reprodução. Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel.: +55 (32) 2102-3251; Fax: +55 (32) 21023255. E-mail: martha.guerra@ufjf.edu.br

Título abreviado: *Efeito estrogênico do Ginkgo biloba*

Abbreviated title: Estrogenic effect of *Ginkgo biloba*



Rafael Moraes Pinto <moraes.rafael@gmail.com>

[ABEM] Agradecimento pela Submissão

ABE&M - editores <abem-editoria@endocrino.org.br>

1 de junho de 2009 00:09

Para: Rafael Moraes Pinto <moraes.rafael@gmail.com>

Prezado Dr. (Dra.) Rafael Moraes Pinto:

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "ABEM-661 -Assessment of estrogenic effect of Ginkgo biloba on immature Wistar rats" para os Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Através da interface de administração do sistema utilizado nesta submissão, será possível acompanhar o progresso da avaliação editorial.

<http://www.abem-sbem.org.br>.

ou

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/abem/author/submission/13493>

Login: rafaelpinto

Agradecemos mais uma vez por considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Atenciosamente,

ABE&M - editores
Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia
Corpo Editorial ABE&M
abem-editoria@endocrino.org.br
www.abem-sbem.org.br
Universidade Federal de Juiz de Fora

Caixa Postal 328

CEP 36001-970

Juiz de Fora, MG, Brazil

Assistente Editorial
Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia
<http://submission.scielo.br/index.php/abem>

7 COMENTÁRIOS

O extrato de *Ginkgo biloba* administrado em ratas Wistar imaturas apresentou indícios de efeito estrogênico nas doses de 4, 40, 100 e 500mg/Kg apresentando discreta estimulação uterina sem apresentar proliferação celular vaginal. Verificou-se ainda que o extrato apresentou efeito anti-estrogênico na dose de 1000mg/Kg caracterizando uma possível ação inibitória da aromatase. Porém existem poucos estudos atualmente que abordam a utilização do GBE em humanos com relação aos efeitos hormonais ou reprodutivos, sendo necessários estudos clínicos mais completos para determinar a ação e segurança deste extrato no organismo.

8 CONCLUSÃO

O extrato de *Ginkgo biloba* apresentou discreto efeito estrogênico com as doses de 4, 40, 100 e 500mg/Kg e efeito anti-estrogênico com a dose de 1000mg/Kg de peso corporal.

REFERÊNCIAS

ABERNETHY, K. Menopause. **Nursing Standard**, Middlesex, v. 17, n. 47, p. 45-53, 2003.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspectives**, Washington D.C., v. 103 Suppl 7, p. 103-12, 1995.

AL-AZZAWI, F. The menopause and its treatment in perspective. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 77, n. 907, p. 292-304, 2001.

ARJMANDI, B. H.; BIRNBAUM, R.; GOYAL, N. V. et al. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6 Suppl, p. 1364S-1368S, 1998.

BECK, V.; UNTERRIEDER, E.; KRENN, L. et al. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 84, n. 2-3, p. 259-68, 2003.

BLAKE, J. Menopause: evidence-based practice. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 20, n. 6, p. 799-839, 2006.

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

BRITT, K. L.; FINDLAY, J. K. Estrogen actions in the ovary revisited. **The Journal of Endocrinology**, London, v. 175, n. 2, p. 269-76, 2002.

BRZOZOWSKI, A. M.; PIKE, A. C.; DAUTER, Z. et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature**, London, v. 389, n. 6652, p. 753-8, 1997.

CARLSTEN, H. Immune responses and bone loss: the estrogen connection. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 208, p. 194-206, 2005.

CARROLL, D. G. Nonhormonal therapies for hot flashes in menopause. **American Family Physician**, Kansas City, v. 73, n. 3, p. 457-64, 2006.

CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; LISE NIELSEN, I. et al. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 65, n. 1, p. 76-92, 2006.

CHENG, G.; WILCZEK, B.; WARNER, M. et al. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. **Menopause**, New York, v. 14, n. 3 Pt 1, p. 468-73, 2007.

CHRISTIANSEN, C. Hormone replacement therapy for the postmenopausal woman. **Maturitas**, Limerick, v. 38 Suppl 1, p. S1-5, 2001.

