

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Jessica Corrêa Bezerra

**EFEITO DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba*, APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA, SOBRE
OS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR**

Juiz de Fora

2015

Jessica Corrêa Bezerra

Efeito do extrato de *Ginkgo biloba*, após exposição materna, sobre os testículos e epidídimo de ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Orientadora: Dra. Martha de Oliveira Guerra

Co-Orientadora: Dra. Vera Maria Peters

Juiz de Fora

2015

Jessica Correa Bezerra

Efeito do extrato de *Ginkgo biloba*, após exposição materna, sobre os testículos e epidídimo de ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em 13 de Março de 2015

BANCA EXAMINADORA

Dra. Martha de Oliveira Guerra - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Maycon de Moura Reboredo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Ingrid Dragan Taricano
Universidade Nove de Julho

Dedico essa dissertação à minha família, que sempre incentivou meu crescimento intelectual e profissional. Dedico também ao Pedro, pelo carinho, amor e por nunca soltar a minha mão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por direcionar meus passos até a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Norma (*in memorian*) e Raimundo (*in memorian*), pelo amor, humildade e exemplo de vida. À toda minha família, pelo amor que nunca deixaram faltar, pela confiança e incentivo. Vocês são o alicerce que sustenta minha vida.

Ao Pedro Bellei, pelo companheirismo, amor, carinho, confiança e pelo maior incentivo. Por caminhar ao meu lado em todos os momentos, tornando a trajetória mais amena e agradável.

À minha orientadora, Martha de Oliveira Guerra pela orientação, ensinamentos e por todas as contribuições ao longo deste trabalho.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e Ao Programa de Pós Graduação em Saúde – UFJF pela oportunidade de realização deste trabalho, pelo crescimento pessoal e profissional.

À Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia (TOXIFAR/Fapemig CBB-RED-00008-14), pelo financiamento do projeto e ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: CBB - APQ-01021-12) pela concessão de bolsa de pesquisador II à orientadora

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR/UFJF) pelo fornecimento das instalações e do modelo animal para o desenvolvimento do projeto.

Ao Leonardo Oshio pela amizade, conselhos e cumplicidade. Por ter me ensinado todas as técnicas necessárias para a realização deste trabalho e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Felipe Martins pela amizade, companheirismo e pela participação no trabalho. À Emilia Rocha e ao José Reinaldo, meus pupilos da Iniciação Científica, pela amizade, empenho, dedicação, responsabilidade e por dividirem comigo as competências deste trabalho.

À Cláudia Ribeiro pelos ensinamentos primordiais sobre avaliação do sistema reprodutor masculino e pela base do projeto. Ao João Evangelista, pelo fornecimento do extrato de *Ginkgo biloba*.

Agradeço a todos que de certa forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Incidência de disruptores endócrinos sobre o desenvolvimento gonadal é a causa de muitas anomalias do sistema reprodutor masculino (SRM), principalmente aqueles com ação estrogênica. O *Ginkgo biloba* é um disruptor endócrino, que possui afinidade por receptores β estrogênicos, importantes no desenvolvimento do SRM. A proposta deste estudo foi avaliar o efeito do *Ginkgo biloba*, após exposição materna, sobre os parâmetros reprodutivos dos machos F1. Ratas Wistar prenhes receberam 25, 50 ou 100 mg/Kg/dia de *Ginkgo biloba*, por gavagem, do 16º ao 20º dias de prenhez. As fêmeas prenhes foram avaliadas quanto ao consumo diário de ração, peso corporal e sinais clínicos de toxicidade. Nos machos F1 foram analisados a descida testicular, morfologia da glândula do pênis, concentração e morfologia espermática, peso dos órgãos reprodutores e viscerais, níveis séricos de testosterona, e a organização estrutural do tecido testicular e epididimário. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas variáveis analisadas, com exceção da morfologia espermática, onde houve aumento de espermatozoides anormais em todos os grupos tratados em comparação com o grupo controle. O número de espermatozoides anormais nos grupos C, T1, T2 e T3 foi, respectivamente, $19,90 \pm 3,53$, $29,0 \pm 7,01$, $26,05 \pm 3,72$ e $30,05 \pm 6,53$ (Média \pm DP), contando-se 200 espermatozoides/lâmina. A maioria das anomalias concentrou-se na cauda do espermatozoide, totalizando $13,35 \pm 2,42$, $18,45 \pm 6,87$, $16,15 \pm 4,31$ e $19,55 \pm 5,43$ (Média \pm DP) nos grupos C, T1, T2 e T3, respectivamente. Estes resultados indicam que o *Ginkgo biloba* não causa alterações na toxicidade materna, no desenvolvimento fetal, pós-natal e na data da puberdade, mas induz o aumento da anomalia espermática.

Palavras-chave: *Ginkgo biloba*, anomalia espermática, fetogênese, receptor estrogênico, rato

ABSTRACT

Incidence of endocrine disruptors on the gonadal development is the cause of many anomalies of the male reproductive system (MRS), especially those with estrogen action. *Ginkgo biloba* is an endocrine disruptor, which has affinity for β estrogen receptors, important in the development of MRS. The purpose of this study was to evaluate the effect of *Ginkgo biloba*, after maternal exposure on the reproductive parameters of F1 males. Pregnant Wistar rats received 25, 50 or 100 mg /kg/day of *Ginkgo biloba*, by gavage, from the 16th to 20th days of pregnancy. Pregnant animals were evaluated for daily feed intake, body weight and clinical signs of toxicity. In F1 males were analyzed testicular descent, morphology of the glans penis, sperm concentration, sperm morphology, weight of reproductive and visceral organs, seric concentrations of testosterone, and the structural organization of testicular tissue and epididymis. No statistically significant differences were observed in the analyzed variables, except for sperm morphology, where there was an increase of abnormal sperm in all treated groups compared with the control group. The number of abnormal sperm in groups C, T1, T2 and T3 were, respectively, 19.90 ± 3.53 , 29.0 ± 7.01 , 26.05 ± 3.72 and 30.05 ± 6.53 (mean \pm SD), counting 200 sperm / stain. Most anomalies concentrated in the sperm tail, totaling 13.35 ± 2.42 , 18.45 ± 6.87 , 16.15 ± 4.31 and 19.55 ± 5.43 (mean \pm SD) in groups C, T1, T2 and T3, respectively. These results indicate that *Ginkgo biloba* does not alter the maternal toxicity, fetal development, postnatal and puberty date, but induces the increase of sperm abnormality.

Keywords: *Ginkgo biloba*, sperm abnormality, fetogenesis, estrogen receptor, rat

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Descida testicular completa em ratos Wistar.....	24
Figura 2 – Fase A da diferenciação da morfologia da glândula do pênis em ratos Wistar.....	24
Figura 3 - Fase B da diferenciação da morfologia da glândula do pênis em ratos Wistar.....	24
Figura 4 - Fase C da diferenciação da morfologia da glândula do pênis em ratos Wistar.....	24
Figura 5 – Determinação da proporção volumétrica dos compartimentos testiculares tubular e intertubular.....	27
Figura 6 – Determinação do diâmetro e altura do epitélio do túbulo seminífero em corte histológico de testículo de rato Wistar.....	27
Figura 7 – Determinação da altura do epitélio do ducto epididimário em corte histológico de epidídimo de rato Wistar.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ArKO	Knockout para Aromatase
ATF-1	Fator Ativador de Transcrição 1
ATF-2	Fator Ativador de Transcrição 2
C	Grupo Controle
DEs	Disruptores Endócrinos
DPN	Dias Pós Natal
EGb	Extrato de Ginkgo biloba
EGb 761	Extrato padronizado de Ginkgo biloba
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
E2	Estradiol
MAO A	Monoamina oxidase A
MAO B	Monoamina oxidase B
REs	Receptores de Estrogênio
RE- α	Receptor Estrogênico α
RE α KO	Knockout para Receptor de Estrogênio α
RE- β	Receptor Estrogênico β
RE β KO	Knockout para Receptor de Estrogênio β
T.EGb	Grupo Tratado com Extrato de Ginkgo biloba
T.EGb 25	Grupo Tratado com Extrato de Ginkgo biloba 25 mg/kg
T.EGb 50	Grupo Tratado com Extrato de Ginkgo biloba 50mg/kg
T.EGb 100	Grupo Tratado com Extrato de Ginkgo biloba 100 mg/kg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	<i>Ginkgo biloba.....</i>	14
2.2	ESTROGÊNIO E O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	18
3	HIPÓTESE.....	20
4	OBJETIVOS.....	21
4.1	GERAL.....	21
4.2	ESPECÍFICOS.....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1	EXTRATO DE <i>Ginkgo biloba</i>	22
5.2	ANIMAIS.....	22
5.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	22
5.4	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	23
5.4.1	Descida testicular e diferenciação da morfologia da glândula do pênis.....	23
5.4.2	Concentração espermática e morfologia do gameta.....	24
5.4.2.1	<i>Coleta do líquido epididimário.....</i>	24
5.4.2.2	<i>Avaliação da concentração espermática.....</i>	25
5.4.2.3	<i>Avaliação da morfologia espermática.....</i>	25
5.4.3	Peso dos órgãos.....	25
5.4.4	Análise histomorfométrica dos testículos e epidídimo.....	26
5.4.4.1	<i>Proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares....</i>	26
5.4.4.2	<i>Diâmetro e altura do epitélio do túbulo seminífero.....</i>	27
5.4.4.3	<i>Altura do epitélio do ducto epididimário.....</i>	28
5.4.5	Concentração sérica de testosterona.....	28
5.5	Análise Estatística.....	28
7	RESULTADOS.....	30
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
9	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36
	APÊNDICE A.....	47

APÊNDICE B	48
APÊNDICE C	49
APÊNDICE D	50
APÊNDICE E	52
ANEXO 1	54
ANEXO 2	55

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um animal, desde a fecundação até o período neonatal, é um processo de alto risco, dada a variedade de fatores endógenos e exógenos que podem alterar reduzir ou impedir o desenvolvimento total ou parcial do indivíduo. Alguns órgãos só completam sua diferenciação na fase pós-natal como o cérebro e os órgãos sexuais. A exposição de animais *in utero* a agentes químicos durante períodos críticos de desenvolvimento torna-os mais vulneráveis às ações dessas substâncias, devido à menor capacidade metabólica e excretora e a ausência de mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino (ZENICK; KLEGG, 1989).