CLAPAUCH, R.; ATHAYDE, A.; MEIRELLES, R. M. R. et al. Terapia Hormonal da Menopausa: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina e Andrologia da SBEM em 2004. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 449-54, 2005.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G. et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 79-95, 2002.

CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry**, New York, v. 65, n. 8, p. 995-1016, 2004.

COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K. et al. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-

beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. **Endocrinology**, Springfield, v. 138, n. 11, p. 4613-21, 1997.

DIAMOND, B. J.; SHIFLETT, S. C.; FEIWEL, N. et al. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 81, n. 5, p. 668-78, 2000.

DUBEY, A. K.; SHANKAR, P. R.; UPADHYAYA, D. et al. Ginkgo biloba - an appraisal. **Kathmandu University Medical Journal**, Kathmandu, v. 2, n. 3, p. 225-9, 2004.

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R.; KURZER, M. S. Phyto-oestrogens. **Best practice & research. Clinical endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 253-71, 2003.

ERLANDSSON, M. C.; ISLANDER, U.; MOVERARE, S. et al. Estrogenic agonism and antagonism of the soy isoflavone genistein in uterus, bone and lymphopoiesis in mice. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 113, n. 5, p. 317-23, 2005.

ERNST, E. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 136, n. 1, p. 42-53, 2002.

ETTINGER, B.; BLACK, D. M.; MITLAK, B. H. et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. **JAMA: The journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 282, n. 7, p. 637-45, 1999.

FERNANDES, C. E.; BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. D. **Climatério: manual de orientação**. São Paulo: Ponto, 2004. 372p.

FRIEDLANDER, A. H. The physiology, medical management and oral implications of menopause. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 133, n. 1, p. 73-81, 2002.

GOLD, E. B.; BAIR, Y.; ZHANG, G. et al. Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Menopause**, New York, v. 14, n. 4, p. 612-23, 2007.

GREENE, G. L.; GILNA, P.; WATERFIELD, M. et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. **Science**, New York, v. 231, n. 4742, p. 1150-4, 1986.

GUSTAFSSON, J. A. An update on estrogen receptors. **Seminars in Perinatology**, New York, v. 24, n. 1, p. 66-9, 2000.

HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, n. 12, p. 5566-78, 1999.

HAN, D. H.; DENISON, M. S.; TACHIBANA, H. et al. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, n. 7, p. 1479-87, 2002.

HAN, K. K.; SOARES, J. M., JR.; HAIDAR, M. A. et al. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 99, n. 3, p. 389-94, 2002.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARRIS, H. A. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

IBARRETA, D.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 109, n. 3, p. 161-84, 2001.

IGUCHI, T.; WATANABE, H.; KATSU, Y. Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. **Hormones and Behavior**, New York, v. 40, n. 2, p. 248-51, 2001.

JISA, E.; DORNSTAUDER, E.; OGAWA, S. et al. Transcriptional activities of estrogen receptor alpha and beta in yeast properties of raloxifene. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 62, n. 7, p. 953-61, 2001.

JONES, L. A.; HAJEK, R. A. Effects of estrogenic chemicals on development. **Environmental Health Perspectives**, Washington D.C., v. 103 Suppl 7, p. 63-7, 1995.

KISHIDA, T.; MIZUSHIGE, T.; NAGAMOTO, M. et al. Lowering effect of an isoflavone-rich fermented soybean extract on the serum cholesterol concentrations in female rats, with or without ovariectomy, but not in male rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 7, p. 1547-56, 2006.

KLEIJNEN, J.; KNIPSCHILD, P. Ginkgo biloba. **Lancet**, London, v. 340, n. 8828, p. 1136-9, 1992.

KRONENBERG, F.; FUGH-BERMAN, A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 137, n. 10, p. 805-13, 2002.

KUIPER, G. G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, Springfield, v. 138, n. 3, p. 863-70, 1997.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, Washington D.C., v. 93, n. 12, p. 5925-30, 1996.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, Springfield, v. 139, n. 10, p. 4252-63, 1998.

KURZER, M. S. Phytoestrogen supplement use by women. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 6, p. 1983S-1986S, 2003.