Dentre os agentes químicos, os medicamentos são grandes fatores de risco para o desenvolvimento embrionário e fetal e sua comercialização envolve estudos visando avaliar seus efeitos tóxicos gerais e específicos – entre estes últimos – os efeitos mutagênicos, carcinogênicos, toxicidade reprodutiva, embriofetotóxicos e desenvolvimento pós-natal, incluindo, em alguns casos, o estudo da capacidade reprodutiva dos animais F1 (EPA, 1996; ICH, 2005).

A incidência de anomalias no sistema reprodutor masculino vem aumentando e acredita-se que estejam relacionadas a perturbações induzidas por disruptores endócrinos (DEs) sobre o desenvolvimento fetal e gonadal (JOENSEN et al., 2008; DIVALL, 2013). Muitos poluentes ambientais, como defensivos agrícolas, derivados do plástico e fitoestrógenos naturais vem agindo como DEs e alguns autores descreveram sua presença no líquido amniótico, cordão umbilical, leite materno e sêmen (WARING et al., 2008; JEFFERSON; WILLIAMS, 2011; JONES et al., 2014).

Dentre os DEs, aqueles que apresentam atividade estrogênica têm sido responsáveis por muitos efeitos adversos sobre o sistema reprodutor masculino (PFLIEGER-BRUSS; SCHUPPE; SCHILL, 2004; VIDAEFF; SEVER, 2005; WOODRUFF et al., 2008; SHARPE, 2010). Os fitoestrógenos são moléculas polifenólicas com ação estrogênica, cujo mecanismo de ação se deve à sua capacidade de se ligar a receptores de estrogênio (REs), devido à semelhança estrutural com o estradiol (E2 ou 17 β -estradiol) (ZHAO; MU, 2011).

Os fitoestrógenos estão presentes em muitos fitoterápicos e tendem a desregular o sistema endócrino ao mimetizarem a ação do estrogênio endógeno e alterar a fisiologia reprodutiva (WARING et al., 2008; PATISAUL; ADEWALE, 2009).

Um dos fitoterápicos mundialmente utilizado é o extrato de *Ginkgo biloba* L. (EGb), que é comercializado nas formas de folhas secas, extratos em pó e tinturas e usado tradicionalmente na China há milênios (DIAMOND et al., 2000; MAR; BENT, 1999). Seu extrato padrão (EGb 761) possui 24% de fitoestrógenos em sua composição, sendo os principais o kaempferol, quercetina e isorhamnetina (OH; CHUNG, 2004). O extrato possui atividade estrogênica, porém também exibe atividade antiestrogênica, dependendo da concentração E2 e de EGb no receptor de estrogênio, e por reduzir os níveis de E2, estimulando seu catabolismo e inibindo sua síntese (OH; CHUNG, 2006).

Pouco se sabe sobre seus efeitos durante a gestação e o conhecimento sobre o uso de fitoterápicos durante a gravidez é importante visto que, evidências sugerem que mulheres gestantes, preocupadas com efeitos de medicamentos alopático, substituem-nos por fitoterápicos, por serem considerados naturais (LOUIK et al., 2010).

Considerando a possibilidade de uso do EGb durante a gestação e de seu efeito sobre o sistema reprodutor masculino, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do extrato aquoso de *Ginkgo biloba*, sobre o testículo e epidídimo de ratos Wistar, após exposição materna no período da fetogênese.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Ginkgo biloba*

O extrato de *G. biloba* é composto por cerca de 300 compostos químicos extraídos das folhas das árvores. O extrato padrão 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; MONTORO, 2002; SMITH; LUO, 2004; OH; CHUNG, 2004).

Tal extrato tem sido utilizado há séculos na Ásia e Europa para variadas desordens (CLARK et al., 2001), e há relatos de que ele é um dos fitoterápicos mais utilizados mundialmente (MAR; BENT, 1999; SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003; STROMGAARD, NAKANISHI, 2004; DEKOSKY et al., 2008). O principal motivo para a grande disseminação do EGb é o seu possível efeito na prevenção da demência e disfunção cognitiva (WEINMANN et al., 2010).

Além de possuir funções neuroprotetoras, antioxidantes e antiinflamatórias, o EGb também atua no relaxamento do endotélio e é um estabilizador de membranas, sendo portanto muito utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, demência e melhoria de memória (MAR; BENT, 1999; SIERPINA et al., 2003). A capacidade de inibir a agregação plaquetária (CUPP; PHARM., 1999) e de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (SUN et al, 2007) também contribuem para que este fitoterápico seja comercializado para melhoria da agilidade mental e do fluxo sanguíneo (ROSENBLATT; MINDEL, 1997). Outro efeito biológico exercido pelo EGb é a inibição reversiva da monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B), que pode ser responsável pelos efeitos anti-estresse e ansiolíticos deste fitoterápico (WHITE; SCATES; COOPER, 1996). O principal mecanismo de ação do EGb em benefício da prevenção da demência é sua ação antioxidante, sendo observadas outras vias importantes, como o seu efeito anti-agregação de peptídeos β -amilóides (STROMGAARD; NAKANISHI, 2004; DEKOSKY et al., 2008), impedindo ou diminuindo a formação de placas senis características da doença de Alzheimer (HARDY; SELKOE, 2002), e a modulação da expressão de genes possivelmente envolvidos com esta doença (STROMGAARD; NAKANISHI, 2004).

Popularmente, o EGb é utilizado como indutor do parto, entretanto, devido ao efeito inibidor sobre o fator de ativação plaquetária, o seu uso concomitante com agentes e ervas de efeito anticoagulante deve ser evitado (SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL,

2003; WHO, 1999). Dugoua e colaboradores (2006) não recomendam o uso próximo ao parto, por aumentar o tempo de sangramento.

O EGb é amplamente utilizado na terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa (GOLD et al., 2007). Entretanto, há poucos estudos que relatem outros usos do extrato na reprodução e na gestação. O EGb administrado em ratas prenhes (doses: 3,5; 7 e 14 mg/Kg/dia) no período de pré-implantação e implantação (1^o - 8^o dia de gestação), não determinou toxicidade materna, morte embrionária, retardo no crescimento e malformações (FERNANDES et al., 2010). Porém, foi observado retardo no crescimento intrauterino dos filhotes cujas mães foram tratadas com as mesmas doses no período de pós-implantação (8^o - 20^o dia de gestação) (PINTO et al., 2007).

Chan (2005) demonstrou que o tratamento de blastocistos de camundongo com ginkgolídeo induz apoptose, diminui o número de células, retarda o desenvolvimento pós-implantação do blastocisto e aumenta o número de morte de blastocistos precoces.

Shiao; Chan (2009) estudaram a maturação de oócitos de camundongos, a fertilização e o desenvolvimento embrionário posterior, em oócitos obtidos de fêmeas controles e tratadas, com EGb. Os oócitos de ambas fêmeas foram coletados, cultivados e fertilizados “in vitro”. Encontraram redução significativa de taxa de maturação do oócito, de fertilização e de desenvolvimento embrionário, aumento de reabsorções embrionárias, redução do peso das placentas e de fetos. Em contraposição a estes dados, não foram encontradas toxicidade maternal, mortes embrionárias, retardo de crescimento ou malformações fetais em ratas Wistar tratadas com EGb durante o período de trânsito tubário e período de implantação (FERNANDES et al., 2010).

A toxicidade do desenvolvimento foi testada em ratos e camundongos. Nesta última espécie, o EGb, ministrado por gavagem do dia 6-15 de prenhez não causou alterações na incidência de malformações, variações ou retardo no desenvolvimento dos fetos (KOCH; NÖLDNERA; LEUSCHNER, 2013).

Foi demonstrado que uma dose de EGb de 50mg/kg possui efeito protetor frente a lesão isquêmica com posterior reperfusão em ratos que sofreram torção testicular através de um processo cirúrgico, diminuindo o índice de apoptose das células germinativas, a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e melhorando a ultraestrutura das células do tecido testicular (KANTER, 2011). O EGb também apresentou efeito protetor

contra a apoptose nas células germinativas de ratos que sofreram torção testicular (AKGÜL et al., 2009).

Yeh e colaboradores (2008) observaram aumento na frequência ejaculatória e conseqüentemente na atividade copulatória de ratos tratados com 50mg/kg do EGb. Além disso, não foi observada nenhuma alteração no peso dos órgãos reprodutores, na contagem de espermatozoides e nos níveis séricos de testosterona em nenhuma das doses utilizadas (10-50-100 mg/kg). Porém, neste estudo foi constatado aumento nos níveis de testosterona produzidos pelas células de Leydig em cultura, incubadas com 1000µg/ml de EGb. Os níveis de dopamina aumentaram e os de prolactina diminuíram em todos os animais tratados, o que indica possíveis vias da ação do EGb como facilitador no comportamento sexual dos machos. Foi confirmado posteriormente que um dos mecanismos de ação do *G. biloba* na ereção masculina é o aumento de dopamina no núcleo leito da estria terminal e na área pré-óptica medial (YEH et al., 2010). Por ser um facilitador da ereção e ejaculação, o EGb vem sendo utilizado para melhoria da disfunção erétil de homens que utilizam antidepressivos (MACKAY, 2004).

Por outro lado, Al-Yahya e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento de camundongos machos com o EGb (25-50-100 mg/kg) provocou alterações significativas no peso da cauda do epidídimo e da próstata, diminuição da taxa de gravidez e aumento da taxa de perda de pré-implantação após acasalamento, porém a concentração, a motilidade e a morfologia dos espermatozoides não foram alteradas.

Outro estudo realizado por Taepongsorat e colaboradores (2008) com ratos adultos, demonstrou efeitos contraditórios evidenciando 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.

Kostelac, Rechkemmer e Briviba (2003) relataram que fitoestrógenos flavonólicos possuem capacidade de se ligarem aos receptores estrogênicos α (RE- α) e receptores estrogênicos β (RE- β), podendo atuar em diversos tecidos em que esses receptores estão localizados e, segundo KUIPER e colaboradores (1998), os fitoestrógenos são o subtipo de xenoestrógenos mais potentes conhecidos e possuem maior afinidade de ligação aos RE- β .

O EGb também atua nos REs, através da ação da quercetina, isorhamnetina e kaempferol, seus principais componentes, mostrando maior afinidade pelo RE- β , em relação

ao RE- α , o que pode denotar tanto propriedades estrogênicas quanto anti-estrogênicas do EGb, de acordo com o órgão-alvo (OH; CHUNG, 2004). Em outro estudo, OH e CHUNG (2006) mostraram que a atividade estrogênica do *G. biloba* depende também de sua concentração. Doses mais altas inibiram a proliferação celular (500 μ g/ml) e a indução da expressão do gene pS2 (100-500 μ g/ml) promovida pelo 17 β -estradiol.

O EGb administrado em doses elevadas induziu a diminuição da penetração de espermatozoides na zona pelúcida de ovócitos de hamsters (ONDRIZEK et al., 1999a) e inibiu a motilidade de espermatozoides humanos (ONDRIZEK et al., 1999b). KHANDUJA, VERMA e BHARDWAJ (2001) verificaram que a quercetina promoveu diminuição de motilidade e vitalidade de espermatozoides humanos.

Do exposto, compreende-se que as informações sobre o EGb na reprodução são, em alguns casos contraditórias, mas existem evidências suficientes para demonstrar que mulheres e homens fazem uso do fitoterápico e que seus efeitos sobre a reprodução parecem ser modulados via receptores estrogênicos α e β . Entretanto, não foram encontradas na literatura, estudos do efeito do EGb, sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino em crias de mães tratadas com o extrato em períodos críticos do desenvolvimento deste sistema.

2.2 ESTROGÊNIO E O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O estrogênio desempenha papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da função reprodutiva do sexo masculino e da fertilidade (HESS et al., 2011). A Ação do estrógeno é mediada através de receptores estrogênicos, que apresentam duas isoformas (RE α e RE β), pertencentes à família dos receptores nucleares que constituem uma superfamília de fatores de transcrição regulados pela interação com hormônios (STANISIC; LONARD; O'MALLEY, 2010). A diferença entre esses receptores é que o RE α possui o fator ativador de transcrição 1 (ATF-1), que é ligante dependente, e o fator ativador de transcrição 2 (ATF-2), que é hormônio dependente, enquanto que o RE β só possui o ATF-2 (HESS et al., 2011).

Pelo fato do estrogênio, por muito tempo, ser considerado um hormônio exclusivamente feminino, acreditava-se que os estrogênios exógenos apresentavam efeito prejudicial ao crescimento testicular. Através da identificação de RE α e RE β no sistema reprodutor masculino e a elucidação da função da enzima aromatase, que promove a conversão irreversível da testosterona em estrogênio, pôde-se compreender o papel deste hormônio no desenvolvimento fetal e neonatal dos testículos (HABERT et al., 2006; HESS, 2003).

No testículo maduro, o estrogênio é sintetizado pela aromatase presente nas células de Leydig e pelas células germinativas e possui a função de regular a reabsorção dos fluidos nos ductos eferentes e no epidídimo, através da absorção iônica e de água, promovendo a concentração de espermatozoides (JOSEPH; SHUR; HESS, 2011; HESS, 2003). Receptores de estrogênio estão presentes no testículo, epidídimo e no epitélio dos ductos eferentes da maioria das espécies, sendo a sua expressão abundante e onde sua principal função é regular a expressão de proteínas envolvidas na reabsorção dos fluidos. No entanto, o RE α não é encontrado nos testículos de algumas espécies, incluindo o homem (HESS, 2003).

O estudo de camundongos machos knockout para receptores de estrógeno (RE α KO ou RE β KO) ou aromatase (ArKO) mostraram que a ausência de estrógenos ou algumas das suas vias de sinalização também conduz à perturbações da capacidade reprodutiva (CARREAU, 2000). Camundongos machos RE α KO e ArKO são inférteis na idade adulta, devido à falha na reabsorção do fluido no epidídimo em RE α KO, resultando em diluição do esperma na cauda do epidídimo, e espermatogênese anormal em ArKO, evidenciando a importância do estrogênio para as funções reprodutoras masculinas em adultos (HABERT et al., 2006).

Habert e colaboradores (2006) estudaram o desenvolvimento de testículos fetais e neonatais em camundongos RE α KO e RE β KO e relataram que a anulação de RE β provocou

aumento na atividade mitótica e diminuição da atividade apoptótica, sem alterar o número de células de Sertoli, não possuindo, portanto, efeito sobre a esteroidogênese testicular. No entanto, a inativação de RE α não alterou o número de células germinativas, mas aumentou a produção de testosterona dois dias após a diferenciação das primeiras células de Leydig.

Hamilton; Arao; Korach (2014) demonstraram que camundongos RE α KO e RE α β KO apresentaram desenvolvimento do sistema reprodutor normal, porém, houve redução da motilidade espermática, infertilidade e a organização da estrutura testicular dismórfica. Entretanto, os camundongos RE β KO apresentaram normalidade para todos esses parâmetros analisados.

Delbès; Levacher; Habert (2006) demonstraram que a deficiência de estrogênio tem efeitos positivos durante o desenvolvimento fetal, permitindo aumento do número de células germinativas e atividade esteroidogênica, enquanto sua ausência em adultos apresenta efeitos negativos no desenvolvimento das funções do sistema reprodutor masculino.

Tal estudo é importante porque a fetogênese é um período de desenvolvimento sensível e crítico para o sistema reprodutor masculino, onde os testículos começam a realizar gametogênese e esteroidogênese (DELBÈS; LEVACHER; HABERT, 2006; JONES et al., 2014). Os gonócitos proliferam até o 17º dia de prenhes em ratos, permanecendo quiescentes até 3º DPN (DELBÈS; LEVACHER; HABERT, 2006). A partir do 16º dia de prenhes os gonócitos começam a apresentar os receptores ER β (SAUNDERS et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que o estrogênio tem efeitos sobre células germinativas e atividade esteroidogênica do testículo fetal (DELBÈS; LEVACHER; HABERT, 2006).

Considerando que o EGb possui atividade estrogênica ou antiestrogênica, dependendo da concentração de E2 e de EGb no receptor de estrogênio (OH; CHUNG, 2006) e que mulheres grávidas podem fazer uso do EGb é importante verificar se a sua exposição ao fitoterápico no período de fetogênese pode interferir com o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino do feto.

3. HIPÓTESE

Ratos Wistar, machos F1, descendentes de mães expostas ao *G. biloba* durante o período de fetogênese, apresentam alterações do sistema reprodutor.

4.OBJETIVOS

4.1 GERAL:

Avaliar o efeito do extrato de *G. biloba* sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar cujas mães foram expostas durante o período da fetogênese.

4.2 ESPECÍFICOS:

- Verificar a toxicidade materna do EGb.
- Avaliar, em ratos machos F1, oriundos de mães expostas ao EGb:
 - Desenvolvimento físico da ninhada;
 - Mortes e canibalismo;
 - O peso dos testículos, epidídimo, vesícula seminal vazia, fígado, baço, rins e hipófise;
 - A descida testicular;
 - A morfologia da glândula do pênis;
 - A organização histomorfométrica testicular e epididimária;
 - A concentração e morfologia dos espermatozoides epididimários;
 - A concentração sérica de testosterona;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 EXTRATO DE *Ginkgo biloba*

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

5.2 ANIMAIS

Para a realização deste experimento, foram utilizadas 40 ratas Wistar prenhes (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769), com 90 dias de idade e 80 ratos Wistar machos, filhotes destas fêmeas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF) – CIAEP 01.0048.2013.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm), forradas com maravalha não esterilizada, dotadas de cocho para ração do tipo peletizada NUVILAB CR1[®] (Nuvital Nutrientes Ltda., Colombo/PR) e local para bebedouro com água filtrada. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados ALESCO[®] com fluxo de ar controlado, localizados em salas com temperatura de 22±2° C e controle de luminosidade, respeitando o ritmo circadiano dos animais (ciclo de claro/escuro de 12 horas). Os animais foram alojados na proporção de uma fêmea prenhe por gaiola. Após o desmame dos filhotes destas fêmeas, os mesmos foram remanejados de forma que ficaram alojados na proporção de quatro animais/gaiola, todos pertencentes ao mesmo grupo experimental.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela CEUA/UFJF nº 81/2012 (ANEXO 1).

5.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Fêmeas prenhes foram distribuídas em quatro grupos experimentais, com 10 animais por grupo: Controle (C) e expostas ao EGb (T.EGb). O grupo C recebeu 1 ml de água destilada, o grupo T.EGb 25 recebeu 25 mg/kg do EGb, o grupo T.EGb 50 recebeu 50 mg/kg do EGb e o grupo T.EGb 100 recebeu 100 mg/kg do EGb, via intragástrica. A menor dose corresponde à dose terapêutica diária para humanos, convertida para ratos (FDA, 2005;

REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007). As doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg correspondem, respectivamente, ao dobro e quatro vezes a dose inicial, preconizado pelo guideline de estudos toxicológicos (OECD, 1995). O primeiro dia de gestação foi determinado através da visualização de espermatozoides na secreção vaginal, obtida pela técnica de esfregaço vaginal. O tratamento das ratas prenhes foi realizado diariamente no período de fetogênese (16^o ao 20^o dias de gestação).

As mães, foram avaliadas quanto à massa corporal e o consumo de ração diário em (g) (APÊNDICE A), obtido pela diferença entre uma quantidade pré estabelecida colocada no cocho e o que restou 24 horas após o seu fornecimento, durante a gestação (HOFFMAN; NESS; VAN LIER, 2002).

Após o tratamento diário, as ratas foram observadas durante uma hora quanto a possíveis sinais clínicos de toxicidade aguda, como alterações da atividade locomotora e comportamentais, perda ou ganho de peso, piloereção, diarreia, cromodaciorrêia. Estereotípias e mortes também foram monitorados (OECD, 2009).