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 353-81, 1997.

LEE, E. Y.; PARK, W. I.; KIM, E. K. et al. Estrogenic effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761): changes of vaginal epithelium in ovariectomized mouse. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 566, 2000.

LOW DOG, T. Menopause: a review of botanical dietary supplements. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 118 Suppl 12B, p. 98-108, 2005.

LOW DOG, T. The role of complementary and alternative medicine during the menopausal transition. **Menopause**, New York, v. 14, n. 3 Pt 1, p. 347-9, 2007.

MAR, C.; BENT, S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. **The Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 171, n. 3, p. 168-71, 1999.

MARINHO, R. M.; FERNANDES, C. E.; WEHBA, S. et al. **Atenção primária e terapia de reposição hormonal no climatério**. Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, 2001. Disponível em <http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/034.pdf> acesso em 25 de junho de 2009.

MATURANA, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; SPRITZER, P. M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics (Sao Paulo)**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2007.

MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 57, p. 357-84, 2002.

MCEWEN, B. S. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 91, n. 6, p. 2785-801, 2001.

MENSE, S. M.; HEI, T. K.; GANJU, R. K. et al. Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 116, n. 4, p. 426-33, 2008.

MIKSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 44, n. 1, p. 37-43, 1993.

NAMS. Treatment of menopause-associated vasomotor symptoms: position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, New York, v. 11, n. 1, p. 11-33, 2004.

NELSON, H. D.; HANEY, E.; HUMPHREY, L. et al. Management of menopause-related symptoms. **Evidence Report/Technology Assessment (Summary)**, Rockville, n. 120, p. 1-6, 2005.

NELSON, H. D.; VESCO, K. K.; HANEY, E. et al. Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 295, n. 17, p. 2057-71, 2006.

NIH. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: management of menopause-related symptoms. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 142, n. 12 Pt 1, p. 1003-13, 2005.

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. **Breast Cancer Research**, London, v. 2, n. 5, p. 360-6, 2000.

NILSSON, S.; MAKELA, S.; TREUTER, E. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiological Reviews**, Washington D.C., v. 81, n. 4, p. 1535-65, 2001.

OECD. **OECD Series on Testing and Assessment No. 21: Appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals**. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2002.

OECD. **OECD Series on Testing and Assessment No. 38: Detailed background review of the uterotrophic bioassay**. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2003.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties**. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2007.

OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 74, n. 11, p. 1325-35, 2004.

OSBORNE, C. K.; ZHAO, H.; FUQUA, S. A. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 18, n. 17, p. 3172-86, 2000.

PANAY, N. Integrating phytoestrogens with prescription medicines--a conservative clinical approach to vasomotor symptom management. **Maturitas**, Limerick, v. 57, n. 1, p. 90-4, 2007.

PANG, J. L.; RICUPERO, D. A.; HUANG, S. et al. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 71, n. 6, p. 818-26, 2006.

PAULUS, W. E.; ZHANG, M.; STREHLER, E. et al. Application of ginkgo biloba in assisted reproduction therapy. **Fertility and Sterility**, New York, v. 78, n. 3, p. S124, 2002.

PETTERSSON, K.; GUSTAFSSON, J. A. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 63, p. 165-92, 2001.

PIE, J. E.; PARK, J. H.; PARK, Y. H. et al. Effect of genistein on the expression of bone metabolism genes in ovariectomized mice using a cDNA microarray. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, n. 3, p. 157-64, 2006.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; MAURI, P. L. Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. **Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 693, n. 1, p. 249-55, 1997.

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

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; REIS, J. E. P. et al. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 23, n. 4, p. 480-5, 2007.

POWER, K. A.; WARD, W. E.; CHEN, J. M. et al. Genistein alone and in combination with the mammalian lignans enterolactone and enterodiol induce estrogenic effects on bone and uterus in a postmenopausal breast cancer mouse model. **Bone**, Elmsford, v. 39, n. 1, p. 117-24, 2006.

POWLES, T. Isoflavones and women's health. **Breast Cancer Research**, London, v. 6, n. 3, p. 140-2, 2004.

PRESTWOOD, K. M. The search for alternative therapies for menopausal women: estrogenic effects of herbs. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 88, n. 9, p. 4075-6, 2003.