A data do parto foi considerada primeiro dia pós- natal (DPN). Após 72 horas do nascimento, as ninhadas foram reduzidas a quatro crias por mãe, sendo dois machos e duas fêmeas. Aos 25 dias, os filhotes foram desmamados. Ao longo desse período, as ninhadas foram pesadas, separadamente por sexo, aos 4, 10, 15 e 20 dias (APÊNDICE B).

Após o desmame, os filhotes machos foram mantidos com dieta padrão até o dia da eutanásia. Ao longo deste período, acompanhou-se o peso destes animais a cada cinco dias (APÊNDICE C), a descida testicular e a diferenciação da morfologia da glândula do pênis. Aos 65 dias de idade Os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg) via intraperitoneal (WOLFENSOHN; LLOYD, 1994). Sob anestesia geral, foi coletado sangue por punção cardíaca, e, logo após, os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

5.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

5.4.1. Descida testicular e diferenciação da morfologia da glândula do pênis

Aos 15 DPN, os animais começaram a ser acompanhados diariamente para observação do dia da descida testicular até que a mesma se completasse.

Figura 1: Descida testicular completa em Ratos Wistar



Fonte: Arquivo Pessoal

Aos 25 DPN, iniciou-se o acompanhamento da diferenciação da morfologia da glândula do pênis. Foi registrado o dia de aparecimento das fases dessa diferenciação que ocorrem em três momentos: Fase A, momento em que a glândula apresentou-se em forma de “U”; fase B, quando a glândula do pênis adquiriu formato de “W”; e fase C, que correspondeu à forma tubular da superfície do pênis (YAMASAKI et al., 2001).

Figura 2: Fase A da diferenciação da morfologia da glândula do pênis de Ratos Wistar



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 3: Fase B da diferenciação da morfologia da glândula do pênis de Ratos Wistar



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 4: Fase C da diferenciação da morfologia da glândula do pênis de Ratos Wistar



Fonte: Arquivo Pessoal

5.4.2 Concentração espermática e morfologia do gameta

5.4.2.1 Coleta do líquido epididimário

Duas amostras do líquido epididimário foram coletadas através de uma incisão na cauda do epidídimo direito dos animais (SEED et al., 1996). Cada alíquota foi colocada em placa de Petri contendo 50 μ L de PBS a 37° C, onde permaneceram até ocorrer sua completa homogeneização. Uma amostra foi utilizada para a avaliação da concentração espermática e a outra para a avaliação da morfologia espermática.

5.4.2.2 Avaliação da concentração espermática

Após a homogeneização da amostra do líquido epididimário em PBS, foram retirados 20 µL desta, e colocados em 6 mL de água destilada para a imobilização dos espermatozoides. A solução final foi utilizada para contagem dos espermatozoides através da câmara de Neubauer em microscópio óptico da marca Olympus® em aumento de 100x. Foram contados os espermatozoides completos (com cabeça e cauda), decapitados e os anormais (cabeça e cauda com menores dimensões). Quando os espermatozoides se encontravam na linha de divisão entre os quadrantes, foram contados aqueles que apresentavam cabeça inserida no interior do quadrante. Para maior acurácia, o teste foi realizado em duplicata, para isso foram contados os quatro quadrantes laterais de 1mm² dos dois lados do hemocitómetro, e ao valor médio encontrado foi aplicada a fórmula:

Concentração de espermatozoides (sptz/mL) = Média obtida x 300 x 10⁴

5.4.2.3 Avaliação da morfologia espermática

A avaliação foi realizada através da diluição de uma alíquota de 20 µL do homogeneizado em 0,5 mL de PBS, de onde foram retiradas amostras, 20 µL cada, para dois esfregaços em lâminas de vidro. Após a secagem das lâminas, elas foram fixadas em mistura de álcool absoluto e éter dietílico 50% v/v e coradas com corante de Shorr (Técnica utilizada no Laboratório de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP) para análise da morfologia espermática, sob microscópio óptico, em aumento de 1000x, utilizando óleo de imersão. Foram analisados 200 espermatozoides de cada esfregaço, totalizando 400 espermatozoides por animal (considerou-se o valor médio dos resultados de cada esfregaço). Os espermatozoides foram classificados como normais (íntegros) ou anormais (que incluem cabeça amorfa: perda da forma de foice, característica dos espermatozoides de ratos; defeitos de cauda: enrolada ou quebrada e defeitos de peça intermediária), de acordo com os critérios utilizados por Seed e colaboradores (1996), e Perreault e Cancel (2001).

5.4.3 Peso dos órgãos

Após a coleta dos espermatozoides, foi realizada laparotomia para retirada dos testículos, epidídimo esquerdo, vesícula seminal (vazia), rins, fígado, baço e hipófise. Todos os órgãos foram pesados em balança de precisão modelo AV313CP (Ohaus®, Brasil).

5.4.4 Análise histomorfométrica dos testículos e epidídimo

O testículo esquerdo foi fixado por imersão em Bouin durante 24 horas. Durante a fixação, foram realizadas secções, retirando-se cerca de 3 mm de suas extremidades, em sentido transversal com auxílio de lâmina afiada, 3, 6, 9, 12 e 24 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 para solução de álcool 70% até o processamento histológico. O epidídimo esquerdo foi fixado inteiro em fixador de Bouin por 24 horas, sofrendo uma única clivagem no centro do corpo do órgão ao final da fixação e transferido em sequencia para solução de álcool 70% até o processamento histológico.

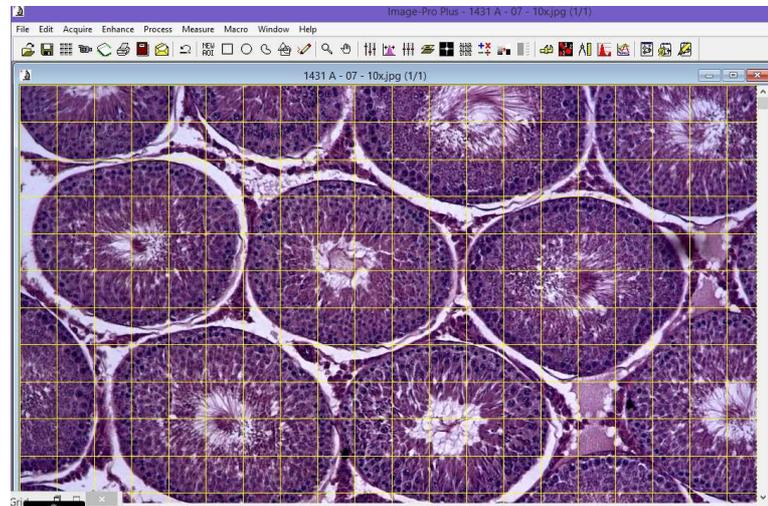
Os testículos e o epidídimo esquerdo foram submetidos à microtomia no sentido transversal e longitudinal, respectivamente, em micrótomo de rotação Microm®, obtendo-se cortes com espessura de 5 µm, mantendo-se a distância de cinco cortes (25 µm) entre os destinados para avaliação histomorfométrica.

Os cortes de testículos foram corados com Hematoxilina e Eosina, e posteriormente, foram examinados os túbulos seminíferos para determinação da proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular; diâmetro tubular, e altura do epitélio do túbulo seminífero. Também foi determinada a altura do epitélio ducto epididimário em cortes corados pelo Tricômico de Gomori.

5.4.3.4 Proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares

Para a avaliação de proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares foram contados 2660 pontos, utilizando uma grade padronizada de 266 pontos com o programa Image Pro plus® (EUA), aplicada sobre capturas histológicas feitas em câmara AxioCam da marca Zeiss, acoplada ao microscópio Primo Star da marca Zeiss. Cada ponto foi analisado como pertencente ao compartimento tubular ou intertubular. Artefatos foram contados à parte. A proporção dos compartimentos, tubulares e intertubulares, foi determinada pela média dos pontos:

Figura 5: Determinação de proporção volumétrica dos compartimentos testiculares tubular e intertubular através do Programa Image Pro Plus®. Aplicação de uma grade ortogonal padronizada de 266 pontos sobre as fotomicrografias para determinação da proporção volumétrica dos compartimentos: T – Compartimento testicular tubular; I – Compartimento testicular intertubular.

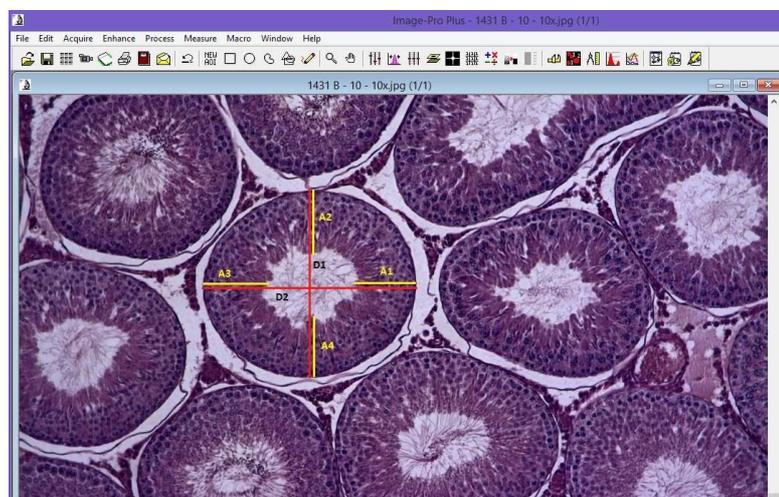


Fonte: Arquivo Pessoal

5.4.4.2 Diâmetro e altura do epitélio túbulo seminífero

Vinte secções transversais dos túbulos seminíferos mais circulares possíveis por animal foram fotografadas com a lente objetiva de 10x. Determinou-se o diâmetro maior e o diâmetro menor de cada túbulo, passando pelo centro do mesmo. Paralelamente à medida do diâmetro tubular, foram realizadas quatro medidas da altura do epitélio seminífero, tomadas em posições opostas. Considerou-se o valor médio dessas medidas.