PROUILLET, C.; MAZIERE, J. C.; MAZIERE, C. et al. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 67, n. 7, p. 1307-13, 2004.

RICE, S.; WHITEHEAD, S. A. Phytoestrogens and breast cancer--promoters or protectors? **Endocrine-Related Cancer**, Bristol, v. 13, n. 4, p. 995-1015, 2006.

SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F. O.; PANICI, P. B. et al. Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, New York, v. 54, n. 3, p. 462-6, 1993.

SENKUS-KONEFKA, E.; KONEFKA, T.; JASSEM, J. The effects of tamoxifen on the female genital tract. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 291-301, 2004.

SETCHELL, K. D.; LYDEKING-OLSEN, E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, n. 3 Suppl, p. 593S-609S, 2003.

SIERPINA, V. S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. Ginkgo biloba. **American Family Physician**, Kansas City, v. 68, n. 5, p. 923-6, 2003.

SINGH, M. N.; STRINGFELLOW, H. F.; PARASKEVAIDIS, E. et al. Tamoxifen: important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 91-100, 2007.

SOBRAC. Consenso da SOBRAC – Associação Brasileira de Climatério – Terapêutica Hormonal na Peri e na Pós-Menopausa. 2004. Disponível em <<http://www.menopausa.org.br/profissionais/imagens/consenso-SOBRAC-miolo.pdf>> (acesso em 25 de junho de 2009).

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 29, n. 3-4, p. 375-83, 2000.

SMITH, J. V.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 4, p. 465-72, 2004.

SPRITZER, P. M.; WENDER, M. C. O. Terapia hormonal na menopausa: quando não usar. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 51, n. 7, p. 1058-63, 2007.

STRAUSS, L.; SANTTI, R.; SAARINEN, N. et al. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 102-103, p. 349-54, 1998.

TEMPFER, C. B.; BENTZ, E. K.; LEODOLTER, S. et al. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. **Fertility and Sterility**, New York, v. 87, n. 6, p. 1243-9, 2007.

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

TOESCA, A.; PAGNOTTA, A.; SPECCHIA, N. Evidence of type II estrogen receptor in human osteoblast-like cells. **Cell Biology International**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 303-9, 2000.

USPSTF. Hormone therapy for the prevention of chronic conditions in postmenopausal women: recommendations from the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 142, n. 10, p. 855-60, 2005.

USUI, T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 53, n. 1, p. 7-20, 2006.

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

VAN BEEK, T. A.; MONTORO, P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 11, p. 2002-32, 2009.

VASSILOPOULOU-SELLIN, R. Breast Cancer and Hormonal Replacement Therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 997, n. 1, p. 341-50, 2003.

WANG, H.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, n. 5, p. 1331-40, 2000.

WATTEL, A.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R. et al. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 35-42, 2003.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 116, n. 5, p. 1186-94, 2006.

WHO. Folium Ginkgo. In: **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999. p.154-67.

WU, J. M.; ZELINSKI, M. B.; INGRAM, D. K. et al. Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 230, n. 11, p. 818-28, 2005.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; BECKER, T. et al. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? **Maturitas**, Limerick, v. 44 Suppl 1, p. S9-20, 2003.

APÊNDICE

Apêndice A – Capítulo de livro publicado

Recent Progress in Medicinal Plants

Volume 25

Chemistry and Medicinal Value

V.K. Singh

Assistant Director (Botany)

*Central Council for Research in Unani Medicine
(Dept. of AYUSH, Ministry of Health & Family Welfare)
61-65, Institutional Area, Janakpuri, New Delhi, India*

J.N. Govil

Former Principal Scientist

*Division of Genetics
Indian Agricultural Research Institute
New Delhi, India*

ISBN : 1-933699-15-9
SERIES ISBN : 0-9656038-5-7

2009



Stadium Press LLC, U.S.A.

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

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

E-mail : studiumpress@studiumpress.com

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

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

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

Apêndice B – Artigo de Revisão publicado

Disruptores endócrinos: descrição dos métodos para avaliação *in vivo* de produtos químicos com efeito estrogênico

Endocrine disruptors: methods description for in vivo evaluation of chemicals with estrogenic effects

Rafael Moraes Pinto *

Eduardo Siqueira Fernandes *

Vera Maria Peters **

Martha de Oliveira Guerra **

PINTO.R.M.; FERNANDES, E.S.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. Disruptores endócrinos: descrição dos métodos para avaliação *in vivo* de produtos químicos com efeito estrogênico. *Bol. Cent. Biol. Reprod.*, UFJF, v. 26, (no único), p. 23 2008.

Resumo: A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) criou um grupo de trabalho para validar os métodos-teste para detecção de disruptores endócrinos. Esta breve revisão descreve o ensaio *in vivo* recomendado pela OECD para detecção de substâncias com efeito estrogênico.

Palavras-chave: disruptores endócrinos. rato. diretrizes. estrogênio

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos evidenciou-se que muitos produtos químicos, presentes no meio ambiente, podem interferir com as ações fisiológicas dos hormônios endógenos. Estas substâncias podem imitar, antagonizar, ou interferir com hormônios endógenos e, por isso, foram chamados de disruptores endócrinos (DARBRE, 2006b).

Os disruptores endócrinos, que além de serem encontrados no meio ambiente, podem também ser pro-

venientes de produtos sintéticos, atuam, principalmente, no genoma celular como agonistas ou antagonistas dos receptores de esteróides. Com este mecanismo de ação podem causar a produção de hormônios ou até mesmo o bloqueio do processo de síntese hormonal e, com isso, provocar interferência nas funções sistêmicas do organismo (WARING e HARRIS, 2005; TABB e BLUMBERG, 2006).

Dentre os efeitos causados pela alteração hormonal, os disruptores endócrinos podem alterar a função

* Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora

** Pesquisadores do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora

Apêndice C – Tema livre apresentado em Congresso

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; REIS, J. E. P.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Análise morfológica do efeito estrogênico do *Ginkgo biloba* administrado a ratas Wistar impúberes. In: XXI Reunión Bienal Asociación Latinoamericana de Investigadores em Reproducción Humana. São Paulo, Brasil: Anais do evento, 2009. p. 69-70.

Apêndice D - Artigo enviado a Publicação

Artigo enviado à revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia” (ABEM)

Avaliação do efeito estrogênico do *Ginkgo biloba* em ratas Wistar imaturas

Assessment of estrogenic effect of *Ginkgo biloba* on immature Wistar rats

Rafael Moraes Pinto, Eduardo Siqueira Fernandes, Vera Maria Peters, Martha de Oliveira

Guerra

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

Brazil

Corresponding author: Martha de Oliveira Guerra. Universidade Federal de Juiz de Fora.

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

Brazil. Tel.: +55 (32) 2102-3251; Fax: +55 (32) 21023255. E-mail:

martha.guerra@ufjf.edu.br

Título abreviado: *Efeito estrogênico do Ginkgo biloba*

Abbreviated title: Estrogenic effect of *Ginkgo biloba*

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito estrogênico do extrato de *Ginkgo biloba* em ratas Wistar imaturas.

Métodos: Setenta ratas Wistar com 22 dias de vida foram distribuídas em sete grupos experimentais com dez animais em cada grupo. O grupo controle negativo recebeu água destilada, via gavagem; o grupo controle positivo recebeu 17 α -etinilestradiol, via subcutânea; os grupos tratados receberam 4, 40, 100, 500 e 1000mg/Kg de *G. biloba*, via gavagem. O procedimento durou três dias. Foram analisados o peso corporal, peso uterino e histomorfometria de útero e vagina. **Resultados:** A espessura da mucosa vaginal foi menor nos animais que receberam 1000mg/Kg do extrato. Nos animais tratados com 4, 40, 100 e 500mg/Kg do extrato observou-se aumento da espessura do epitélio superficial uterino.

Conclusão: O extrato de *Ginkgo biloba* apresentou indícios de efeito estrogênico quando administrado a ratas Wistar nas doses de 4, 40, 100 e 500mg/Kg e efeito anti-estrogênico na dose de 1000mg/Kg.

Descritores: Ratos; Estrogênios; *Ginkgo biloba*; Útero; Moduladores Seletivos de Receptor Estrogênico.