Figura 6: Determinação de diâmetro e altura do epitélio do túbulo seminífero em corte histológico de testículo de rato Wistar. D1 e D2 – medidas do diâmetro tubular; A1, A2, A3 e A4 – medidas da altura do epitélio seminífero. Coloração de

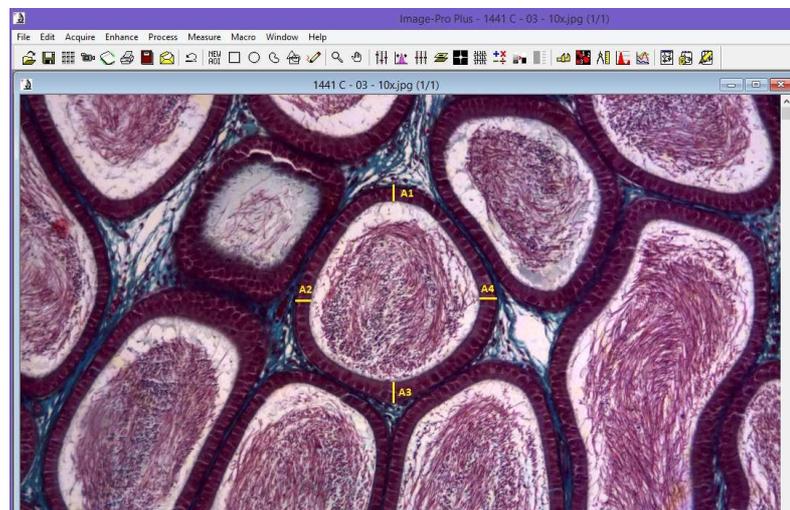


Fonte: Arquivo Pessoal

5.4.4.3 Altura do epitélio do ducto epididimário

Vinte secções transversais dos ductos epididimários mais circulares possíveis por animal, dos segmentos cabeça, corpo e cauda do epidídimo, foram fotografadas com a lente objetiva de 10x. Traçaram-se duas linhas perpendiculares imaginárias, passando pelo centro do ducto. Paralelamente a essas linhas, foram realizadas quatro medidas da altura do epitélio do ducto epididimário, tomadas em posições opostas. Considerou-se o valor médio dessas medidas.

Figura 7: Determinação da altura do epitélio do ducto epididimário em corte histológico de epidídimo de rato Wistar. A1, A2, A3 e A4 – medidas da altura do ducto epididimário. Coloração Tricrômico de Gomori, espessura de 5 µm.



Fonte: Arquivo Pessoal

5.4.5 Concentração sérica de testosterona

O sangue coletado no procedimento da eutanásia foi centrifugado (centrífuga automática refrigerada RC-3, marca Sorval[®], a 3500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos), o soro sanguíneo foi aliquotado e armazenado em temperatura de -80° C. Posteriormente, procedeu-se a dosagem sérica da testosterona através do imunoenensaio ELISA, utilizando o aparelho de leitor de microplacas da marca ASYS HITECH GMBH e utilizado kit de ELISA por competição da marca Cayman Chemicals[®].

5.5 Análise Estatística

Amostras com dados homocedásticos e distribuição normal foram analisados por análise de variância – uma via ($\alpha=0.05$) seguido de teste post hoc de Dunnett. Os dados de medida do diâmetro testicular foram transformados em Log de base 10 para homogeneização.

Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Monte Carlo. Valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Para comparações múltiplas com o teste de Monte Carlo foi adotado significância de $\alpha = 0.01$.

A análise estatística foi realizada no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences®- EUA), versão 13.0.

6. RESULTADOS

1- Artigo, submetido ao periódico “Reproductive Toxicology” (Apêndice D)

Elsevier Editorial System(tm) for Reproductive Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Increase in the number of abnormal sperm in f1 male wistar rats treated with Ginkgo biloba extract in fetogenesis period.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Ginkgo biloba; sperm abnormality; fetogenesis; estrogen receptor; rat.

Corresponding Author: Ms. Jessica Corrêa Bezerra, Expert

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Juiz de Fora

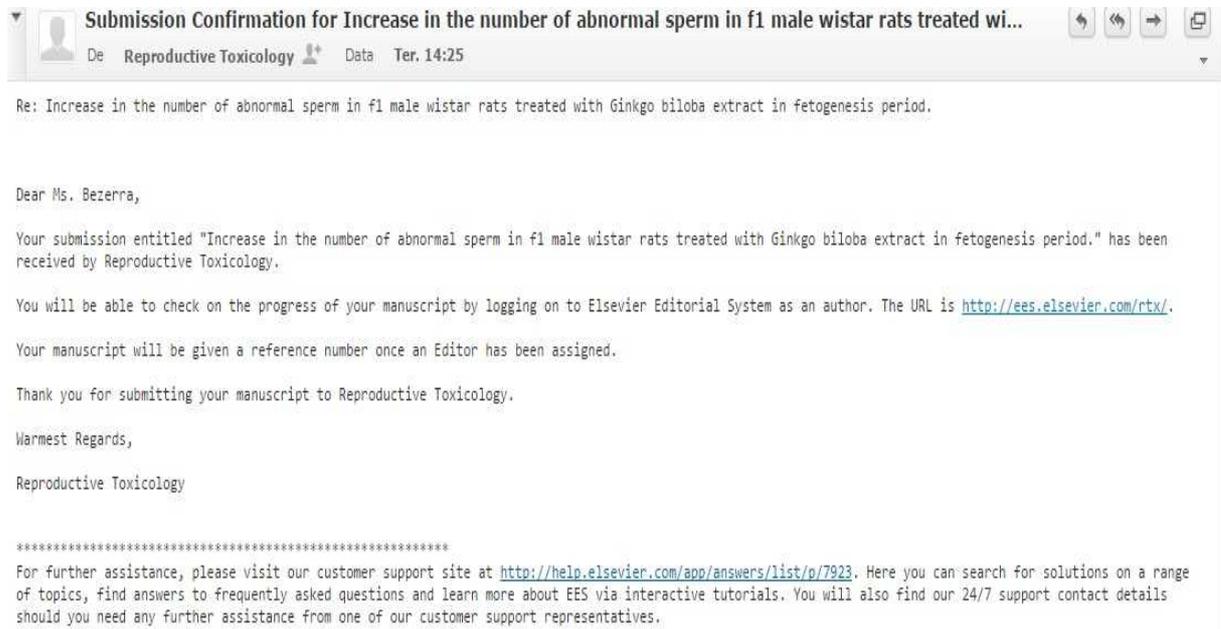
First Author: Jessica Corrêa Bezerra, Expert

Order of Authors: Jessica Corrêa Bezerra, Expert; Emília S Rocha, graduation student; José Reinaldo V Teixeira, graduate; Pedro M Bellei, master; João Evangelista P Reis, Doctoral; Vera M Peters, Doctoral; Martha O Guerra, Doctoral

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Incidence of endocrine disruptors on the gonadal development is the cause of many anomalies of the male reproductive system (MRS). Ginkgo biloba is an endocrine disruptor, which has affinity for β estrogen receptors, important in the development of MRS. This study evaluated the effects of Ginkgo biloba, after maternal exposure, on the reproductive parameters of F1 males. Pregnant Wistar rats received 25, 50 or 100 mg/kg/day of Ginkgo biloba, intragastrically, from the 16th to 20th day of pregnancy. The testicular descent, morphology of the glans penis, sperm concentration, organ weights, seric concentrations of testosterone, and the structural organization of testicular and epididymal tissues remained unchanged. However, there was an increase of abnormal sperm in all treated groups with Ginkgo. These results indicate that Ginkgo doesn't promote the maternal toxicity and does not alter the fetal and postnatal developments and age of puberty onset, but induces the increase of sperm abnormalities.

- E-mail de confirmação de submissão



- Folha de Rosto do Artigo

1 Increase in the number of abnormal sperm in F1 male wistar rats treated
 2 with *Ginkgo biloba* extract in fetogenesis period.
 3
 4 Jessica Corrêa Bezerra^a*, Emília Raquel da Silva Rocha^a, José Reinaldo
 5 Paranaíba Vilela Alves Teixeira^a, Pedro Martins Bellei^a, João Evangelista de
 6 Paula Reis^a, Vera Maria Peters^a, Marinha de Oliveira Guerra^a.
 7
 8 ^a - Centro de Biologia da Reprodução, Federal University of Juiz de Fora, José Lourenço
 9 Kalmer Street, University Campus, São Pedro - Zip Code: 36036-900 Juiz de Fora, MG,
 10 Brazil.
 11
 12 *Corresponding author at: Centro de Biologia da Reprodução, Federal
 13 University of Juiz de Fora, José Lourenço Kalmer Street, University Campus,
 14 São Pedro - Zip Code: 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel: +55 32
 15 21023251 Fax: +55 32 21023255
 16 E-mail address: jessica.correa@ufjf.edu.br
 17
 18
 19 **Abstract**
 20
 21 Incidence of endocrine disruptors on the gonadal development is the cause of
 22 many anomalies of the male reproductive system (MRS). *Ginkgo biloba* is an
 23 endocrine disruptor, which has affinity for β estrogen receptors, important in the
 24 development of MRS. This study evaluated the effects of *Ginkgo biloba*, after
 25 maternal exposure, on the reproductive parameters of F1 males. Pregnant
 26 Wistar rats received 25, 50 or 100 mg/kg/day of *Ginkgo biloba*, intragastrically,
 27 from the 16th to 20th day of pregnancy. The testicular descent, morphology of
 28 the glans penis, sperm concentration, organ weights, seric concentrations of
 29 testosterone, and the structural organization of testicular and epididymal tissues
 30 remained unchanged. However, there was an increase of abnormal sperm in all
 31 treated groups with *Ginkgo*. These results indicate that *Ginkgo* doesn't promote
 32 the maternal toxicity and does not alter the fetal and postnatal developments
 33 and age of puberty onset, but induces the increase of sperm abnormalities.

34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100

Keywords: *Ginkgo biloba*, sperm abnormality, fetogenesis, estrogen receptor, rat

2- Apresentação de trabalhos em congressos:

- “MORFOLOGIA DA GLANDE DO PÊNIS EM RELAÇÃO À PUBERDADE EM RATOS WISTAR (APÊNDICE E)

13º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório e 2º Encontro Latino Americano de Ciências em Animais de Laboratório, realizado nos dias 14 a 16 de Abril de 2014, no Centro de Eventos da PUCRS em Porto Alegre.

- “EFEITO DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTORES DE RATOS WISTAR ORIGINÁRIOS DE MÃES EXPOSTAS DURANTE O PERÍODO DA FETOGÊNESE (APÊNDICE F)

XXIX Reunião Anual da FeSBE, nos dias 27 a 30 de Agosto de 2014, no Centro de Convenções do Hotel Glória, na cidade de Caxambu/MG.

3- Premiação do trabalho de Iniciação Científica

- “AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS WISTAR MACHOS, APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA AO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* L. (ANEXO 2)

20º Seminário de Iniciação Científica da UFJF, dia 23 de Outubro de 2014

Trabalho de Iniciação Científica realizado pelos alunos de graduação Emilia Raquel da Serva Rocha e José Reinaldo Paranaíba Alves Vilela Teixeira, que recebeu a premiação principal, após apresentação no Seminário de Iniciação Científica da UFJF.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, esperava-se que a exposição de ratas Wistar ao EGb 761 durante a fetogênese, período crítico de desenvolvimento do sistema reprodutor, promovesse alterações sobre os testículos e epidídimo da geração F1, ou comprometesse suas funções.

Apesar do *Ginkgo biloba* ser um fitoestrógeno, que é considerado disruptor endócrino e, portanto, capaz de promover anomalias sobre o sistema reprodutor masculino, não foram observadas alterações dos parâmetros reprodutivos dos animais, com exceção da morfologia espermática. Foi observado aumento no número de espermatozoides anormais em todos os grupos tratados em comparação com o grupo controle. Apesar da concentração espermática não ter diferido entre os grupos tratados, uma possível infertilidade não pode ser descartada, visto que além do número aumentado de espermatozoides anormais detectados, não foram realizados testes de capacidade reprodutiva dos animais.

Quanto à estrutura do tecido testicular e epididimário, ambas se mantiveram sem alterações, demonstrando ausência de efeito do extrato sobre o desenvolvimento da morfologia das gônadas.

Além desses achados, a ausência de alterações no peso dos órgãos corrobora a falha na promoção de toxicologia sistêmica pelo extrato, entretanto, o mesmo deve ser usado com cautela por gestantes, visto que pode interferir em outras vias de ação e/ou outros períodos de desenvolvimento embrionário.

8 - CONCLUSÃO

A exposição das ratas Wistar ao EGb 761 durante a fetogênese, período crítico de desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, aparentemente não causa toxicidade materna, ou do desenvolvimento fetal, pós-natal. Não altera a data da puberdade, mas induz o aumento do número de espermatozoides anormais.

REFERÊNCIAS

AKGÜL, T.; KARAGÜZEL, E.; SÜRER, H.; YAGMURDUR, H.; AYYILDIZ, A.; ÜSTÜN, H.; GERMIYANOGLU, C. *Ginkgo biloba* (EGb 761) affects apoptosis and nitric-oxide synthases in testicular torsion: an experimental study. **International Urology and Nephrology**, v. 41, p. 531–536, 2009.

AL-YAHYA, A. A.; AL-MAJED, A. A.; AL-BEKKAIRE, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; QURESHI, S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 222-228, 2006.

CARREAU, S.; LEVALLET, J. Testicular estrogens and male reproduction. **Physiology**, v. 15, p. 195-198, 2000.

CHAN, W. H. Ginkgolides induce apoptosis and decrease cell numbers in mouse blastocysts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 1263-1267, 2005.

CLARK, W. M.; RINKER, L. G.; LESSOV, N. S.; LOWERY, S. L.; CIPOLLA, M.J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in Mice. **Journal of the American Heart Association**, v. 32, p. 1000-1004, 2001.

CUPP, M. J.; PHARM, D. Herbal remedies: adverse effects and drug interactions. **American Family Physician**, v. 1, n. 59, p. 1239-1244, 1999.

DEKOSKY, S. T., et al. *Ginkgo biloba* for prevention of dementia: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 300, p. 2253–2262, 2008.

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

DIAMOND, B. J.; SHIFLETT, S. C.; FEIWEL, N.; MATHEIS, R. J.; NOSKIN, O.; RICHARDS, J. A.; SCHOENBERGER, N. E. *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, p. 668-678, 2000.

DIVALL, A. S. The influence of endocrine disruptors on growth and development of children. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 20, p. 50-55, 2013.

DUGOUA, J. J; MILLS, E.; PERRI, D.; KOREN, G. Safety and efficacy of ginkgo (*Ginkgo biloba*) during pregnancy and lactation. **Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v. 13, p. 277-284, 2006.

EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment**. Federal Register 61, p. 1-126, 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/REPRO51.PDF>

FDA (Food and Drug Administration). Guidance for Industry: Estimating the maximum safe dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. **Pharmacology and Toxicology**, p. 1-27, 2005.

FERNANDES, E. S.; PINTO, R. M.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the embryo-fetal development in Wistar rats. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 89, p. 133–138, 2010.

GOLD, E. B.; BAIR, Y.; UTTS, J.; GREENDALE, G. A.; UPCHURCH, D.; CHYU, L.; STERNFELD, B.; ADLER, S. Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the study of women's health across the nation (SWAN). **Menopause**, v. 14, p. 612-623, 2007.

HABERT, R.; DELBES, G.; DUQUENNE, C.; LIVERA, G.; LEVACHER, C. Effects des estrogènes sur le développement du testicule pendant la vie foetale et néonatale. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, p. 970-977, 2006.

HAMILTON, K. J.; ARAO, Y.; KORACH, K. S. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. **Reproductive Biology**, v. 14, p. 3-8, 2014.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, p. 293-297, 2002.

HESS, R. A.; FERNANDES, S. A.; GOMES, G. R.; OLIVEIRA, C. A.; LAZARI, M. F.; PORTO, C. S. Estrogen and its receptors in review efferent ductules and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, p. 600-613, 2011.

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

HOFFMAN, W. P.; NESS, D. K.; VAN LIER, R. B. L. Analysis of rodent growth data in toxicology studies. **Toxicological Sciences**, v. 66, p. 313-319, 2002.

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.

JEFFERSON, W. N.; WILLIAMS, C. J. Circulation levels of genistein in the neonate, apart from dose and route, predict future adverse female reproductive outcomes. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 272-279, 2011.

JOENSEN, U. N.; JORGENSEN, N.; RAJPERT-DE METYS E; SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome and Leydig cell function. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 155-161, 2008.

JONES, S.; BOISVERT, A.; BUONG, T. B.; FRANCOIS, S.; THRANE, P.; CULTY, M. Disruption of rat testis development following combined in utero exposure to the phytoestrogen genistein and antiandrogenic plasticizer Di-(2-Ethylhexyl) phthalate. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 1-14, 2014.

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

KANTER, M. Protective effects of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia–reperfusion injury in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 91, p. 708–713, 2011.

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.

KOCH, E.; NOLDNER, M.; LEUSCHNER, J. Reproductive and developmental toxicity of the *Ginkgo biloba* special extract EGb 761® in mice. **Phytomedicine**, v. 21, p. 90-7, 2013.

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

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; SAAG, P. T. V. D.; BURG, B. V. D.; GUSTAFSSON, J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

LOUIK, C.; GARDINER, P.; KELLEY, K.; MITCHELL, A. A. Use of herbal treatments in pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 202, p. 1-10, 2010.

MACKAY, D. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. **Alternative Medicine Review**, v. 9, p. 4-16, 2004.

MAR, C.; BENT, S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. **West Journal of Medicine**, v. 171, p. 168-171, 1999.

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.

OECD. Test Guideline 421. **OECD Test Guideline for Testing of Chemicals**. Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 1995. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-421-reproduction-developmental-toxicity-screening-test_9789264070967-en> Acesso em: 07 jul. de 2013.

OECD. Test Guideline 452. **OECD Test Guideline for Testing of Chemicals. Chronic Toxicity Studies**, 2009. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_978926407120-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.

ONDRIZEK, R. R.; CHAN, F. J.; PATTON, W. C.; KING, A. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 517–522, 1999a.

ONDRIZEK, R. R.; CHAN, P. J.; PATTON, W. C.; KING, A. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, p. 87–91, 1999b.

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.

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; REIS, J. E. P.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. **Reproductive Toxicology**, p. 23, p. 480-485, 2007.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.

ROSENBLATT, M.; MINDEL, J. Spontaneous hyphema associated with ingestion of Ginkgo biloba extract. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1108, 1997.

SEED, J.; CHAPIN, R. E.; CLEEG, E. D.; DOSTAL, L. A.; FOOTE, R. H.; HURTT, M. E.; KLINEFELTER, G. R.; MAKKRIS, S. L.; PERREAULT, S. D.; SCHRADER, S.; SEYLER, D.; SPRANO, R.; TREINEN, K. A.; VEERAMACHANENI, D. N. R.; WISE, L. D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, p. 237-244, 1996.

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

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.

STANISIC, V.; LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W. Modulation of steroid hormone receptor activity. **Progress in Brain Research**, v. 181, p. 53–176, 2010.

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

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

TAEPOONGSORAT, L.; TANGPRAPRUTGUL, P.; KITANA, N.; MALAIVIJITNOND, S. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in male rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, p. 249-258, 2008.

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

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.

WARING, R. H.; AYERS, S.; GESCHER, A. J.; GLATT, H. R.; MEINL, W.; JARRAT, P.; KIRK, C. J.; PETTITT, T.; REA, D.; HARRIS, R. M. 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.

WEINMANN, S.; ROLL, S.; SCHWARZBACH, C.; VAUTH, C.; WILLICH, S.N. Effects of *Ginkgo biloba* in dementia: systematic review and meta-analysis. **BMC Geriatrics**, v. 10. p. 1-12, 2010.

WHITE, H. L.; SCATES, P. W.; COOPER, B. R. Extracts of *ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. **Life Sciences**, v. 58, p. 1315-1321, 1996.

WHO (World Health Organization). Folium Ginkgo. In: **WHO Monographs on Selected Medicinal Plants**. Geneva: World Health Organization, 1999. p. 154–167.

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

WOODRUFF, T. J.; CARLSON, A.; SCHWARTZ, J. M.; GIUDICE, L. C. Proceedings of the summit on environmental challenges to reproductive health and fertility: executive summary. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 281-300, 2008.

YAMASAKI, K.; SAWAKI, M.; NODA, S.; MUROI, T.; TAKATSUKI, M. Preputial separation and glans penis changes in normal growing Crj: CD (SD) IGS rats. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 533-536, 2001.

YEH, K. Y.; PU, H. F.; KAPHLE, K.; LIN, S. F.; WU, L. S.; LIN, J. H.; TSAI, Y. F. *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.; LIU, Y. Z.; TAI, M. Y.; TSAI, Y. F. *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, p. 585-590, 2010.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: a risk of assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 275 – 309.

ZHAO, E.; MU, Q. Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, p. 1–20, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Gráficos com resultados dos pesos e consumo diário de ração de fêmeas prenhes

Gráfico 1: Peso corporal (g) de fêmeas prenhes de ratas Wistar, tratadas via intragástrica com água destilada (C) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 25 (T.EGb 25), 50 (T.EGb 50) e 100 mg/Kg (T.EGb 100) do 16º ao 20º dias de gestação. $p > 0.05$

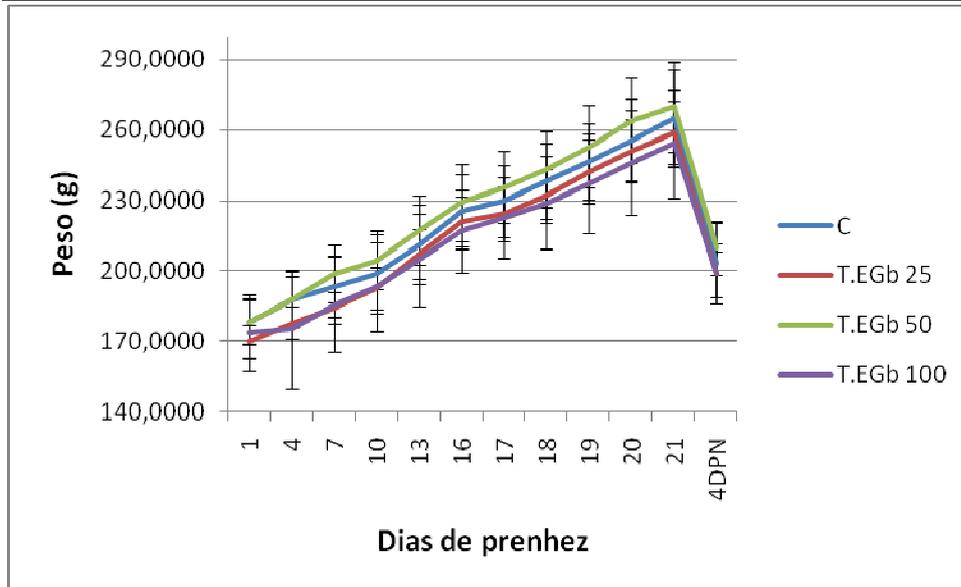
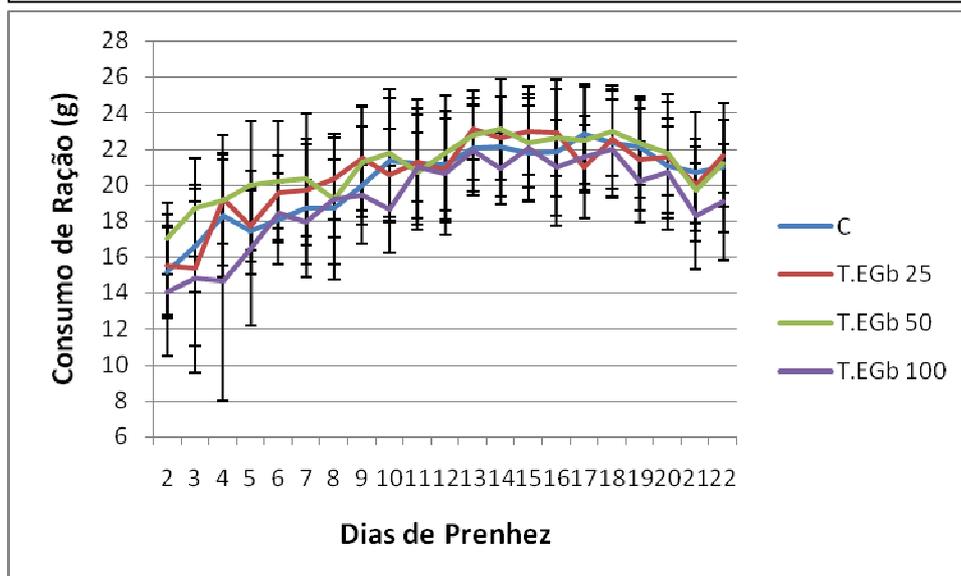


Gráfico 2: Consumo diário de ração (g) de fêmeas prenhes de ratas Wistar, tratadas via intragástrica com água destilada (C) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 25 (T.EGb 25), 50 (T.EGb 50) e 100 mg/Kg (T.EGb 100) do 16º ao 20º dias de gestação. $p > 0.05$



APÊNDICE B – Gráfico com resultados de peso da ninhada

Gráfico 3: Peso corporal (g) da ninhada de ratos Wistar machos, até o 20º dia pós natal em intervalos de 5 dias, após exposição materna, via intragástrica, com água destilada (C) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 25 (T.EGb 25), 50 (T.EGb 50) e 100 mg/Kg (T.EGb 100) do 16º ao 20º dias de gestação. $p > 0.05$

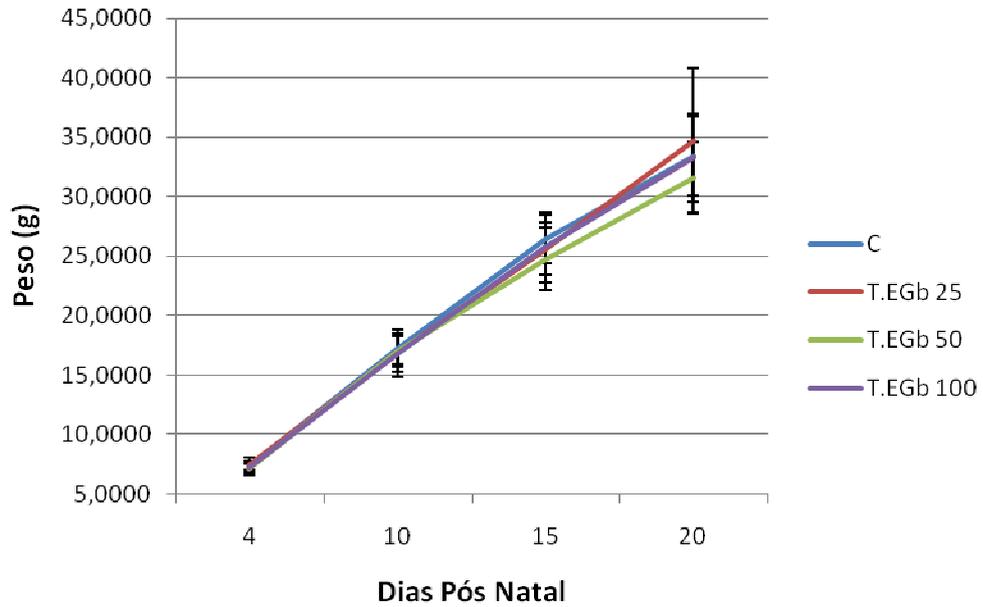
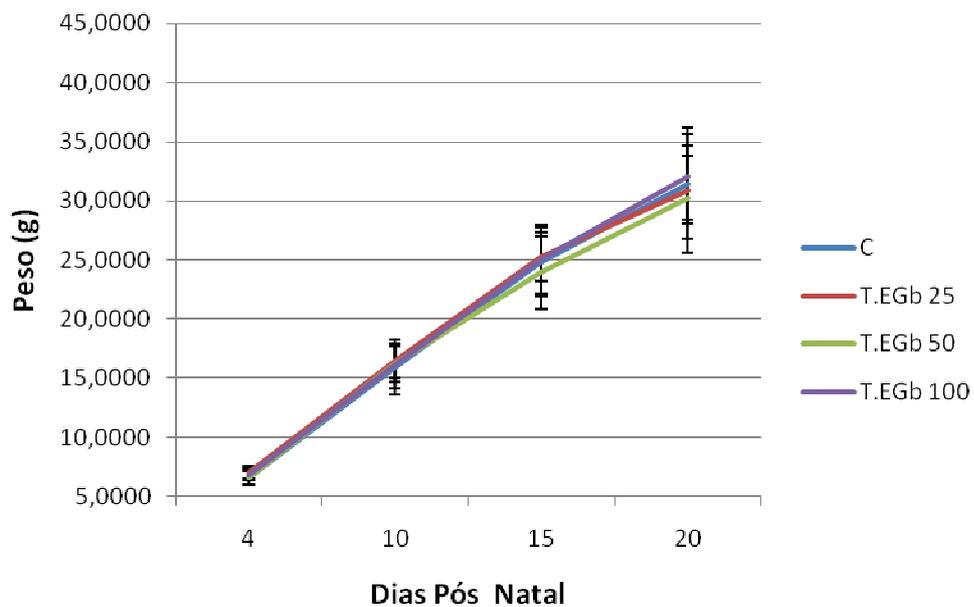
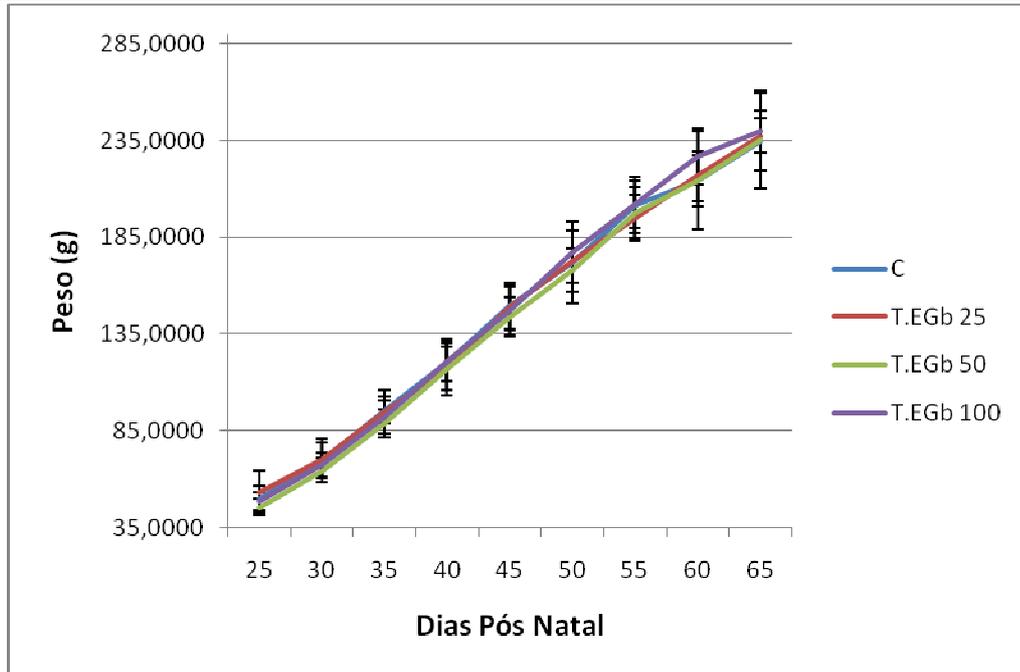


Gráfico 4: Peso corporal (g) da ninhada de ratos Wistar fêmeas, até o 20º dia pós natal em intervalos de 5 dias, após exposição materna, via intragástrica, com água destilada (C) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 25 (T.EGb 25), 50 (T.EGb 50) e 100 mg/Kg (T.EGb 100) do 16º ao 20º dias de gestação. $p > 0.05$



APÊNDICE C – Gráfico com resultados de peso dos machos F1, após desmame até a eutanásia

Gráfico 5: Peso corporal (g) ratos Wistar machos F1, do 25º ao 65º dia pós natal em intervalos de 5 dias, após exposição materna, via intragástrica, com água destilada (C) e extrato de *Ginkgo biloba* nas doses de 25 (T.EGb 25), 50 (T.EGb 50) e 100 mg/Kg (T.EGb 100) do 16º ao 20º dias de gestação. $p > 0.05$



APÊNDICE D – Resumo apresentado em Congresso

MORFOLOGIA DA GLANDE DO PÊNIS EM RELAÇÃO À PUBERDADE EM RATOS WISTAR

*Emília Raquel Serva da Rocha¹, Jessica Corrêa Bezerra¹, José Reinaldo Paranaíba Vilela
Alves Teixeira¹, Felipe Martins Ferreira¹, Vera Maria Peters¹, Martha de Oliveira Guerra¹*

*1. Centro de Biologia da Reprodução. Universidade Federal de Juiz de Fora. Rua José
Lourenço Kelmer, Campus Universitário - São Pedro, 36037-000, Juiz de Fora - MG,
Brasil. Email:ersrocha@yahoo.com.br*

INTRODUÇÃO: O desenvolvimento e maturação do sistema reprodutor masculino podem ser detectados por diversos indicadores, entre eles o posicionamento dos testículos no escroto e a separação do prepúcio. Entretanto Yamasaki e col. demonstraram que a morfologia da glande seria tão precisa quanto a separação do prepúcio e mais fácil de ser realizada. Outros trabalhos mostram que a glande responde a disruptores endócrinos, portanto, seria importante verificar se a evolução da morfologia da glande do pênis de ratos Wistar da colônia do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF tem o mesmo padrão relatado por Yamasaki e col.

OBJETIVO: Determinar a evolução da morfologia da glande e a descida do testículo em ratos Wistar da colônia do biotério do CBR/UFJF, comparando com dados da literatura.

METODOLOGIA: Foram utilizados 22 ratos Wistar, acompanhados a partir do 15^o dia pós-natal (DPN/ dia do nascimento = 1^o DPN) para verificar a presença dos testículos no escroto e a evolução da morfologia da glande, classificada em três etapas: A (saliente), B (em W) e C (achatada).

RESULTADO: Os testículos estavam localizados no escroto aos $26,68 \pm 2,71$ dias (Média \pm DP), as fases A, B e C da morfologia da glande ocorreram, respectivamente, aos $27,91 \pm 2,02$, $36,04 \pm 1,49$ e $43,32 \pm 2,53$ dias (Média \pm DP).

CONCLUSÃO: As etapas de evolução da morfologia da glande do pênis correspondem às datas citadas na literatura¹. A descida do testículo corresponde, aproximadamente, à etapa A da morfologia da glande. A etapa C é mais compatível com a idade em que ocorre a maturação sexual.

CEUA/UFJF n°81/2012

Suporte Financeiro: Rede Mineira de Bioterismo/FAPEMIG 31/11CVZ-RED-00009-14

APÊNDICE E – Resumo apresentado em Congresso

EFEITO DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTORES DE RATOS WISTAR ORIGINÁRIOS DE MÃES EXPOSTAS DURANTE O PERÍODO DA FETOGÊNESE.

Bezerra, J. C., Rocha, E. R. S., Teixeira, J. R. P. V. A., Ferreira, F. M., Peters, V. M., Guerra, M. O.,

Centro de Biologia da Reprodução - CBR/UFJF

Introdução:

A exposição intrauterina a fármacos e agentes tóxicos é causa de inúmeros problemas desenvolvidos na vida adulta. Fitoterápicos costumam ser utilizados indiscriminadamente por serem produtos naturais, considerados inofensivos. Entre os fitoterápicos com ação estrogênica observaram-se, em roedores, redução do peso dos testículos e da concentração espermática, hipospadias, criptorquidismo e tumores testiculares. O *Ginkgo biloba* é um fitoestrógeno que possui compostos com estrutura química semelhante ao estradiol que tem afinidade por receptores β estrogênicos, importantes no desenvolvimento e função do sistema reprodutor masculino. Seu efeito sobre o sistema reprodutor de fetos não foi suficientemente avaliado, o que justifica seu estudo em ratos cujas mães foram expostas ao extrato no período da Fetogênese.

Objetivos:

Avaliar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* sobre o sistema reprodutor masculino de ratos Wistar cujas mães foram expostas durante o período fetal.

Métodos:

CEUA/UFJF nº 81/2012 40 ratas no primeiro dia pós-coito (pc), provenientes do Biotério do CBR/UFJF e mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ventilação, foram distribuídas, aleatoriamente, em grupos: controle (C 1ml de água destilada) e três tratados T1, T2 e T3 que receberam, respectivamente, 25; 50 e 100mg/kg de extrato aquoso de *Ginkgo biloba*, via intragástrica, nos dias 16 a 20 pc. Após o nascimento, dois machos por mãe foram observados quanto à descida testicular e morfologia da glândula do pênis à partir do 15º dia pós natal (DPN). Os animais foram anestesiados no 65º DPN com associação de xilazina

(10mg/kg) e quetamina (90mg/kg) e coletado sangue por punção cardíaca e em seguida procedeu-se a eutanásia por deslocamento cervical. Foram analisados: concentração e morfologia espermáticas, peso dos testículos, epidídimo esquerdo e vesícula seminal vazia. Os dados foram analisados através do teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet ($\alpha=0.05$). O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEUA/UFJF nº 81/2012).

Resultados:

Não foram encontradas diferenças significativas, exceto na morfologia espermática, onde foi observado aumento do número de espermatozoides anormais em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo controle ($p<0.05$). O número de espermatozoides anormais nos grupos C, T1, T2 e T3 foi, respectivamente, $19,90 \pm 3,53$, $29,0 \pm 7,01$, $26,05 \pm 3,72$ e $30,05 \pm 6,53$ (Média \pm DP), contando-se 200 espermatozoides/lâmina. A maioria das anomalias concentrou-se na cauda do espermatozoide, totalizando $13,35 \pm 2,42$, $18,45 \pm 6,87$, $16,15 \pm 4,31$ e $19,55 \pm 5,43$ (Média \pm DP) nos grupos C, T1, T2 e T3, respectivamente.

Conclusão:

O *Ginkgo biloba* não causou alterações significativas nos parâmetros reprodutores, exceto na morfologia espermática que apresentou índice de anomalias superior nos grupos tratados em relação ao controle, sugerindo que o *Ginkgo biloba* promove alterações na morfologia dos espermatozoides.

Apoio Financeiro:

Rede Mineira de Bioterismo/FAPEMIG 31/11 e TOXIFAR 26/11 CBB-RED-00008-14

ANEXO 1

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 081/2012 – CEEA sobre “EFEITO DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* (EGb) SOBRE O EPIDÍDIMO E TESTÍCULO DE RATOS WISTAR APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de VERA MARIA PETERS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 80 machos e 40 fêmeas de ratos Wistar, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 081/2012- CEEA about “EFFECT OF *Ginkgo biloba* EXTRACT (EGb) ON THE EPIDIDYMIS AND TESTIS OF WISTAR RATS AFTER MATERNAL EXPOSURE” – 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 02/10/2012. For the development of this research 120 animals were released, as requested.

ANEXO 2

20º SEMINÁRIO DE
**INICIAÇÃO
CIENTÍFICA**
DA UFJF

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR DE RATOS WISTAR MACHOS, APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA AO EXTRATO DE GINKGO BILOBA L." orientado por MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA recebeu o prêmio principal no 20º Seminário de Iniciação Científica da UFJF.

Foram Premiados o(os) seguinte(s) bolsista(s) participantes do projeto:
EMILIA RAQUEL SERVA ROCHA e JOSÉ REINALDO PARANAIBA VILELA ALVES TEIXEIRA

Juiz de Fora 23 de outubro 2014

Realização:



Apoio:



Maria Cristina Andreoli Lopes
Maria Cristina Andreoli Lopes
Pró-Reitora de Pós-Graduação, Pesquisa
e Inovação

Sônia Regina Miranda
Sônia Regina Miranda
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa