



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

EDUARDA SANTOS SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMITIDADOR *IN VITRO* DO
EXTRATO DE *GINKGO BILOBA* EM LINFÓCITOS HUMANOS
IRRADIADOS ATRAVÉS DO ENSAIO DE MICRONÚCLEOS**

Recife
2023

EDUARDA SANTOS SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMITIGADOR *IN VITRO* DO
EXTRATO DE *GINKGO BILOBA* EM LINFÓCITOS HUMANOS
IRRADIADOS ATRAVÉS DO ENSAIO DE MICRONÚCLEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Mariana Esposito Mendes
Coorientadora: Fabiana Farias de Lima
Guimarães

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Eduarda Santos.

Avaliação do efeito radiomitigador in vitro do extrato de Ginkgo biloba em linfócitos humanos irradiados através do ensaio de micronúcleos / Eduarda Santos Silva. - Recife, 2023.

p. 63 : il., tab.

Orientador(a): Mariana Esposito Mendes

Coorientador(a): Fabiana Farias de Lima Guimarães

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Radiação Ionizante. 2. Radioproteção. 3. Dosimetria Citogenética. 4. Ginkgo biloba. 5. Micronúcleos. I. Mendes, Mariana Esposito. (Orientação). II. Guimarães, Fabiana Farias de Lima. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

EDUARDA SANTOS SILVA

AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMITIGADOR *IN VITRO* DO EXTRATO DE *GINKGO BILOBA* EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS ATRAVÉS DO ENSAIO DE MICRONÚCLEOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 22/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARIANA ESPOSITO MENDES**
Data: 11/10/2023 21:12:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Esposito Mendes
CRCN-NE/ Departamento de Dosimetria Biológica

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA FARIAS DE LIMA GUIMARAES**
Data: 12/10/2023 21:23:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Farias de Lima Guimarães
CRCN-NE/ Departamento de Dosimetria Biológica

Documento assinado digitalmente
 **ANA MARIA MENDONCA DE ALBUQUERQUE MEL**
Data: 16/10/2023 17:01:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Documento assinado digitalmente
 **LAIS MELO DA SILVA TRIGO**
Data: 13/10/2023 11:37:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Laís Melo da Silva Trigo
CRCN-NE/ Departamento de Dosimetria Biológica

Dedico este trabalho aos meus pais,
por toda a confiança e sacrifício.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras Mariana Esposito Mendes e Fabiana Farias de Lima Guimarães por todo conhecimento a mim ofertado e também por toda a paciência e consideração que me dispuseram nessa jornada científica. Nutro a mais sincera admiração por vocês.

Agradeço a todos do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE, onde além de encontrar pessoas maravilhosas que me inspiraram com sua inteligência e foco, encontrei um sentimento de comunidade e apoio mútuo. Foi e é uma honra fazer parte desse grupo.

Agradeço ao CRCN-NE pelo espaço e oportunidade, bem como à CNPq pelo financiamento ao projeto e ao meu futuro como pesquisadora.

Agradeço principalmente aos meus pais, Edivan e Aldeni, que sempre torceram pelo meu sucesso e se dedicaram incansavelmente ao longo da minha vida para me orientar no caminho certo. Todas as minhas conquistas são resultado desse esforço, e espero que sintam orgulho de cada passo que dei e de todas as conquistas alcançadas. Foi e é por vocês.

Agradeço também ao meu melhor amigo canino, e o mais fofo de todos, Jack. É impressionante como o amor se manifesta nas mais variadas formas. Obrigada por renovar as minhas energias tantas e tantas vezes com o seu amor.

Agradeço ao meu companheiro, Wendy, por me admirar e confiar no meu potencial até mais do que eu mesma. Obrigada pelo conforto e carinho em tantos dias de estresse, e claro, por me ajudar a montar tabelas e traduzir textos.

Também expresso minha gratidão aos amigos que estiveram ao meu lado nessa jornada. Mudar para uma cidade diferente sozinha não foi uma experiência fácil, mas graças a vocês, encontrei o conforto e o apoio de que tanto necessitava longe de casa.

Silva, Eduarda Santos. **Avaliação do Efeito Radiomitigador *in vitro* do Extrato de *Ginkgo biloba* em Linfócitos Humanos Irrradiados através do Ensaio de Micronúcleos**. 2023. 63 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A exposição à radiação ionizante pode causar mecanismos de ação diretos e indiretos no DNA, incluindo a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. O ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) é utilizado como um indicador citogenético para avaliar danos causados pela radiação. Com o aumento do uso da radiação ionizante em diversas áreas, há a necessidade de encontrar mecanismos radioprotetores eficazes que possam ser aplicados antes, durante ou após a exposição. Radioprotetores são substâncias que protegem contra os danos causados pela radiação e podem ser classificados como profiláticos, mitigadores ou terapêuticos. *Ginkgo biloba* contém compostos como biflavonoides, flavonoides, terpenoides e polifenóis, que possuem propriedades antioxidantes e potencialmente radioprotetoras. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito radioprotetor *in vitro* de diferentes concentrações do extrato de *Ginkgo biloba* em linfócitos humanos irradiados com 2 Gy de radiação gama utilizando o ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese. Foram coletadas amostras de sangue periférico para cada concentração do extrato de *Ginkgo biloba* em tubos contendo heparina. Foram formados três grupos de amostras: controle não irradiado, controle irradiado sem tratamento e um terceiro grupo irradiado e tratado com o extrato. O extrato de *Ginkgo biloba* passou por um teste de viabilidade celular utilizando o teste MTT. A irradiação das amostras foi realizada com uma fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacell 220) no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE), e a dose absorvida foi de 2 Gy. A cultura celular foi conduzida de acordo com o protocolo padrão, onde o ensaio de micronúcleos foi realizado para bloquear a citocinese celular. Posteriormente, as lâminas foram preparadas para análise microscópica, e os resultados foram submetidos a análises estatísticas, incluindo o teste u de Papworth para verificar se a frequência de micronúcleos seguia uma distribuição de Poisson, bem como os testes ANOVA e Tukey para avaliar o efeito radioprotetor entre as diferentes concentrações do extrato. O extrato de *Ginkgo biloba* reduziu a frequência de micronúcleos nas células analisadas nas concentrações de 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados da análise estatística mostraram que não houve diferença significativa entre as amostras irradiadas e não irradiadas de micronúcleos de acordo com o teste ANOVA. No entanto, o teste Tukey indicou diferenças estatísticas entre as amostras controle e as amostras irradiadas, bem como entre as amostras irradiadas entre si. A única comparação que não mostrou diferença estatística significativa foi entre as amostras irradiadas com as diferentes concentrações do extrato, sugerindo que o extrato pode ser eficaz em ambas as concentrações testadas.

Palavras-chave: Radiação ionizante. Radioproteção. Dosimetria citogenética. *Ginkgo biloba*. Micronúcleos.

Silva, Eduarda Santos. **Evaluation of the *in vitro* Radiomitigating Effect of *Ginkgo biloba* Extract on Irradiated Human Lymphocytes through the Micronucleus Assay.** 2023. 63 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Exposure to ionizing radiation can cause direct and indirect mechanisms of action on DNA, including the formation of reactive oxygen species and free radicals. The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) is used as a cytogenetic indicator to assess radiation-induced damage. With the increasing use of ionizing radiation in various fields, there is a need to find effective radioprotective mechanisms that can be applied before, during, or after exposure. Radioprotectors are substances that shield against radiation-induced damage and can be classified as prophylactic, mitigating, or therapeutic. *Ginkgo biloba* contains compounds such as biflavonoids, flavonoids, terpenoids, and polyphenols, which possess antioxidant and potentially radioprotective properties. This study aimed to evaluate the *in vitro* radioprotective effect of different concentrations of *Ginkgo biloba* extract on human lymphocytes irradiated with 2 Gy of gamma radiation using the cytokinesis-block micronucleus assay. Peripheral blood samples were collected for each concentration of *Ginkgo biloba* extract in heparin-containing tubes. Three sample groups were formed: non-irradiated control, irradiated control without treatment, and a third group irradiated and treated with the extract. *Ginkgo biloba* extract underwent a cell viability test using the MTT assay. Sample irradiation was performed using a ^{60}Co source (Gammacell 220 irradiator) at the Department of Nuclear Energy (DEN-UFPE), and the absorbed dose was 2 Gy. Cell culture was conducted following the standard protocol, where the micronucleus assay was performed to block cytokinesis. Subsequently, slides were prepared for microscopic analysis, and the results underwent statistical analyses, including the Papworth's u-test to check if the micronucleus frequency followed a Poisson distribution, as well as ANOVA and Tukey tests to evaluate the radioprotective effect among different extract concentrations. *Ginkgo biloba* extract reduced the micronucleus frequency in the analyzed cells at concentrations of 0.025 and 0.05 $\mu\text{g/ml}$. Statistical analysis results showed no significant difference between irradiated and non-irradiated micronucleus samples according to the ANOVA test. However, the Tukey test indicated statistical differences between control and irradiated samples, as well as among irradiated samples themselves. The only comparison that did not show a significant statistical difference was between the irradiated samples with different extract concentrations, suggesting that the extract may be effective at both tested concentrations.

Key words: Ionizing radiation. Radioprotection. Cytogenetic dosimetry. *Ginkgo biloba*. Micronuclei.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Interação da radiação com a matéria. A. Efeito fotoelétrico; B. Efeito Compton; C. Produção de pares.	17
Figura 2 – Efeito direto e indireto da Radiação Ionizante.	18
Figura 3 – Vias de reparo do DNA de DSB com as funções das proteínas relevantes.	21
Figura 4 – Esquema sobre a formação de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas em células com citocinese bloqueada.	25
Figura 5 – Exemplos de células binucleadas sem micronúcleos e com a presença de micronúcleos.	26
Figura 6 – Folhas de <i>Ginkgo biloba</i> .	32
Figura 7 – Comparação da viabilidade celular entre concentrações de <i>Ginkgo biloba</i> e bromodeoxiuridina.	40
Figura 8 – Frequências de micronúcleos da amostra controle e das amostras testes.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sintomas variados da Síndrome Aguda da Radiação conforme a dose (Gy).	20
Tabela 2 – Mecanismos de Ação dos Radioprotetores.	28
Tabela 3 – Efeitos Farmacológicos do EGb.	33
Tabela 4 – Comparação da frequência de micronúcleos entre as amostras controles: não irradiada, irradiadas tratadas com EGb e controle irradiada.	41
Tabela 5 – Análise Estatística da Variabilidade das Amostras por ANOVA e Tukey.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
Alt-EJ	Junção Alternativa de Extremidades
APE1/Ref-1	Endonuclease apurínica/apirimidinica1/fator redox-1
ATM/ATR	Proteína Quinase Ataxia Telangiectasia Mutada/Proteína Quinase Ataxia e Rad3 Relacionada
BN	Células Binucleadas
CBMN	Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CRCN-NE	Centro Regional de Energia Nuclear do Nordeste
Cyt-B	Citocalasina-B
DDR	Resposta de Reparo do DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNA-PKcs	Subunidade Catalítica da Proteína Cinase Dependente de DNA
DSB	Quebras de Fita Dupla
EGb	Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FBG	Glicose Sanguínea em Jejum
Gb	<i>Ginkgo biloba</i>
GSH	Glutathione
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HR	Recombinação Homóloga
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LET	Transferência Linear de Energia
MDA	Malondialdeído
MDS	Danos múltiplos ao DNA
MMEJ	Junção Alternativa de Extremidades
MN	Micronúcleos
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
NHEJ	Junção Não Homóloga de Extremidades
PARP-1	Poli (ADP-ribose) polimerase-1

POLQ	DNA Polimerase Teta
PPAR-γ	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma-γ
PQ	Paraquat
RAD51	Recombinase RAD51
RBC	Glóbulos Vermelhos ou Eritrócitos
RI	Radiação Ionizante
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPA	Proteína de Replicação A
SOD	Superóxido Dismutase
SSB	Quebras de Fita Simples
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
WBC	Glóbulos Brancos ou Leucócitos
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC4	Proteína de Complementação Cruzada de Reparo por Raios-X 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	RADIAÇÃO IONIZANTE	15
2.2	EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE	18
2.2.1	Efeitos Determinísticos e Estocásticos	19
2.3	VIAS DE REPARO AO DANO RADIOINDUZIDO	20
2.4	RADIOSENSIBILIDADE E LINFÓCITO	22
2.5	BIOMARCADORES	23
2.6	ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE	24
2.7	RADIOPROTETORES	27
2.7.1	Radioprotetores Químicos	29
2.7.2	Radioprotetores de Origem Natural	30
2.8	<i>GINKGO BILOBA</i>	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	COMITÊ/COMISSÃO DE ÉTICA	36
4.2	SELEÇÃO DE DOADORES E COLETA DAS AMOSTRAS	36
4.3	FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE AMOSTRAS	36
4.3.1	Grupos Controles	36
4.3.2	Grupo Irradiado e Tratado com Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	37
4.4	VIABILIDADE CELULAR	37
4.5	IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS	37
4.6	CULTIVO CELULAR E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	38
4.7	ANÁLISE MICROSCÓPICA	38
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

A exposição contínua à Radiação Ionizante (RI) pode gerar efeitos diretos e indiretos ao DNA. Os efeitos diretos, quando a radiação ionizante afeta diretamente a molécula de DNA, pode causar quebras de fita simples (SSB), quebras de fita dupla (DSB) e danos múltiplos ao DNA (MDS). Os efeitos indiretos se dão por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres provenientes da radiólise da água. Esses produtos oxidantes ($\text{OH}^\cdot$, H^+ , H_2 , H_2O_2 , H_2O^+) reagem com o DNA, causando danos celulares nos tecidos biológicos que estimulam uma resposta inflamatória do sistema imune (IAEA, 2011; Mun *et al.*, 2018).

As alterações cromossômicas, como os micronúcleos (MN), são indicadores citogenéticos frequentemente utilizados na biodosimetria para avaliar os danos causados pela radiação ionizante. Os micronúcleos são pequenos núcleos visualizados no citoplasma que surgem como resultado dos efeitos indiretos e diretos da radiação no DNA. Consistem em fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram corretamente incorporados nos núcleos filhos durante a fase da anáfase no ciclo celular. Embora esse tipo de alteração não seja exclusivo da radiação, a detecção de MN em células binucleadas através do ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) é considerada um biomarcador confiável para estimativa de dose absorvida na dosimetria biológica (Herate, Sabatier, 2020; Vral, Fenech, Thierens, 2011).

Nos últimos anos, a utilização da radiação ionizante cresceu significativamente em áreas como medicina, indústria, segurança pública e na área de comércio e serviços. Dados da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), registraram em 2020 cerca de 3499 instalações radiativas ativas no Brasil, divididas em 3 grandes áreas: indústria, medicina e pesquisa. Diante do aumento dos riscos de exposição acidental à radiação ionizante proveniente de diversas fontes radiológicas, há demanda por mecanismos de radioproteção eficazes que possam ser aplicados antes, durante ou após exposição à RI (Mishra; Mofteh; Alsbeih, 2018).

Radioprotetores são definidos como agentes que protegem contra os danos advindos da radiação, podendo ser administrados antes, durante ou após a exposição à radiação. Para serem considerados ideais, devem evitar tanto os efeitos agudos quanto os crônicos nos tecidos normais, além de serem facilmente administrados e não apresentarem toxicidade. Esses agentes são classificados em

três categorias: agentes profiláticos, administrados antes da exposição para prevenir danos; mitigadores, administrados durante ou após a exposição para reduzir os efeitos causados pela exposição, incluindo agentes decorporantes e quelantes que aliviam os danos causados pela exposição interna a radionuclídeos, e agentes bloqueadores que reduzem a absorção desses radionuclídeos pelos tecidos; e agentes terapêuticos, administrados após a exposição para facilitar a recuperação dos efeitos tóxicos da radiação ionizante (Jit *et al.*, 2022; Mun *et al.*, 2018).

A utilização de produtos derivados de plantas com efeitos protetores contra radiação ocorre desde os tempos antigos, no entanto, há um potencial inexplorado de fitoquímicos extraídos de vegetais que podem amenizar os danos oriundos da exposição a radiações. Algumas plantas são fontes ricas de diversos compostos bioativos, os quais conferem uma proteção natural a essas plantas contra as ameaças do próprio meio ambiente. Dos diversos compostos presentes, os flavonoides e os polifenóis são a fonte mais importante de propriedades antioxidantes e radioprotetoras (Dowlath *et al.*, 2021; Jit *et al.*, 2022).

Nesse contexto, tem-se a *Ginkgo biloba*, uma planta nativa do leste asiático, amplamente reconhecida na literatura por suas numerosas propriedades farmacológicas, graças à presença de compostos como biflavonoides, flavonoides, terpenoides e poliprenóis em seu extrato. Estes compostos conferem ao extrato características antioxidantes, anti-inflamatórias, capacidade de neutralizar radicais livres e de inibir a apoptose e a agregação plaquetária. No entanto, existem poucos registros sobre a eficácia da ação antioxidante desse extrato em células humanas, o que evidencia a necessidade de agregar mais estudos para avaliar seu potencial uso como radioprotetor (Eisvand; Razavi; Hosseinzadeh, 2020; Fang *et al.*, 2020; Feodorova *et al.*, 2020).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

A emissão de radiação surge quando um núcleo instável libera energia em excesso na forma de partículas ou ondas, buscando alcançar estabilidade. A radiação pode ser categorizada em dois tipos principais: radiação não ionizante e radiação ionizante. A radiação não ionizante é caracterizada por possuir baixa frequência e energia, insuficiente para causar ionização de átomos ou moléculas. Geralmente, essa forma de radiação não representa uma ameaça direta à saúde e inclui ondas de rádio, luz infravermelha, micro-ondas e ondas ultravioleta de baixa intensidade em seu espectro. A radiação ionizante, por sua vez, possui energia suficiente para remover elétrons de átomos ou moléculas, gerando íons carregados positivamente. Tem como principais fontes os raios gama (γ), as partículas alfa (α), partículas beta (β) e raios cósmicos (Dowlath *et al.*, 2021; Obrador *et al.*, 2020).

Enquanto ondas de raios X e γ ionizam átomos ao longo de sua trajetória, partículas carregadas, como partículas α e elétrons, perdem quase toda sua energia em uma única interação, provocando ionização por meio da ejeção de elétrons. Essa capacidade de ionização é uma característica fundamental da radiação ionizante, que na radiobiologia é aquela com energia acima de 10 eV (Okuno, 2013).

Após a descoberta dos raios X em 1895, descobriu-se que a exposição à radiação ionizante resulta em diversos eventos adversos nos tecidos, incluindo efeitos não cancerígenos, como reações na pele, cataratas e doenças circulatórias, e, também, cânceres induzidos pela radiação. Esses efeitos foram observados desde o início do século XX, destacando a importância da RI na saúde e levando ao estabelecimento de medidas de proteção contra seus efeitos prejudiciais (Foray; Bourguignon; Hamada, 2016).

Na dosimetria, utiliza-se um parâmetro para caracterizar a RI denominado Transferência Linear de Energia (LET). Esse parâmetro quantifica a média de energia cedida pela radiação por unidade de comprimento. Valores de alta LET são associados a partículas α , nêutrons e raios cósmicos (íons pesados), que têm diferentes características de penetração nos tecidos e conferem uma deposição mais concentrada de energia, pois induzem um maior número de ionizações em um espaço mais restrito. Por outro lado, radiações de baixa LET, como β e γ , depositam

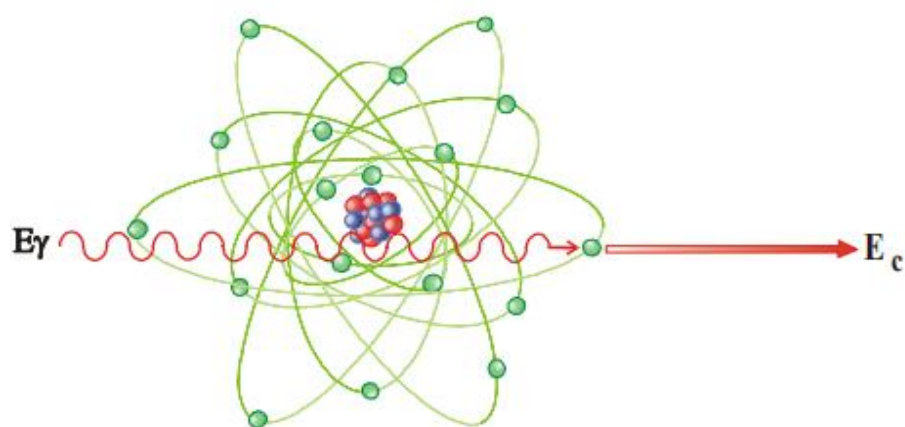
energia ao longo de distâncias maiores, causando menos dano por unidade de distância (Nuszkiewicz; Woźniak; Szewczyk-Golec, 2020).

Fótons são partículas elementares de luz e radiação eletromagnética, não possuem massa e são capazes de transportar energia. Nesse contexto, a radiação eletromagnética pode interagir com a matéria a partir dos seguintes efeitos: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares (Figura 1). A interação da radiação com o elétron orbital pode resultar em duas situações: pode excitar o elétron, elevando-o a um nível de energia superior, ou pode removê-lo completamente de sua órbita, gerando um íon. No efeito fotoelétrico, um fóton do feixe de raios γ ou X transfere sua energia para o elétron orbital (e desaparece), permitindo sua liberação do átomo a partir de uma energia cinética definida (Yoshimura, 2009; Silva, R. C.; Silva, R. M.; Aquino, 2014).

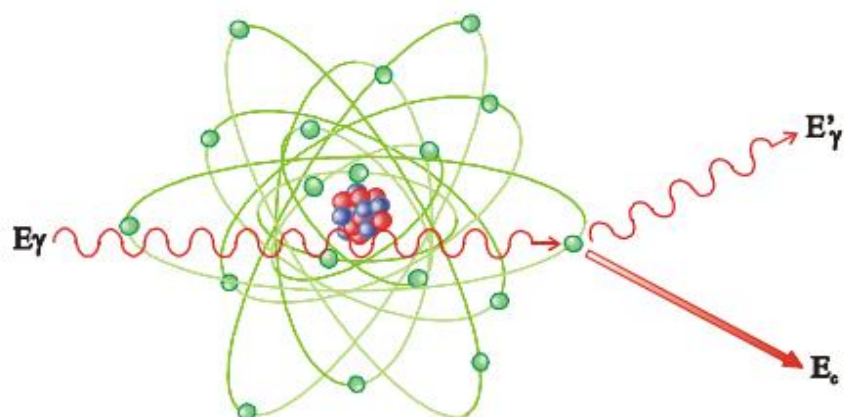
No efeito Compton, ocorre o espalhamento de um fóton a partir de sua colisão com um elétron livre. Durante essa interação, uma parte da energia do fóton é transferida para o elétron, levando à redução da energia do fóton e à alteração de sua trajetória (Caruso e Oguri, 2021).

No fenômeno da produção de pares elétron-pósitron, a energia total de um fóton é completamente convertida em massa de repouso e energia cinética, resultando na criação de um par elétron/pósitron. Isso implica uma transição do estado de energia negativa para um estado de energia positiva para o elétron, devido à absorção total da energia do fóton incidente. Essa ocorrência é resultado da interação entre o fóton e um campo eletromagnético (Yoshimura, 2009).

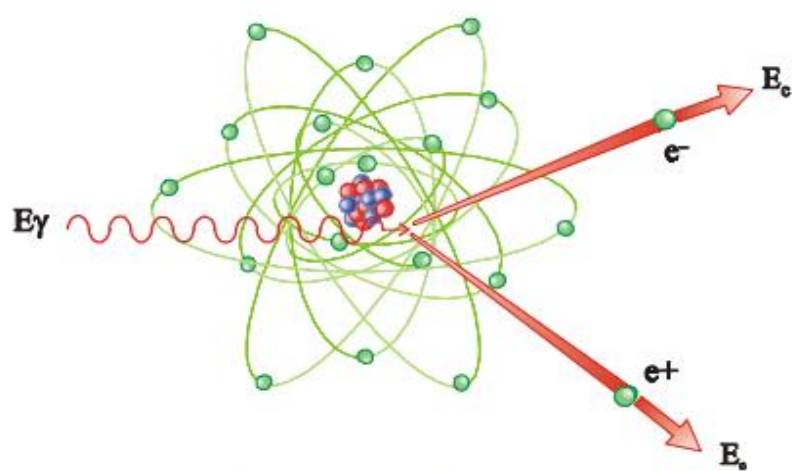
Figura 1 – Interação da radiação com a matéria. **A.** Efeito fotoelétrico; **B.** Efeito Compton; **C.** Produção de pares.



A. Efeito Fotoelétrico



B. Efeito Compton



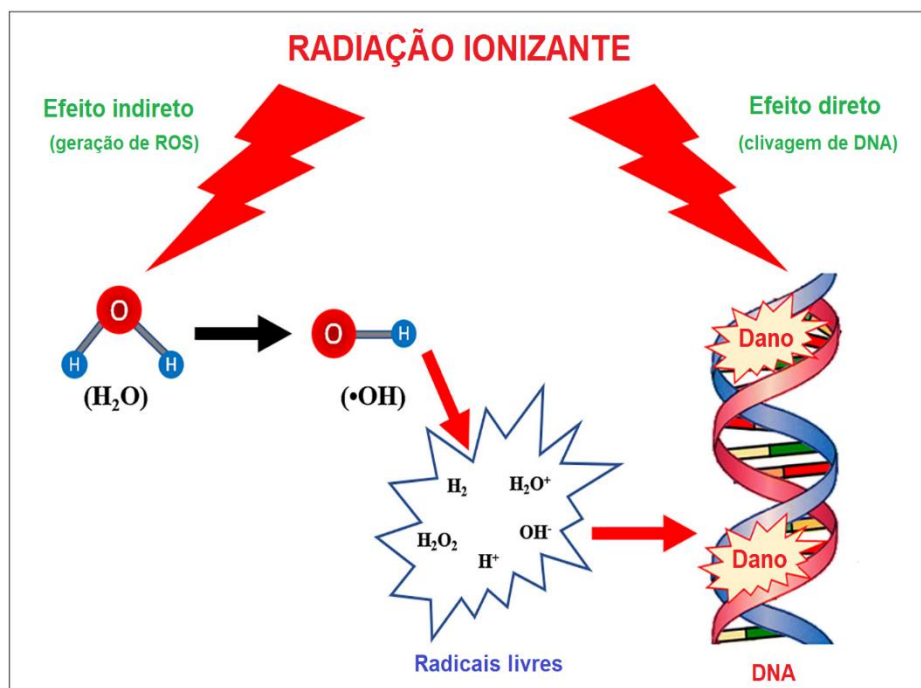
C. Formação de Pares

Fonte: Adaptado de Tauhata *et al.* (2003).

2.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE

Um dos principais efeitos advindos da exposição à radiação ionizante é a ocorrência de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), resultando em lesões como quebras de fita simples, quebras de fita dupla (DSBs), ligações cruzadas no DNA e ligações cruzadas DNA-Proteína. Esses danos podem ocorrer de forma direta, quando a radiação afeta diretamente o DNA, ou de forma indireta (Figura 2), por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) que afetam o DNA (Wang, J.; Wang, H.; Qian, 2018).

Figura 2 – Efeito direto e indireto da Radiação Ionizante.



Fonte: Adaptado de Dowlath *et al.* (2021).

À medida que penetra no organismo humano, a radiação pode ser absorvida pelas células por meio dos processos de ionização e excitação. Devido ao corpo humano ser composto por mais de 70% de água, há uma maior probabilidade de que essa energia seja inicialmente depositada nas moléculas de água (H_2O), levando à perda de sua estabilidade química e à formação de produtos radiolíticos, tais como H^+ , H_2 , OH^- , O_2^- e H_2O_2 . Estes produtos reagem prontamente com as biomoléculas presentes nas células, resultando em danos significativos a

componentes essenciais, como o DNA e as proteínas (Aggarwal, 2014; Okuno, 2013).

A geração de ROS está ligada ao estresse oxidativo devido à alta reatividade dessas espécies, possuindo elétrons desemparelhados que as tornam propensas a reagir com moléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA. Pesquisas recentes também revelaram que as ROS atuam como moléculas sinalizadoras reguladoras em processos biológicos e fisiológicos, destacando o peróxido de hidrogênio na biologia redox, enquanto níveis elevados de superóxido ou radicais hidroxila podem conduzir ao estresse oxidativo. A sinalização redox é crucial em processos como diferenciação celular, regeneração de tecidos e prevenção do envelhecimento (Schieber e Chandel, 2014).

A exposição à radiação ionizante pode desencadear uma variedade dos então chamados Efeitos Biológicos da Radiação, cuja expressão depende das condições de exposição. A severidade dos danos oriundos da radiação está diretamente relacionada à quantidade de radiação e às circunstâncias da exposição. Os efeitos biológicos, por sua vez, podem ser categorizados em efeitos estocásticos, que não têm um limiar de dose claro e se desenvolvem ao longo do tempo, e efeitos determinísticos, que apresentam um limiar de dose específico e podem se manifestar imediatamente (Choudhary, 2018).

2.2.1 Efeitos Determinísticos e Estocásticos

Os efeitos determinísticos, também chamados de não estocásticos ou teciduais, ocorrem quando a irradiação resulta em uma quantidade de morte celular que excede a capacidade de compensação do organismo. Esses efeitos surgem apenas após exposição a doses elevadas de radiação ionizante, superando um limiar de dose específico que varia conforme o tipo de radiação e tecido irradiado. Acima desse limiar, a gravidade do dano aumenta com o aumento da dose. Além disso, podem ser agudos, ocorrendo imediatamente após exposição (Tabela 1), ou tardios, manifestando-se meses a anos depois. Isso foi observado em sobreviventes da bomba atômica no Japão que apresentaram respostas tardias à radiação, evidenciando a persistência dos efeitos com o tempo (Navarro *et al.*, 2008; Okuno, 2013).

Tabela 1 – Sintomas da Síndrome Aguda da Radiação conforme a dose (Gy).

Dose Absorvida (Gy)	Síndrome Aguda da Radiação
0,25 - 1	Náusea, diarreia e depressão no sistema sanguíneo.
1 - 3	Além dos sintomas anteriores, há possibilidade de forte infecção por agentes oportunistas.
3 - 5	Hemorragia, perda de pelos, esterilidade temporária ou permanente
10	Inflamação dos pulmões.
> 10	Danos no sistema nervoso e cardiovascular, levando à morte em poucos dias.

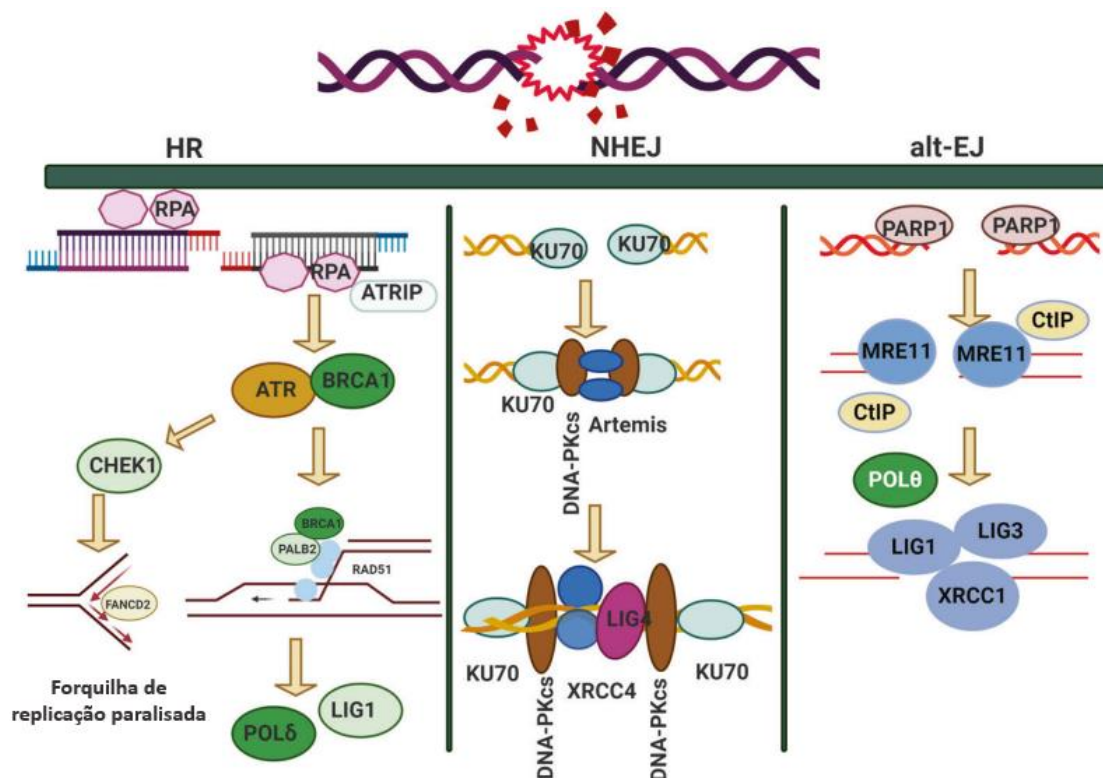
Fonte: Adaptado de Okuno (2013).

Por outro lado, os efeitos estocásticos ocorrem de maneira aleatória e não possuem um limiar de dose específico. Ao contrário dos efeitos determinísticos, em que a gravidade do efeito está diretamente relacionada à dose, nos efeitos estocásticos, o que varia é a probabilidade de ocorrência do efeito. Desse modo, a probabilidade de ocorrência é proporcional à dose absorvida, sem existência de um limiar. Os efeitos estocásticos estão intrinsecamente ligados à carcinogênese, uma vez que a probabilidade da ocorrência de câncer radioinduzido está associada à existência de clones de células geneticamente alteradas e à capacidade de pelo menos uma delas sobreviver e se reproduzir (Navarro, 2008; Tauhata *et al.*, 2003).

2.3 VIAS DE REPARO AO DANO RADIOINDUZIDO

A radiação ionizante pode ocasionar uma variedade de lesões no DNA, bem como interromper o ciclo celular e levar à morte celular. Se essas lesões persistem durante a fase S do ciclo, resultam na formação de quebras de dupla fita no DNA. As DSBs, de todas as lesões genéticas induzidas, são consideradas as mais prejudiciais, ameaçando significativamente a integridade genômica. Sendo assim, o reparo preciso de DSBs por meio das vias de reparo do DNA (Figura 3) é crucial para minimizar os riscos à saúde associados à exposição à RI e para manter a estabilidade genômica das células (Helleday *et al.*, 2008).

Figura 3 – Vias de reparo do DNA de DSB com as funções das proteínas relevantes.



Fonte: Adaptado de Huang e Zhou (2021).

A Recombinação Homóloga (HR) é uma via importante de reparo de quebras de fita dupla no DNA que exige sequências homólogas entre cromátides irmãs e é em geral um processo de reparo de DNA muito preciso, que pode restaurar a estrutura original do DNA com fidelidade. A proteína RAD51 facilita a HR, substituindo a proteína RPA que se liga às extremidades de fita simples de DNA recém-expostas após a quebra da fita dupla. A presença da RPA inibe a DNA polimerase, impedindo a síntese de uma nova fita de DNA. A ação da RAD51 permite o então alinhamento de sequência entre as regiões homólogas nas cromátides irmãs, reparando o DNA (Chen *et al.*, 2018).

Embora a HR possa, às vezes, envolver polimerases de DNA propensas a erros e alterar as sequências de genes através de recombinação, seu principal objetivo é realizar reparos precisos. Além disso, a HR é mais comum nas fases S e G2 do ciclo celular, quando as células estão se preparando para se dividir, mas também pode ocorrer em circunstâncias especiais em outras fases do ciclo celular (Marsolier-Kergoat *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020).

Outra via de reparo importante é a Junção Não Homóloga de Extremidades (NHEJ), uma via de reparo que liga extremidades quebradas do DNA sem a necessidade de sequências homólogas. Ela é iniciada pela ligação do heterodímero Ku70/80 às extremidades quebradas, seguido pelo recrutamento de proteínas, como a DNA-PKcs (subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA), DNA ligase IV (LIG4) e dos fatores associados de suporte XRCC4 e XRCC4-like factor (XLF), que promovem a ligação e o reparo. A NHEJ é crucial para a reparação rápida de quebras de DNA, mas pode causar mutações e translocações. É uma importante via de reparo do DNA, atuando em todas as fases do ciclo celular, exceto durante a mitose (Huang e Zhou, 2021; Zhao *et al.*, 2020).

A Junção Alternativa de Extremidades (Alt-EJ ou MMEJ) é um processo de reparo de DNA semelhante ao NHEJ, mas que depende da presença de pequenas sequências semelhantes nas duas extremidades do DNA quebrado. Proteínas como a PARP-1 (Poli [ADP-ribose] polimerase-1) e a POLQ (DNA polimerase teta) desempenham papéis fundamentais na Alt-EJ, impedindo a ligação da proteína de reparo Ku e facilitando a junção das sequências de DNA, respectivamente. Embora ativa em todo o ciclo celular, a Alt-EJ é mais eficaz na fase G2, mas também é mais propensa a causar mutações, como deleções e alterações nas sequências de DNA, em comparação com outras vias de reparo (Huang e Zhou, 2021; Oh e Myung, 2022).

2.4 RADIOSSENSIBILIDADE E LINFÓCITO

A lei de Bergonié e Tribondeau, de 1906, destaca a relação entre a proliferação celular e a radiossensibilidade, estabelecendo que o tipo celular influencia a resposta gerada pela irradiação visto que a sensibilidade celular à radiação depende de fatores como o tipo de tecido, sua atividade metabólica, diferenciação e proliferação celular. De acordo com o estipulado, a radiação terá maior eficácia de dano em células com maior atividade de proliferação e em células menos diferenciadas, ou seja, que não se especializaram completamente em forma e função. Logo, quanto mais jovem for o tecido ou órgão, e quanto maior for a atividade metabólica mais sensível à radiação. Sendo a radiossensibilidade diretamente proporcional a taxa de proliferação celular e de crescimento tecidual (Vogin e Foray, 2012; Silva; Cavalcanti; Carneiro, 2014).

Apesar de ter gerado grandes implicações na área da radiobiologia, a Lei de Radiossensibilidade de Bergonié e Tribondeau não é isenta de exceções. Um exemplo notável é a radiossensibilidade dos linfócitos, que mesmo sendo células maduras e diferenciadas são altamente radiossensíveis. A combinação dessas características, aliada à capacidade de circular por todo o corpo, facilidade de obtenção, e permanência no estágio G0 do ciclo celular, sendo divididos apenas quando estimulados, torna os linfócitos as células ideais para a biodosimetria e o biomonitoramento celular frente a exposição à radiação ionizante. Esses atributos tornam os linfócitos uma escolha privilegiada para avaliar os efeitos da radiação e explorar estratégias de tratamento mais eficazes (IAEA, 2011; Thierens e Vral, 2009).

2.5 BIOMARCADORES

A dosimetria biológica se compromete em avaliar a exposição à radiação com acurácia, para isso os métodos a que se dispõe precisam respeitar os seguintes critérios (Moiseenko *et al.*, 2016): (a) devem possuir um baixo limiar de detecção, permitindo identificar todas as doses de radiação, assegurando a detecção em exposições sutis; (b) a relação entre a dose de radiação e a resposta biológica deve possuir baixa variação em indivíduos saudáveis, garantindo uniformidade das medições e interpretação dos resultados; (c) capacidade em obter curvas de calibração em condições laboratoriais, como *in vitro*; (d) estabilidade nos efeitos biológicos radioinduzidos ao longo do tempo, permitindo a reconstrução da dose anos após a exposição.

Nesse cenário, tem-se a utilização de biomarcadores, os quais, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*, 1996), referem-se a substâncias e/ou aos produtos de biotransformação que surgem como resultado da interação entre agentes químicos ou físicos com organismo. A aplicação de marcadores biológicos na dosimetria biológica permite elucidar a relação entre causa e efeito, além da dose e seu efeito nos indivíduos expostos à radiação ionizante de maneira individualizada. Desse modo, podem fornecer informações sobre processos fisiológicos, exposição a substâncias e condições patológicas, visto que suas mudanças refletem alterações subjacentes nos sistemas biológicos (Amorim, 2003; Moiseenko *et al.*, 2016).

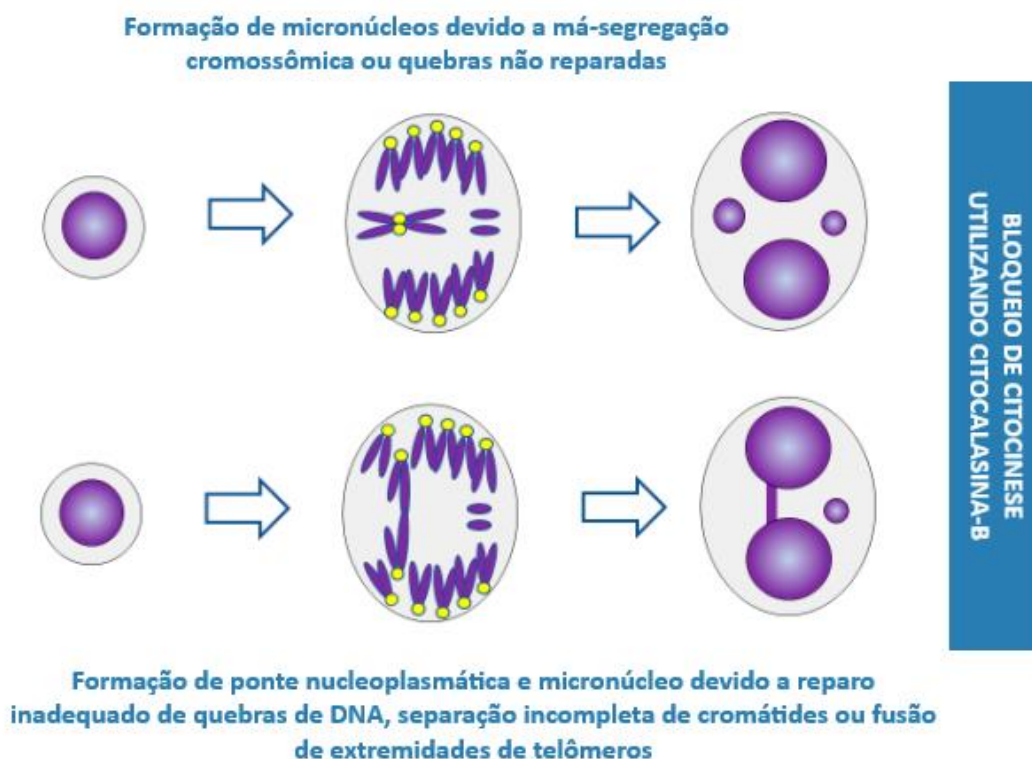
Algumas características conferem aos biomarcadores um perfil ideal, devem: refletir bem a interação da substância com o sistema biológico; ser de fácil reprodutibilidade; não ser invasivo, permitindo acessibilidade na obtenção conforme necessidade; oferecer um *background* de referência com valores normais em populações não expostas ao agente de estudo. Atendendo a esses requisitos, os biomarcadores são úteis em estudos epidemiológicos que visem detectar precocemente uma doença radioinduzida, bem como avaliar a eficácia de um tratamento (Amorim, 2003; Pernot *et al.*, 2012).

Inúmeros ensaios biodosimétricos foram desenvolvidos e aprimorados nas últimas décadas. Os biomarcadores, por sua vez, ganharam notoriedade principalmente na ausência de dosímetros físicos. Assim, a dosimetria biológica ganhou destaque e impulso através de técnicas como o ensaio de Cromossomo Dicêntrico, o ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese, o ensaio de Translocação Cromossômica por Hibridização em Fluorescência Multicolorida *in situ*, o ensaio γ -H2AX, além dos perfis de expressão gênica (Zeegers *et al.*, 2017).

2.6 ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE

O ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) é uma técnica amplamente adotada em todo o mundo, originalmente desenvolvida por Fenech e Morley, em 1985. Nesse método, células que completaram a divisão nuclear são coletadas e identificadas pelo seu aspecto binucleado (BN) após a inibição da formação do anel de microfilamentos de actina (Figura 4), necessário para a citocinese, pela ação do agente inibidor citocalasina-B (Cyt-B). Por possuir alta confiabilidade e reprodutibilidade eficaz, o ensaio CBMN se consolidou como um dos testes citogenéticos padrão para avaliações de toxicologia genética em células humanas e mamíferas e tem demonstrado ser uma ferramenta potencialmente promissora para triagem no gerenciamento médico de situações de emergência nuclear (Fenech, 2020; Herate e Sabatier, 2020).

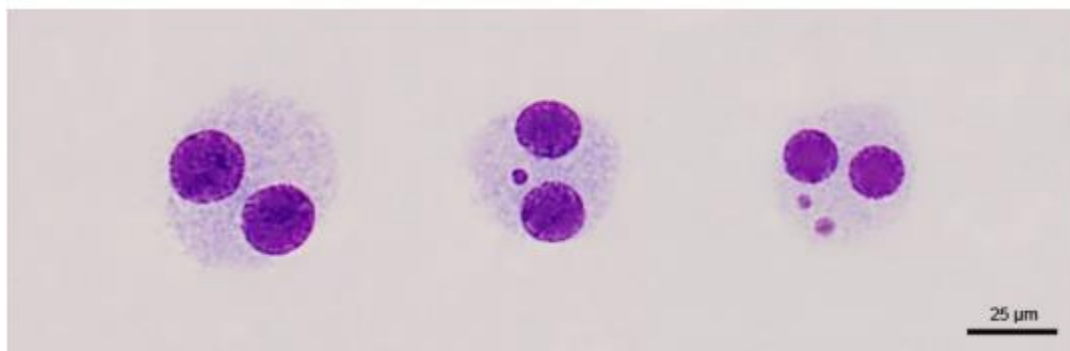
Figura 4 – Esquema sobre a formação de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas em células com citocinese bloqueada.



Fonte: Adaptado de Fenech (2020).

Os micronúcleos são formados a partir de alterações cromossômicas instáveis, constituindo cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incluídos nos núcleos das células filhas, logo são eliminados durante a fase da anáfase do ciclo celular. São visualizados como pequenas esferas no citoplasma das células filhas, exibindo morfologia idêntica à dos núcleos principais, porém sem qualquer ligação a estes (Figura 5). Os critérios morfológicos que validam a identificação dos micronúcleos incluem: diâmetro situado entre 1/16 e 1/3 do tamanho dos núcleos principais, ausência de sobreposição com outros micronúcleos e clara demarcação em relação à fronteira nuclear. Além disso, sua coloração é similar ou mais suave em intensidade em comparação com a coloração dos núcleos principais (Herate e Sabatier, 2020; Pujol-Canadell *et al.*, 2020).

Figura 5 – Exemplos de células binucleadas sem micronúcleos e com a presença de micronúcleos.



Fonte: Manual da Agência Internacional de Energia Atômica, IAEA (2011).

O ensaio CBMN é amplamente empregado para avaliar danos cromossômicos causados não apenas pela radiação ionizante, mas também por agentes clastogênicos diversos, como substâncias químicas. Portanto, por não ser específico a radiação, o ensaio CBMN é frequentemente utilizado como teste de toxicologia geral. A utilização desse teste em estudos de proteção radiológica é recomendada pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), uma vez que os micronúcleos são excelentes dosímetros biológicos para avaliar a exposição à radiação ionizante (Lusiyanti *et al.*, 2016; Vral; Fenech; Thierens, 2011).

Historicamente, o ensaio CBMN foi utilizado para avaliar a exposição prolongada a radionuclídeos em indivíduos nas proximidades da usina nuclear de Chernobyl. Além disso, foi empregado no acidente radiológico ocorrido em Istambul, em 1998, onde trabalhadores foram contaminados por uma fonte de ^{60}Co abandonada em um ferro-velho. Devido sua fácil reprodutibilidade, alta eficácia, custo acessível e natureza não invasiva, o teste de micronúcleos é ideal para cenários de acidentes de radiação em larga escala, nos quais a ênfase está em empregar métodos dosimétricos rápidos para efetuar triagens ágeis da população em diversas localidades (IAEA, 2011; Uchôa e Magalhães, 2020).

2.7 RADIOPROTETORES

Diante da crescente exposição dos tecidos orgânicos às diversas fontes de radiação presentes na sociedade atual, bem como os registros de grandes incidentes relacionados à tecnologia nuclear, um dos principais objetivos da radiobiologia moderna é desenvolver métodos efetivos para mitigar os danos causados pela exposição à radiação.

Recentemente, um amplo espectro de substâncias químicas e biológicas têm sido estudadas como potenciais agentes profiláticos frente aos efeitos tóxicos gerados pela radiação ionizante. O objetivo desses estudos é elaborar técnicas para facilitar a ativação das vias de reparo do DNA, englobando mecanismos de inibição de espécies reativas de oxigênio, além do restabelecimento de antioxidantes endógenos e a desaceleração da divisão celular (Patyar, R.; Patyar, S., 2018; Mun *et al.*, 2018).

Os agentes capazes de atenuar os danos causados pela radiação podem ser categorizados como: radioprotetores e radiomitigadores. Os radioprotetores são substâncias utilizadas antes da irradiação para proteger os tecidos biológicos dos efeitos nocivos da radiação. Radiomitigadores, por sua vez, são utilizados após a exposição à radiação para reparar os danos teciduais (Mishra; Moftah; Alsbeih, 2018).

Radioprotetores e radiomitigadores são compostos químicos ou de origem natural, capazes de preservar e proteger os tecidos contra os danos causados pela radiação, permitindo uma recuperação mais rápida ao reduzir a gravidade das lesões nos tecidos. Os antioxidantes conferem um dos principais grupos de substâncias radioprotetoras, visto que a maior parte do dano causado pela RI advém da interação entre radicais livres e biomoléculas. Sendo assim, substâncias antioxidantes como moléculas do grupo sulfidril e aminotióis atuam capturando radicais livres e causando hipóxia, respectivamente, inibindo a geração de espécies reativas de oxigênio. Os antioxidantes também contribuem ao amplificar os métodos de recuperação e reparo do DNA. Substâncias como melatonina, quercetina e glutathione (GSH) podem atuar no reparo do DNA a partir da modulação do fator de transcrição sensível ao redox NRF2, além da regulação da proteína de reparo do DNA, endonuclease apurínica/apirimidinica1/fator redox-1 (APE1/Ref-1) (Dowlath *et al.*, 2021; Jayakumar; Pal; Sandur, 2015).

Além disso, podem atenuar os efeitos inflamatórios induzidos pela RI. Diversas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são geradas no organismo, como as interleucina-1 e interleucina-6, além do fator de necrose tumoral alfa e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Substâncias como linhaça (*Linium usitatissimum*) promoveram a redução da expressão de TGF- β e de Bax e p21, os quais conferem biomarcadores de lesão pulmonar, reduzindo a inflamação pulmonar e fibrose em ratos expostos à radiação ionizante. Podem, ainda, atuar na regeneração de células hematopoiéticas por meio de compostos endógenos como imunomoduladores, fatores de crescimento e citocinas (Mun *et al.*, 2018).

Na tabela 2, temos uma representação dos variados mecanismos de atuação dos radioprotetores.

Tabela 2 – Mecanismos de Ação dos Radioprotetores.

Reparo de DNA	• Instabilidade genômica • DSB, SSB • Síntese GSH
Eliminação de ROS	• Eliminação de radicais livres
Anti-inflamação	• Interleucina-1 • Interleucina-6 • TNF-alpha
Direcionamento molecular	• p53 • ATM/ATR • Bax • Bcl2 • Proteínas de choque térmico • PPAR-y
Regeneração de células hematopoiéticas	• WBC, RBC • Fator de células-tronco

Fonte: Adaptado de Mun *et al.* (2018).

Radiomitigadores agem no nível do sistema ao acelerar a recuperação dos tecidos radiosensíveis após a radiação. Diferente de outros radioprotetores, não atuam diretamente nos processos químicos e bioquímicos primários. Os radiomitigadores englobam preparações hormonais de estrutura esteroideal e seus análogos não esteroidais, adjuvantes imunológicos, citocinas (fatores de crescimento, fator de necrose tumoral, interferons) e alguns peptídeos imunorreguladores. Atuam por meio da ativação de vias anti-inflamatórias e pelo aumento da secreção de fatores de crescimento hematopoiéticos, sendo assim,

estão relacionados à capacidade de acelerar a regeneração hematopoiética (Domina e Kopylenko, 2022).

O potencial de ação dos agentes radioprotetores ou radiomitigadores pode se estender desde o nível tecidual ao nível molecular e celular. Para um radioprotetor ser considerado ideal, ele deve ser de baixo custo, acessível, possuir baixa toxicidade em concentrações terapêuticas, além de ser eficaz para diferentes tipos de radiação e não induzir efeitos cumulativos no organismo. Além disso, do ponto de vista funcional, devem ter a capacidade de neutralizar a formação de compostos reativos, capturar radicais livres, induzir as vias de reparo do DNA ao dano radioinduzido, atuar como imunomoduladores ao estimular a proliferação de células-tronco hematopoiéticas e imunopoiéticas e promover a estabilidade de biomoléculas essenciais (Minaei e Hoseini, 2021; Shivappa e Bernhardt, 2022; Mun *et al.*, 2018).

2.7.1 Radioprotetores Químicos

A maioria dos radioprotetores químicos documentados na literatura consiste em derivados de complexos de sulfidrilas e antioxidantes, abrangendo substâncias como tiazol, tiossal, ácido tiolfosfórico, aminotióis, aminosulfidas, além de derivados de tiouréia e de aminas biogênicas. Dessa classe de radioprotetores, a amifostina é o único radioprotetor aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamento (FDA), seu mecanismo de ação se baseia na eliminação de radicais livres, doação de átomos de hidrogênio e hipóxia celular e tecidual. Entretanto, o seu uso esteve relacionado a reações adversas como cefaléia, diarreia, espirros, hipotensão, náuseas, soluços e vômitos (Dowlath *et al.*, 2021).

Alguns estudos recentes com o uso de nanopartículas mostraram eficácia radioprotetora como o de Kadivar *et al.* (2020), onde a administração de nanopartículas de óxido de cério a 14,5 nM em ratos, ofereceu proteção radiológica contra 18 Gy de radiação. Vesna *et al.* (2016), por sua vez, registrou que a administração de nanopartículas de fulereno em ratos antes da exposição à radiação preveniu lesões radioinduzidas, pois o composto incitou a regeneração de órgãos como intestino delgado, pulmão e baço. A capacidade de capturar radicais livres desse composto se baseia na adição de radicais entre uma hidroxila (HO•) e ligações duplas na molécula de fulereno.

Nitroxidas são compostos de baixo peso molecular que atuam como

miméticos da superóxido dismutase, ou seja, inibem a peroxidação lipídica e previnem a interrupção da hélice do DNA e também podem participar de reações de oxirredução (Kuntić *et al.*, 2013). Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxy), é o representante mais conhecido dessa classe de radioprotetores. Ao estudar o composto, Wang *et al.* (2017) relatou que além de possuir capacidade antioxidante, bem como oferecer proteção *in vivo* contra a radiação ionizante, o Tempol é capaz de atenuar a apoptose celular e regular os níveis de expressão de Bcl-2, Bax, caspase-3 e P53 ao evitar o acúmulo de ROS no organismo. Além disso, induz o aumento do nível de glutathione e diminuição do nível de malondialdeído (MDA) devido às suas propriedades antioxidantes.

2.7.2 Radioprotetores de Origem Natural

Radioprotetores de origem natural não apresentam efeitos colaterais graves e possuem baixa toxicidade ao organismo, se caracterizam por incluir substâncias com propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anti-inflamatórias. A capacidade de proteção contra a radiação desses agentes está intimamente relacionada a respostas adaptativas que ocorrem tanto no nível celular quanto no nível do organismo, influenciando a forma como os genes são ativados e regulados (Domina e Kopylenko, 2022).

Os estudos sobre a atividade radioprotetora a partir de substâncias encontradas em plantas e frutas é algo fortemente difundido no meio científico, tendo em vista que as preparações botânicas foram e ainda são muito utilizadas para tratar diversos tipos de doenças. Na literatura, examinou-se inúmeros extratos advindos de diferentes partes das plantas como raiz, sementes, flor, casca e folhas. Com isso, plantas como *Tinospora cardifolia*, *Rosemarinus officinalis*, *Aloe vera*, *Panax ginseng*, *Embilica officinalis*, *Mentha piperata* entre outras foram registradas como possuidoras de propriedades radioprotetoras (Mishra e Alsbeih, 2017).

Kuntić *et al.* (2013), observou em seus estudos que compostos como beta-glucanos, um polissacarídeo presente em fungos, algas e bactérias, estimulam a produção de citocinas, como interleucinas IL-1 e IL-6, além de aumentar o número de células da medula óssea. Adicionalmente, inúmeros estudos utilizando antioxidantes naturais, como as vitaminas A, C e E, e hormônios como 5-

androstenodiol e melatonina, têm exibido propriedades de mitigação em face dos danos celulares causados pela presença de radicais livres, que incluem redução da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e outros processos de deterioração. Entretanto, constatou-se que antioxidantes de origem natural promovem menos eficácia se comparados a antioxidantes sintéticos, tendo em vista a ocorrência da eliminação não seletiva de radicais livres (Dowlath *et al.*, 2021; Patyar, R.; Patyar, S., 2018).

Os principais compostos responsáveis por viabilizar a atividade radioprotetora de plantas e frutas são os polifenóis, pertencentes à classe dos flavonóides. Estes podem ser classificados como flavonas, flavanonóis, flavonóis, flavanonas e isoflavonas, sendo a classificação baseada no nível de oxidação observado do anel heterocíclico presente nos compostos. Os estudos acerca do caráter protetor dos flavonóides é nortado pelo conhecimento epidemiológico de que o consumo de diversas plantas, vegetais e frutas está fortemente atrelado a diminuição do risco de vários tipos de câncer (Kuntić *et al.*, 2013).

A atividade protetora dos polifenóis está diretamente ligada à sua capacidade antioxidante e ao seu papel na Resposta de Reparo do DNA (DDR), onde eles regulam os processos moleculares e os mecanismos de reparo ativados em resposta ao dano causado pela radiação. A DDR abrange várias etapas complexas, incluindo detecção do dano, sinalização, ativação de respostas celulares, reparo do DNA e restauração da função normal. Os polifenóis desempenham um papel positivo nos processos de reparo, promovendo a eficiência na correção dos danos ao DNA e contribuindo para manter a integridade celular e o funcionamento saudável do organismo (Majidinia; Bishayee; Yousefi, 2019).

2.8 *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba (Gb) é a única espécie dióica ainda existente na família *Ginkgoaceae*, e é notável por ser considerada um fóssil vivo, com uma história evolutiva que se estende por mais de 200 milhões de anos. Esta espécie exibe uma estabilidade genética notável, demonstrando uma alta capacidade de tolerância a diversos fatores de estresse. Um exemplo impressionante é sua sobrevivência à explosão da bomba atômica em Hiroshima, onde a planta conseguiu persistir apesar de estar localizada a apenas 1-2 km do epicentro da explosão (Šamec *et al.*, 2022).

As árvores de *Ginkgo* medem entre 20 a 30 metros de altura com um diâmetro de 7 metros. As folhas mais jovens apresentam uma coloração verde clara (Figura 6), enquanto as folhas maduras exibem uma tonalidade verde mais escura, que se transforma em um tom amarelo dourado à medida que envelhecem no outono (Eisvand; Razavi; Hosseinzadeh, 2020).

Figura 6 – Folhas de *Ginkgo biloba*.



Fonte: Šamec *et al.* (2022).

A padronização do extrato como EGb 761 teve origem na Alemanha em 1965, por meio de uma empresa farmacêutica alemã. Desde então, uma extensa quantidade de estudos tem sido conduzida para avaliar os efeitos da *Ginkgo biloba* em modelos humanos e animais (Gertz e Kiefer, 2004).

De acordo com Singh *et al.* (2008), os fitoquímicos presentes na planta podem ser categorizados em ácidos graxos, terpenoides, alilfenóis, aminoácidos, polifenóis, sais inorgânicos, ácidos orgânicos, lipídios e carboidratos. No extrato de *Ginkgo biloba* (EGb), encontramos flavonoides, glicosídeos, bilobalídeo e ginkgolídeos. Esses compostos têm a capacidade de estimular o fluxo sanguíneo, além de exercer funções antioxidantes, melhoradoras de memória e anti-vertigem (Li *et al.*, 2022).

Os efeitos farmacológicos do *Ginkgo biloba* são amplamente reconhecidos e bem documentados. O extrato desta planta engloba uma variedade de propriedades,

incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antitumorais, antidiabéticos, hipotensivos, anti-obesidade, hipolipemiantes, imunoestimulantes e antidepressivos (Eisvand; Razavi; Hosseinzadeh, 2020; Fang *et al.*, 2020). O extrato também demonstrou ter efeitos terapêuticos significativos em diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares e Alzheimer (Zhang *et al.*, 2019).

Alguns efeitos farmacológicos do *Ginkgo biloba* podem ser observados na tabela 3:

Tabela 3 – Efeitos Farmacológicos do EGb.

Efeitos antioxidantes	• Queda de ROS • Queda de MDA • Aumento de GSH • Aumento de SOD
Efeitos anti-inflamatórios	• Queda na expressão NF-KB • Queda na expressão TNF-alpha • Aumento na expressão IL-10
Efeitos hipolipemiantes	• Queda de triglicerídeos • Queda de LDL • Aumento de HDL
Efeitos hipotensores	• Inibição de ACE • Vasodilatação • Aumento na expressão eNOS
Efeitos antidiabéticos	• Queda de FBG • Aumento no nível de insulina no plasma • Queda na resistência hepática à insulina
Efeitos antiobesidade	• Queda no consumo de energia • Aumento na sensibilidade à insulina

Fonte: Adaptado de Eisvand; Razavi; Hosseinzadeh (2020).

Dentre esses efeitos, merecem destaque as características antioxidantes, imunoestimulantes e anti-inflamatórias da planta. Esses atributos não apenas evidenciam seu potencial como agente radioprotetor, mas também revelam a presença de mecanismos de ação semelhantes aos encontrados em radioprotetores já conhecidos.

Zuo *et al.* (2017) avaliou as propriedades do EGb e considerou além das propriedades citadas, as capacidades do extrato de apresentar comportamento

protetor ao DNA contra danos oxidativos, mitigar disfunções mitocondriais, e de possuir caráter inibidor de apoptose motivada por ROS. Todos esses danos podem ser provenientes da radiação ionizante.

Num estudo que empregou o EGb com o objetivo de examinar a capacidade de proteção das células HepG2 contra danos no DNA causados pelo herbicida paraquat (PQ), conduzido por Silva *et al.* (2019), foi observado que a planta exerceu um efeito protetor. Esse efeito foi possível devido à presença de flavonoides e outros compostos fenólicos no extrato, os quais atuaram na neutralização de radicais livres resultantes do estresse oxidativo.

No âmbito da radioproteção, Jagetia *et al.* (2007) relatou a eficácia do EGb em pacientes com edema vasogênicos provenientes de efeito radiativo no cérebro. Além disso, evidenciou a proteção promovida pelo extrato sobre fatores clastogênicos no plasma de humanos expostos à radiação.

Em um estudo com ratos, Okumus *et al.* (2011), comenta as propriedades mitigadoras do EGb contra o estresse oxidativo gerado por radiação gama. Neste estudo ele defende o comportamento do *Ginkgo* de aumentar a atuação de enzimas antioxidantes, eliminando os radicais livres gerados pela radiação, assim como diminuir a atividade de enzimas oxidantes.

Ademais, no estudo de Calvacanti *et al.* (2019), foi observado matematicamente que o EGb reduziu danos neuronais em ratos causados pela exposição à radiação ionizante, sugerindo a capacidade do Gb em neutralizar radicais livres. Adicionalmente, os bilobalídeos presentes no extrato demonstraram proteção neuronal contra o estresse oxidativo e bloqueio de mecanismos de apoptose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito radiomitigador do extrato de *Ginkgo biloba* em linfócitos humanos irradiados expostos à radiação gama por meio da técnica citogenética de micronúcleo por bloqueio de citocinese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular utilizando a técnica colorimétrica MTT em três concentrações (0,025; 0,05 e 0,25 µg/ml) de *Ginkgo biloba*.
- Avaliar a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos expostos ao EGb frente à radiação ionizante.
- Analisar o efeito radioprotetor do EGb por meio do índice de dispersão e distribuição celular.

4 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE.

4.1 COMITÊ/COMISSÃO DE ÉTICA

O projeto foi aprovado (Anexo A) pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CCS-UFPE), sob o CAAE: 39932720.4.0000.5208.

4.2 SELEÇÃO DE DOADORES E COLETA DAS AMOSTRAS

Um indivíduo saudável e não fumante foi selecionado como voluntário, após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). Em seguida, realizou-se um questionário de anamnese (Anexo C) para verificar se, nos últimos seis meses antes da coleta, o voluntário não foi exposto a radiação terapêutica ou diagnóstica, vacinas virais ou consumiu drogas ilícitas (Gajendiran *et al.*, 2001). Após o questionário, foram coletadas amostras de 5 ml de sangue periférico para cada concentração do extrato de *Ginkgo biloba* estudada em tubo contendo heparina.

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE AMOSTRAS

Foram formados 3 grupos de amostras, sendo dois grupos controles, um para o sangue não irradiado e não tratado e outro para o sangue irradiado não tratado (controle positivo) e um grupo para as amostras irradiadas e tratadas com o extrato de *Ginkgo biloba* em duas concentrações (0,025 e 0,05 µg/ml).

4.3.1 Grupos Controles

O sangue controle não irradiado serviu como análise para o nível de *background* da frequência de alterações cromossômicas, isto é, micronúcleos, oriundos de outros agentes clastogênicos, devendo estar na faixa de 0 a 40 MN em

1000 células analisadas, de acordo com o manual da Agência Internacional de Energia Atômica (2011).

O controle positivo teve papel na verificação da frequência de alterações causadas pela radiação ionizante na dose absorvida de escolha (2 Gy).

4.3.2 Grupo Irradiado e Tratado com Extrato de *Ginkgo biloba*

Para as amostras teste, adicionou-se o extrato de *Ginkgo biloba* (Merck) 30 minutos após a irradiação. As concentrações utilizadas foram aquelas (0,025 e 0,05 µg/ml) aprovadas no teste de viabilidade celular (teste MTT).

4.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), técnica colorimétrica que determina a capacidade das células em reduzir o sal tetrazólio, como protocolado por Dani *et al.* (2010). O teste foi realizado para determinar quais concentrações do extrato de Gb seriam utilizadas no trabalho.

Após o período de cultivo celular, 10 µL da solução de 5 mg/ml do corante MTT foi adicionado a uma concentração de 1×10^6 células/ml em placa para cultura celular contendo 96 poços, e em seguida, a placa ficou exposta ao corante por aproximadamente 3 horas.

Após a exposição ao corante, o meio de cultura foi removido e 80 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan derivados da redução do sal tetrazólio. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância foi obtida pela técnica de ELISA a 570 nm.

O teste foi realizado em triplicata para cada concentração (0,025; 0,05 e 0,25 µg/ml) do extrato de Gb e da bromodeoxiuridina, um composto citotóxico utilizado para facilitar a comparação da viabilidade celular.

4.5 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram preparadas alíquotas de 5 ml para cada amostra de sangue, as quais foram expostas a uma fonte de ^{60}Co utilizando um irradiador Gammacell 220

localizado no Departamento de Energia Nuclear da UFPE (DEN/UFPE). A irradiação das amostras visou a dose absorvida de 2 Gy e durante a irradiação, uma barreira de polietileno de 4 mm foi empregada para garantir o equilíbrio eletrônico.

4.6 CULTIVO CELULAR E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

A cultura de células seguiu o protocolo do manual da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2011). Foram adicionados 0,5 ml de sangue total a frascos contendo 4 ml de meio RPMI-1640 (Gibco), enriquecido com 1 ml de soro bovino fetal (Gibco), 0,1 ml de fitohemaglutinina (Sigma) e 0,6 ml de estreptomicina (Sigma). Para as amostras testes, adicionou-se o extrato de *Ginkgo biloba* nas concentrações aprovadas pelo teste MTT (0,025 e 0,05 µg/ml).

Os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C por 72 horas. Porém, 24 horas após exposição a fitohemaglutinina, 0,02 ml de citocalasina B foi adicionado ao meio a fim de estimular o bloqueio da citocinese.

Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, as células foram tratadas com 7 ml de KCl para lisar as hemácias, promovendo choque hipotônico. Os tubos foram novamente centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi removido e substituído por 5 ml de solução fixadora contendo metanol: ácido acético (10:1), diluído em solução de Ringer (1:1) até completar 7 ml. Foram realizadas centrifugações e trocas de fixador, sem solução de Ringer, na quantidade de vezes necessária até que o conteúdo do tubo estivesse transparente.

Para a análise microscópica, as lâminas foram preparadas a partir do precipitado de células ressuspendido em 0,5 ml de solução fixadora. Esse precipitado foi cuidadosamente gotejado em dois pontos na lâmina que secou à temperatura ambiente por 24 horas. Para a coloração, utilizou-se Giemsa a 5% por 20 minutos.

4.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A contagem de micronúcleos foi realizada em microscópio óptico, onde foram contabilizadas, no mínimo, 3000 células binucleadas (BN) viáveis. Os critérios da

IAEA (2011) foram seguidos na análise para determinar as BN viáveis e os micronúcleos aceitáveis.

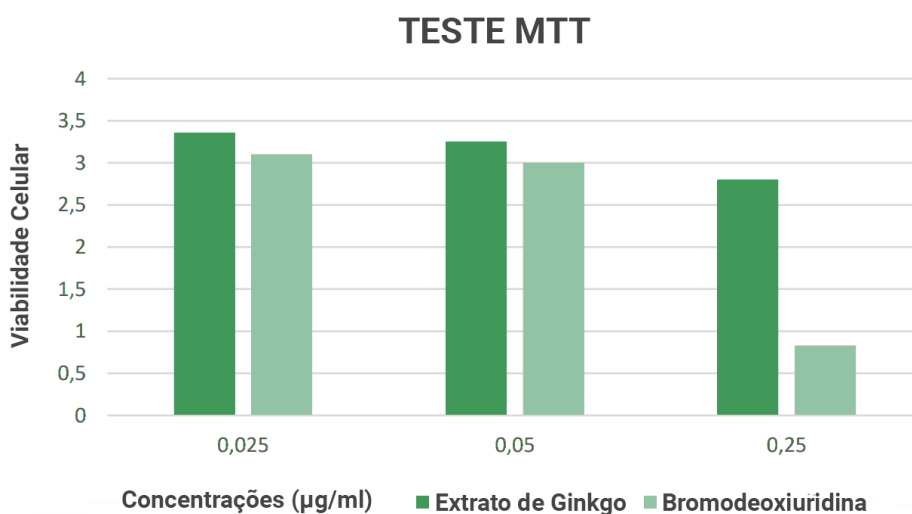
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a análise das lâminas, foram realizados cálculos estatísticos, como o teste u de Papworth, para verificar se a distribuição de células com micronúcleos seguiu a distribuição de Poisson na dose absorvida estudada (Acharya *et al.*, 2009; IAEA, 2011). Os testes ANOVA e Tukey foram aplicados para avaliar o comportamento entre as diferentes concentrações do extrato, bem como verificar a eficácia radioprotetora da planta (Dardano *et al.*, 2007; Georgieva, Popov, Bonev, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de viabilidade celular, os resultados obtidos a partir do teste MTT indicaram que as amostras tratadas com o extrato de *Ginkgo biloba* foram consideravelmente mais viáveis que as amostras tratadas, nas mesmas concentrações do agente citotóxico bromodeoxiuridina (0,025, 0,05 e 0,25 µg/ml). Como pode-se observar na figura 7, a viabilidade celular diminui à medida que as concentrações de ambas as substâncias aumentam. Esse fenômeno encontra sua explicação nos princípios da farmacodinâmica, onde, à medida que as concentrações da droga se elevam, um maior potencial de toxicidade emerge. Isso se deve em parte à natureza das substâncias, muitas das quais exibem uma faixa terapêutica, ou seja, um intervalo de dosagem em que os efeitos desejados são obtidos com segurança (Niu; Straubinger; Mager, 2019).

Figura 7 – Comparação da viabilidade celular entre concentrações de *Ginkgo biloba* e bromodeoxiuridina.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Nas concentrações mais baixas, o efeito citotóxico da bromodeoxiuridina não se faz tão evidente quanto na maior concentração (0,25 µg/ml). Possivelmente, isto ocorre, pela insuficiência da concentração do agente em causar perturbação nas células e, assim, ocasionar a morte celular de boa parte das células. Na maior concentração, o extrato de *Ginkgo biloba* demonstrou uma maior viabilidade celular

em detrimento da bromodeoxiuridina, atestando seu comportamento não tóxico perante os linfócitos humanos do sangue periférico.

Para continuidade do estudo, as concentrações de 0,025 e 0,05 µg/ml de *Ginkgo biloba* foram escolhidas por representarem os maiores índices de viabilidade celular, tornando-as mais relevantes para o trabalho.

Pelo ensaio de micronúcleos por bloqueio de citocinese, foram observadas 9.050 células binucleadas viáveis, sendo 3.050 células referentes a amostras controles e 6.000 células referentes as amostras testes (Tabela 4).

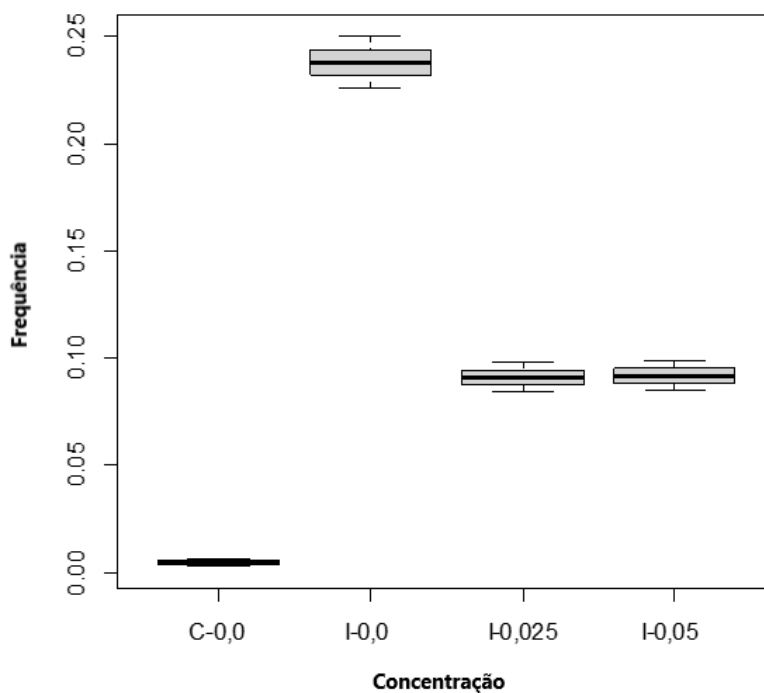
Tabela 4 – Comparação da frequência de micronúcleos entre as amostras controles: não irradiada, irradiadas tratadas com EGb e controle irradiada.

Dose (Gy)	Con	Total de células	Distribuição celular de Mn											Dose estimada (Gy)
			Mn	Y	0	1	2	3	4	5	var	var/Y	u	
0	0*	1050	5	0.005	1045	5	0	0	0	0	0,005	0,996	-0,098	-0,001
2	0*	2000	477	0.239	1599	339	52	8	0	2	0,278	1,165	5,209	2,397
2	0,025	3000	274	0.091	2755	218	25	2	0	0	0,104	1,135	5,250	1,094
2	0,05	3000	277	0.092	2747	230	22	1	0	0	0,101	1,089	3,435	1,104

Con: concentração (µg/ml); *: sem extrato; Mn: micronúcleos; Y: frequência de micronúcleos; var: Variância; var/Y: Variância sobre média; u: Teste u.

Os dados obtidos mostram que o sangue controle - não irradiado (0 Gy) e não tratado (concentração 0) - segue as recomendações de *background* da IAEA (2011), devendo estar na faixa de 0 a 40 MN em 1000 células analisadas. A frequência de micronúcleos aumentou consideravelmente na amostra controle irradiada (2 Gy e concentração 0) quando em contraste com a amostra controle não irradiada. Em se tratando das amostras testes com a concentração (0,025 e 0,05 µg/ml) do extrato de *Ginkgo biloba*, pode-se observar que a frequência de MN diminuiu de modo bastante significativo quando comparada com a frequência da amostra controle irradiada sem extrato (Tabela 4 e Figura 8).

Figura 8 – Frequências de micronúcleos da amostra controle e das amostras testes.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Em relação a distribuição de Poisson, baseado no teste u, as amostras testes apresentaram sobredispersão significativa com valores acima de 1,96, sendo uma reflexão da técnica utilizada, visto que o ensaio de micronúcleos tende a fugir da distribuição de Poisson como relatado na literatura (Mendes *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a curva de calibração utilizada para estimar a dose absorvida (Tabela 4) foi do trabalho de Mendes *et al.*, (2019), com os coeficientes $C = 0,0048 \pm 0,0009$; $\alpha = 0,0637 \pm 0,0045$; e $\beta = 0,0141 \pm 0,0015$. Observa-se aqui a redução da estimativa de dose nas amostras tratadas com o extrato, onde a dose estimada absorvida foi reduzida em mais da metade em comparação à dose de exposição, denotando o efeito radiomitigador do extrato.

Com esses resultados das frequências das amostras controle e teste, realizou-se os testes de ANOVA e Tukey onde obtivemos os seguintes dados:

Tabela 5 – Análise Estatística da Variabilidade das Amostras por ANOVA e Tukey.

	Irradiado e não irradiado	Irradiado
Anova	0,7591	0,6893
Tukey		
C-0,0 x I-0,025	0,0000043	-
C-0,0 x I-0,05	0,0000039	-
C-0,0 x I-0,0	0,0000000	-
I-0,0 x I-0,025	0,0000000	0,0000023
I-0,0 x I-0,05	0,0000001	0,0000024
I-0,05 x I-0,025	0,9985267	0,9898182

I: irradiado; C: controle; 0,0: amostras sem extrato; 0,025 e 0,05: concentrações do extrato de *Ginkgo biloba*.

Os testes ANOVA e Tukey foram aplicados para determinar se houve diferença significativa entre as médias dos grupos irradiados e não irradiados, e para identificar quais grupos específicos apresentaram diferenças significativas entre si, respectivamente. Os resultados obtidos (Tabela 5) demonstraram que as análises estatísticas das amostras irradiada e não irradiada de micronúcleos não mostraram relevância estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p\text{-value} = 0,7591$) e também quando só comparada as amostras irradiadas ($p\text{-value} = 0,6893$).

No entanto, no teste Tukey indicou que houve diferença estatística entre a amostra controle e as amostras testes irradiadas, e também quando só comparadas as amostras irradiadas (todas com $p\text{-value} < 0,05$). A única comparação entre as amostras irradiadas que não obteve diferença estatística foi ao comparar as amostras irradiadas com as diferentes concentrações do extrato ($p\text{-value} > 0,05$).

Apesar do ANOVA não confirmar, o teste Tukey aponta as distinções entre os grupos tratados e não tratados com EGb, indicando que a eficácia do extrato pode ser obtida com ambas as concentrações.

Outros estudos utilizaram a técnica de micronúcleos com bloqueio de citocinese para verificar o efeito radioprotetor de algumas substâncias.

Pouri *et al.* (2019), em seu trabalho, observou uma redução significativa na frequência de micronúcleos nas 1000 células binucleadas contadas em amostras de linfócitos irradiados tratadas com Gliclazide, um medicamento usado no tratamento da diabetes mellitus tipo 2, em comparação com amostras irradiadas não tratadas. O medicamento foi testado nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 μM , com maior eficácia na proteção dos linfócitos observada a 100 μM . A frequência de

micronúcleos também foi significativamente menor em amostras tratadas com 5 μ M em comparação com as outras concentrações. Além disso, o medicamento não demonstrou efeitos genotóxicos em contraste com o grupo controle.

Em um estudo comparativo de substâncias antioxidantes, Khanirad, Haddad e Soleymanifard (2020) observaram que a administração de vitamina E e do extrato de *Rosa damascena* reduziu significativamente a frequência de micronúcleos (p -value < 0,05), causada pela exposição à radiação de raios X de 2 Gy, quando comparado às amostras controles, irradiadas e sem a administração de ambas as substâncias. Isso sugere que a *Rosa Damascena* preparada pode ser um radioprotetor eficaz, semelhante à vitamina E, tornando-se uma opção acessível para consumo diário em pessoas suscetíveis à radiação ionizante.

Em 2020, Nadi *et al.* conduziu um estudo sobre o efeito radioprotetor da arbutina, avaliado por meio do ensaio de micronúcleos em ratos expostos a raios X de megavoltagem. Foram testadas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg de arbutina em doses de 2 e 4 Gy. A concentração mais baixa de 50 mg/kg demonstrou uma redução significativamente maior na frequência de micronúcleos, indicando uma eficácia radioprotetora superior em comparação com as concentrações mais elevadas.

Rahgoshai *et al.* (2021), por sua vez, analisou a frequência de micronúcleos em amostras tratadas com Cimetidina e irradiadas com 2 Gy de radiação γ . Ele observou que a Cimetidina obteve maior eficácia no efeito radioprotetor ($p < 0,04$) na concentração de 25,2 μ g/ml em detrimento da concentração 12,6 μ g/ml. Nas concentrações mais baixas de Cimetidina (12,6 μ g/ml), os efeitos de proteção foram mínimos, com frequências de micronúcleos significativamente mais altas em comparação com os grupos tratados com agentes radioprotetores ($p < 0,02$).

Ademais, outras plantas que obtiveram comprovação das propriedades radioprotetoras foram a *Coleus aromaticus* (Rao *et al.*, 2006) e *Syzygium cumini* (Jagetia *et al.*, 2012). O extrato de *C. aromaticus* demonstrou eficácia nas atividades antioxidante, radioprotetora e anticlastogênica a partir da análise da frequência de MN. Neste estudo, a planta foi avaliada em diferentes concentrações, variando de 1 a 1000 μ g/ml contra uma dose absorvida de 2 Gy de radiação gama. Entretanto, a dose mais baixa (1 μ g/ml) demonstrou ser a mais eficaz, estabelecendo-a como a dose ótima para essa planta. O extrato de folhas de *S. cumini* foi administrado a camundongos em uma concentração de 50 mg/kg, em diferentes doses de radiação

gama variando de 0,5 a 4 Gy. Neste contexto, a planta também demonstrou a capacidade de neutralizar radicais livres, e observou-se uma redução na ocorrência de micronúcleos com o tratamento do extrato antes da exposição à radiação.

6 CONCLUSÃO

- O extrato de *Ginkgo biloba* apresentou viabilidade celular utilizando a técnica colorimétrica MTT nas concentrações testadas (0,025; 0,05 e 0,25 µg/ml).
- Houve redução da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados após utilização do extrato de *Ginkgo biloba* nas concentrações estudadas (0,025 e 0,05 µg/ml).
- Mesmo na presença do extrato de *Ginkgo biloba* o índice de dispersão, a distribuição celular estava de acordo com os relatados da literatura.
- O extrato demonstrou atividade redutora da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos do sangue periférico irradiados com 2 Gy de radiação gama, evidenciando um comportamento radiomitigador perante o dano radioinduzido.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, Santhosh *et al.* The effect of electron and gamma irradiation on the induction of micronuclei in cytokinesis-blocked human blood lymphocytes. **Radiation and environmental biophysics**, v. 48, n. 2, p. 197-203, jan. 2009.
- AGGARWAL, L. Biological effects of ionizing radiation. **Shodh Prerak**, v. 4, n. 1, p. 342-348, 2014.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158–170, jun. 2003.
- CARUSO, F.; OGURI, V. Sobre a necessidade do conceito de fóton. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 43, p. e20210011, 2021.
- CAVALCANTI, Camilla de Andrade Tenorio *et al.* Radioprotective action of *Ginkgo biloba* on brain electrical activity of wistar mice exposed to 18Gy ionizing radiation. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 36-39, 2019.
- CHEN, C.-C. *et al.* Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 2, n. 1, p. 313–336, 4 mar. 2018.
- CHOUDHARY, S. Deterministic and Stochastic Effects of Radiation. **Cancer therapy & Oncology International Journal**, v. 12, n. 2, 5 out. 2018.
- Comissão Nacional de Energia Nuclear. **Instalações Radiativas Áreas e Práticas**. Disponível em: <<http://antigo.cnen.gov.br/images/cnen/documentos/drs/cgmi/Instalacoes-Radiativas-v4.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2023.
- DANI, C. *et al.* Viabilidade Celular de Cultura de Linfócitos Tratados com *Annona muricata* L. **Ciência em Movimento**, v. 12, n. 24, p. 95–101, 31 dez. 2010.
- DARDANO, Angela *et al.* Anticlastogenic effect of *Ginkgo biloba* extract in Graves' disease patients receiving radioiodine therapy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 11, p. 4286-4289, nov. 2007.
- DOMINA, E. A.; KOPYLENKO, O. L. Role of radioprotectors in minimization of stochastic effects of radiation incidents. **Experimental Oncology**, v. 44, n. 3, p. 186-189, set. 2022.
- DOWLATH, Mohammed Junaid Hussain *et al.* Effects of radiation and role of plants in radioprotection: A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 779, p. 146431, jul. 2021.
- EISVAND, F.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. The effects of *Ginkgo biloba* on metabolic syndrome: A review. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1798–1811, ago. 2020.

FANG, Jiacheng *et al.* Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Ginkgo biloba*: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1897–1905, nov. 2020.

FENECH, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1203, 15 out. 2020.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation research**, v. 147, n. 1-2, p. 29–36, 1 fev. 1985.

FEODOROVA, Yana *et al.* Cytotoxic effect of *Ginkgo biloba* kernel extract on HCT116 and A2058 cancer cell lines. **Heliyon**, v. 6, n. 9, p. e04941, set. 2020.

FORAY, N.; BOURGUIGNON, M.; HAMADA, N. Individual response to ionizing radiation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 369–386, out. 2016.

GAJENDIRAN, Natarajan *et al.* Neutron-induced Adaptive Response Studied in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay. **Journal of Radiation Research**, v. 42, n. 1, p. 91–101, 2001.

GEORGIEVA, Svetlana; POPOV, Borislav; BONEV, Georgi. Radioprotective effect of *Haberlea rhodopensis* (Friv.) leaf extract on gamma-radiation-induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant levels in rabbit blood. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 1, p. 29–36, jan. 2013.

GERTZ, H.-J.; KIEFER, M. Review about *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 (*Ginkgo*). **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 3, p. 261–264, 2004.

HELLEDAY, T. *et al.* DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 3, p. 193–204, mar. 2008.

HERATE, C.; SABATIER, L. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 783, p. 108287, jan. 2020.

HUANG, R.; ZHOU, P.-K. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 254, 9 jul. 2021.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. **EPR-Biodosimetry**, 2011.

JAGETIA, G. C. *et al.* Inhibition of Radiation-Induced DNA Damage by Jamun, *Syzygium cumini*, in the Cultured Splenocytes of Mice Exposed to Different Doses of γ -Radiation. **Integrative Cancer Therapies**, v. 11, n. 2, p. 141–153, 2012.

JAGETIA, G. C. Radioprotective Potential of Plants and Herbs against the Effects of Ionizing Radiation. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 74–81, 2007.

JAYAKUMAR, S.; PAL, D.; SANDUR, S. K. Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 779, p. 33–45, set. 2015.

JIT, Bimal Prasad *et al.* Phytochemicals: A potential next generation agent for radioprotection. **Phytomedicine**, v. 106, p. 154188, nov. 2022.

KADIVAR, F. *et al.* Protection effect of cerium oxide nanoparticles against radiation-induced acute lung injuries in rats. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 25, n. 2, p. 206–211, mar. 2020.

KHANIRAD, E.; HADDAD, F.; SOLEYMANIFARD, S. Comparing the Radioprotective Effects of Brewed *Rosa damascena* and Vitamin E on Ionizing Radiation-Induced Chromosomal Aberrations in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using Micronucleus Assay in Binucleated Cells. **Intern Med Today**, v. 26, n. 1, p. 14–23, 1 jan. 2020.

KUNTIĆ, V. S. *et al.* Radioprotectors - the Evergreen Topic. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 10, p. 1791–1803, out. 2013.

LI, Y. *et al.* The potential of *Ginkgo biloba* in the treatment of human diseases and the relationship to Nrf2-mediated antioxidant protection. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 74, n. 12, p. 1689–1699, 25 nov. 2022.

LUSIYANTI, Y. *et al.* Establishment of a Dose-response curve for X-ray-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes. **Genome Integrity**, v. 7, p. 1-4, 2016.

MAJIDINIA, M.; BISHAYEE, A.; YOUSEFI, B. Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. **DNA Repair**, v. 82, p. 102679, out. 2019.

MARSOLIER-KERGOAT, M.-C. *et al.* Mechanistic View and Genetic Control of DNA Recombination during Meiosis. **Molecular Cell**, v. 70, n. 1, p. 9- 20.e6, abr. 2018.

MENDES, M. E. *et al.* Comparative study of micronucleus assays and dicentric plus ring chromosomes for dose assessment in particular cases of partial-body exposure. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 8, p. 1058–1071, 3 ago. 2019.

MINAEI, S. E.; HOSEINI, F. The Role of Radioprotector Agents in the Protection of Normal tissue. **Journal of Research in Applied and Basic Medical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 161–171, 10 dez. 2021.

MISHRA, K.; ALSBEIH, G. Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 292, out. 2017.

MISHRA, Krishna N.; MOFTAH, Belal A.; ALSBEIH, Ghazi A. Appraisal of mechanisms of radioprotection and therapeutic approaches of radiation countermeasures. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 610–617, out. 2018.

MOISEENKO, V. *et al.* Biological dosimetry to assess risks of health effects in victims of radiation accidents: Thirty years after Chernobyl. **Radiotherapy and Oncology**, v. 119, n. 1, p. 1–4, abr. 2016.

MUN, Gil-Im *et al.* Pharmacology of natural radioprotectors. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, n. 11, p. 1033–1050, out. 2018.

NADI, S. *et al.* Evaluating the radioprotective effect of arbutin on mice exposed to megavoltage X-rays based on hematological parameters and lymphocytes micronucleus assay. **International Journal of Radiation Research**, v. 18, n. 2, p. 275–282, apr. 2020.

NAVARRO, M. V. T. *et al.* Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 15, n. 4, p. 1039–1047, dez. 2008.

NIU, J.; STRAUBINGER, R. M.; MAGER, D. E. Pharmacodynamic Drug–Drug Interactions. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, n. 6, p. 1395–1406, jun. 2019.

NUSZKIEWICZ, J.; WOŹNIAK, A.; SZEWCZYK-GOLEC, K. Ionizing Radiation as a Source of Oxidative Stress—The Protective Role of Melatonin and Vitamin D. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5804, 13 ago. 2020.

OBRADOR, Elena *et al.* Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice. **Biomedicines**, v. 8, n. 11, p. 461, out. 2020.

OH, J.-M.; MYUNG, K. Crosstalk between different DNA repair pathways for DNA double strand break repairs. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 873, p. 503438, jan. 2022.

OKUMUS, Seydi *et al.* The effects of oral Ginkgo biloba supplementation on radiation-induced oxidative injury in the lens of rat. **Pharmacognosy magazine**, v. 7, n. 26, p. 141, 2011.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, n. 77, p. 185–200, 2013.

PATYAR, R. R.; PATYAR, S. Role of drugs in the prevention and amelioration of radiation induced toxic effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 819, p. 207–216, jan. 2018.

PERNOT, E. *et al.* Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 2, p. 258–286, out. 2012.

POURI, M. *et al.* Radioprotective Effect of Gliclazide as an Anti-Hyperglycemic Agent Against Genotoxicity Induced by Ionizing Radiation on Human Lymphocytes. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 40–46, 13 set. 2019.

PUJOL-CANADELL, M. *et al.* Cytogenetically-based biodosimetry after high doses of radiation. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0228350, 22 abr. 2020.

RAHGOSHA, S. *et al.* Evaluating the radioprotective effect of Cimetidine, IMOD, and hybrid radioprotectors agents: An in-vitro study. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 174, p. 109760, ago. 2021.

RAO, B. S. S. *et al.* Antioxidant, anticlastogenic and radioprotective effect of *Coleus aromaticus* on Chinese hamster fibroblast cells (V79) exposed to gamma radiation. **Mutagenesis**, v. 21, n. 4, p. 237–242, 2006.

ŠAMEC, D. *et al.* Biflavonoids: Important Contributions to the Health Benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). **Plants**, v. 11, n. 10, p. 1381, 23 maio 2022.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, maio 2014.

SHIVAPPA, P.; BERNHARDT, G. Natural radioprotectors on current and future perspectives: A mini-review. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 14, n. 2, p. 57, 2022.

SILVA, A. M. *et al.* Ginkgo biloba L. Leaf Extract Protects HepG2 Cells Against Paraquat-Induced Oxidative DNA Damage. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 556, dez. 2019.

SILVA, E. C. D. S.; CAVALCANTI, M. B.; CARNEIRO, P. F. P. Radioterapia versus Radiossensibilidade Individual. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 1, n. 3, p. 111-117, 2014.

SILVA, R. C. D.; SILVA, R. M. D.; AQUINO, K. A. D. S. The Interaction of Gamma Radiation with the Matter in the Process of Sterilization. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, 2014.

SINGH, B. *et al.* Biology and chemistry of Ginkgo biloba. **Fitoterapia**, v. 79, n. 6, p. 401–418, set. 2008.

TAUHATA, Luiz *et al.* Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, 2003.

THIERENS, Hubert; VRAL, Anne. The micronucleus assay in radiation accidents. **Ann Ist Super Sanita**, v. 45, n. 3, pág. 260-264, 2009.

UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, M. D. A. V. Teste de Micronúcleo um importante Biomarcador Celular. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 3851–3857, 2020.

VESNA, J. *et al.* Effects of fullerene nanoparticles and amifostine on radiation-induced tissue damages: Histopathological analysis. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 285–297, 1 nov. 2016.

VOGIN, G.; FORAY, N. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 89, n. 1, p. 2–8, jan. 2012.

VRAL, Anne; FENECH, Michael; THIERENS, Hubert. The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 11–17, 1 jan. 2011.

WANG, F. *et al.* Radio-protective effect and mechanism of 4-Acetamido-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl in HUVEC cells. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 22, n. 1, p. 14, dez. 2017.

WANG, J.; WANG, H.; QIAN, H. Biological effects of radiation on cancer cells. **Military Medical Research**, v. 5, n. 1, p. 20, dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. OFFICE OF OCCUPATIONAL HEALTH. **Biological monitoring of chemical exposure in the workplace: guidelines**. World Health Organization, 1996. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/41856>>. Acesso em: 21 ago. 2023.

YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57-67, 2009.

ZEEGERS, D. *et al.* Biomarkers of Ionizing Radiation Exposure: A Multiparametric Approach. **Genome Integrity**, v. 8, 2017.

ZHANG, S. *et al.* *Ginkgo biloba* extract protects human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress by activating Nrf2. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 8, p. 5193–5199, ago. 2019.

ZHAO, L. *et al.* The Determinant of DNA Repair Pathway Choices in Ionising Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–12, 25 ago. 2020.

ZUO, W. *et al.* Advances in the Studies of *Ginkgo biloba* Leaves Extract on Aging-Related Diseases. **Aging and disease**, v. 8, n. 6, p. 812, 2017.

ANEXOS

ANEXO A - Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da propriedade radioprotetora do extrato de Gingko biloba (egb 761) pela análise da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos do sangue periférico irradiado.

Pesquisador: Julio Cesar Gomes da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39932720.4.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.490.965

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de dissertação do Discente JÚLIO CÉSAR GOMES DA SILVA sob a orientação da Professora Isvânia Serafim da Silva Lopes vinculada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O projeto será realizado no Laboratório de Biofísica Celular e Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, em conjunto com o Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste. A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: Avaliação da concentração com o melhor efeito radioprotetor do extrato de Gingko biloba (egb 761), em linfócitos humanos do sangue periférico cultivados. Para este fim realizar-se-á um estudo usando amostras sanguíneas provenientes de voluntários saudáveis de ambos os sexos e maiores de 18 anos. Todos os voluntários serão avaliados via preenchimento de um questionário para coleta de dados sócio-demográficos e de seu estado geral de saúde. As amostras sanguíneas serão devidamente processadas, separadas em grupos específicos e apenas algumas delas serão submetidas a doses específicas de radiação. Posteriormente as amostras sanguíneas serão processadas adequadamente para separação dos linfócitos, e estes serão mantidos em cultura para posterior determinação dos danos celulares via a contagem do número de micronúcleos. Os critérios de inclusão e exclusão estão devidamente

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

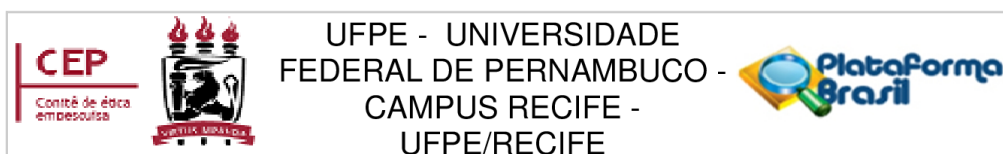
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.490.965

delineados.

Os dados serão analisados empregando critérios estatísticos adequados. Adicionalmente todos os dados serão mantidos em sigilo e armazenados por um período de 5 anos, sob a responsabilidade da Orientadora do discente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente estudo tem o objetivo de avaliar a concentração com o melhor efeito radioprotetor do extrato de Gingko biloba (egb 761), em linfócitos humanos do sangue periférico cultivados, comparando a frequência de micronúcleos após serem expostos à 2Gy de radiação gama.

Objetivo Secundário:

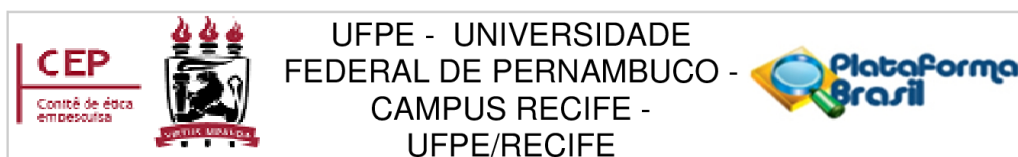
- Analisar as frequências de micronúcleos após a irradiação de sangue periférico frente às diferentes concentrações do extrato de egb 761;
- Avaliar o comportamento radioprotetor do extrato de egb 761 pela técnica de micronúcleos nas concentrações de 0,5, 10, 25, 50, 75, 100 e 1000mg/ml em sangue periférico tratado pré irradiação;
- Avaliar o comportamento radioprotetor do extrato de egb 761 pela técnica de micronúcleos nas concentrações de 0,5, 10, 25, 50, 75, 100 e 1000mg/ml em sangue periférico tratado pós irradiação;
- Comparar estatisticamente o índice de dispersão, distribuição celular e a variabilidade entre as diferentes amostras;
- Verificar estatisticamente a melhor concentração e momento de administração do extrato (pré ou pós irradiação) para o efeito radioprotetor do egb 761.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Em momento algum, o voluntário será exposto a quaisquer fontes radioativas. Os riscos inerentes à participação podem ser: (1) o constrangimento em não saber ou não querer responder a algum item do questionário; (2) durante a coleta, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, os voluntários poderão sentir uma ardência local e, eventualmente, após coleta, poderá se formar um hematoma, que desaparecerá em poucos dias. Esses riscos podem ser minimizados (1) realizando o questionário de forma individual e privada; e (2) utilizando compressa de gelo logo após a coleta. Há também a possibilidade de desistência de participação na pesquisa a qualquer momento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.490.965

Benefícios:

Quanto aos benefícios, a descoberta da concentração com melhor efeito radioprotetor irá impactar o conhecimento científico, tendo em vista que a evidenciação desta poderá ser utilizada em benefício do homem em casos de exposição ocupacional para minimizar os efeitos pós-exposição e na medicina nos casos de pré e pós-exposição dos pacientes que serão submetidos a procedimentos de medicina nuclear no diagnóstico e terapia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma temática atual e interessante para a população em geral e principalmente para indivíduos que ocupacionalmente podem ser expostos a radiação, pois, visa o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de métodos para mitigação dos danos ocasionados pela radiação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As cartas de anuências, termo de consentimento livre e esclarecido, termo de compromisso e confidencialidade e currículos estão devidamente apresentados. A folha de rosto está devidamente assinada, pela Diretoria do Centro de Biociências da UFPE. O orçamento de aproximadamente 43.000,00 reais será de responsabilidade do pesquisador principal. É frisado que a maior parte dos reagentes e equipamento já estão disponíveis nas Instituições participantes do projeto. O cronograma é compatível para a execução do projeto, e consta que a coleta de dados somente iniciará após aprovação pelo comitê de ética.

Recomendações:

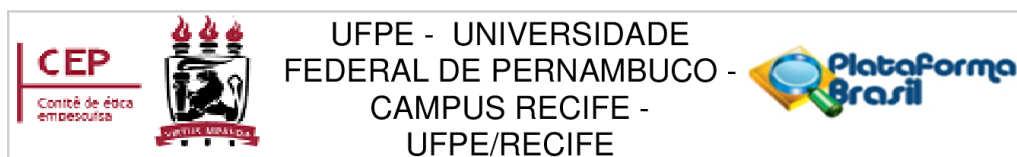
Sem Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências:

- 1- Existe uma discrepância com relação ao número de participantes voluntários da pesquisa, na Folha de Rosto esta determinado que serão 4 voluntários, enquanto no Projeto Detalhado, no capítulo Amostra de Voluntários, o pesquisador afirma que serão 2, sendo um do sexo masculino e outro do sexo feminino. Deve-se portanto uniformizar o número exato de participantes;
- 2- No Projeto Detalhado, capítulo Coleta de Amostras o pesquisador afirma que serão coletados 5ml de sangue periférico por punção venosa, já nas Informações Básicas na Plataforma Brasil informa que serão coletadas amostras de sangue periférico em um volume total de 135 ml de cada, por punção venosa, perfazendo um total de 9 coletas, o que daria 15ml por coleta, já no TCLE informa que serão 22,5ml por coleta o que daria 202,5ml no total, considerando as nove coletas. O pesquisador deve determinar a quantidade correta de sangue a ser coletado, unificando

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.490.965

em todos os documentos do projeto.

3. Delinear a metodologia empregada para determinação do tamanho da amostra (como chegou ao quantitativo de voluntários), justificando claramente quais critérios foram empregados que a limitam a apenas, sejam dois ou quatro voluntários já que não está claro no projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

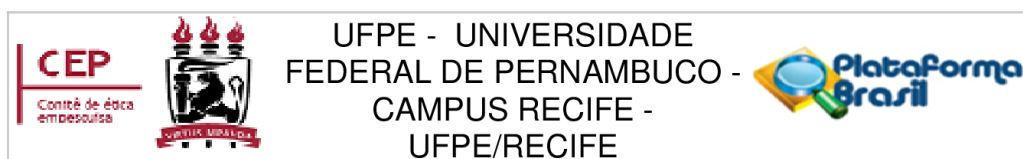
O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está em PENDÊNCIA. O (A) pesquisador (a) deverá atender as considerações do parecer consubstanciado que está anexado - veja "detalhar" - corrigindo as pendências diretamente na Plataforma, no Projeto detalhado e no TCLE, se for o caso. As modificações realizadas devem ser destacadas em amarelo.

É obrigatório anexar à parte, uma carta de RESPOSTA ÀS PENDÊNCIAS, informando onde foram feitas as correções (qual documento/item/página). Siga as instruções do link "Para resolver pendências", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. O (A) pesquisador (a) tem 60 dias para responder aos quesitos formulados pelo CEP em seu parecer. Após esse prazo, o projeto será considerado arquivado (res.466/12).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1629294.pdf	21/12/2020 15:24:20		Aceito
Outros	Cartarespostaaspendencias.docx	21/12/2020 15:23:31	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	21/12/2020 15:21:21	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGingkoComiteEticaJulioGomes.doc	21/12/2020 15:19:14	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Folha de Rosto	JULIOfolhaDeRosto.docx	21/12/2020 15:18:23	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Outros	CurriculoEduardaSantosSilva.pdf	09/11/2020 16:55:06	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Outros	CurriculoFabianaFariasdeLimaGuimaraes.pdf	09/11/2020 16:03:04	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Outros	CurriculoIolsvaniaMariaSerafimdaSilvaLopes.pdf	09/11/2020 16:01:49	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.490.965

Outros	CurriculoJulioCesarGomesdaSilva.pdf	09/11/2020 16:01:22	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidade.docx	09/11/2020 10:07:48	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciassvania.pdf	09/11/2020 10:07:28	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciaFabiana.pdf	09/11/2020 10:06:02	Julio Cesar Gomes da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

RECIFE, 06 de Janeiro de 2021

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE BIOCÊNCIAS DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Estudo da propriedade radioprotetora *in vitro* do extrato de *Ginkgo biloba* em linfócitos humanos do sangue periférico humano irradiado através da análise citogenética que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) (Júlio César Gomes da Silva), Departamento de Biofísica e Radiobiologia (UFPE), Primeiro andar no prédio do Centro de Ciências da Saúde, Av. da Engenharia, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 52171-011, (81) 2126-8535 / (81) 98672-7569 e-mail: julioxs888@gmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Eduarda Santos Silva, e-mail: eduardasts@outlook.com e Fabiana Farias de Lima Guimarães, e-mail: fflima@cnen.gov.br Telefones para contato: (81) 99832- 4550) (81) 3797-8024) e está sob a orientação de Isvânia Serafim da Silva Lopes Telefone para contato (81) 2126-853, e-mail: isvania@gmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- **Descrição da pesquisa e esclarecimento da participação:** O presente estudo tem o objetivo de avaliar a concentração com o melhor efeito radioprotetor do extrato de *Ginkgo biloba*, em linfócitos humanos do sangue periférico cultivados, comparando a frequência de micronúcleos e cromossomos dicêntricos após serem expostos à 2Gy de radiação gama. Tal pesquisa é necessária, pois, diariamente, sejam por motivos médicos ou ocupacionais, a população é cada vez mais exposta às radiações, sendo necessário um estudo mais aprofundado que forneça informações que possam ser correlacionadas com os possíveis danos causados aos indivíduos. Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer amostras de sangue (135 ml), por punção venosa, em tubos de vacutainers contendo EDTA, que serão obtidas parcialmente (15 ml por coleta) em nove diferentes punções venosas com intervalo mínimo de 1 semana, após assinatura deste termo. Seu material será usado exclusivamente para efeito desta pesquisa. O(a) Sr(a), também responderá um questionário para verificação do seu estado geral de saúde, apontando se nos últimos seis meses antes da coleta houve alguma exposição à radiação terapêutica ou raios X diagnóstico; aplicação de vacinas; ou consumo de drogas ilícitas. Essas informações são necessárias, pois os fatores citados podem alterar os resultados. Vale ressaltar que esse questionário será respondido de forma individual e particular para evitar qualquer tipo de constrangimento.
- **RISCOS:** Os riscos inerentes à participação podem ser: (1) o constrangimento em não saber ou não querer responder a algum item do questionário, caso a amostra seja considerada apta para pesquisa (2) durante a coleta, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, os voluntários poderão sentir uma ardência local e, eventualmente, após coleta, poderá se formar um hematoma, que desaparecerá em poucos dias. Esses riscos podem ser minimizados (1) realizando o questionário de forma individual e privada; e (2) utilizando compressa de gelo logo após a coleta. Há também a possibilidade de desistência de participação na pesquisa a qualquer momento. Ressaltamos que, em momento algum, o(a) senhor(a) será exposto(a) a quaisquer fontes radioativas.
- **BENEFÍCIOS diretos/indiretos** para os voluntários: O benefício direto ao voluntário será de fornecer a informação dos níveis de background espontâneo que o mesmo possui. Essa informação será enviada pós análise aos doadores por meio de um documento/carta padrão via correio ou e-mail. No caso dos indiretos, os laboratórios de dosimetria biológica do CRCN/NE e de Biofísica molecular do Departamento de Biofísica e Radiobiologia DBR/UFPE localizado no Estado. Com a implementação desta técnica, será possível expandir a conhecimento sobre os níveis de radiosensibilidade dos indivíduos, contribuindo ainda mais para a melhoria do uso da radiação tanto para tratamento e diagnóstico quanto para o uso industrial.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa tais como os questionários e os resultados das análises citogenéticas, ficarão armazenados em pastas de arquivos do próprio centro de pesquisa –Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE, sob a responsabilidade da pesquisadora Isvânia Serafim da Silva Lopes no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos. Após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do “Estudo da propriedade radioprotetora *in vitro* do extrato de *Ginkgo biloba* em linfócitos humanos do sangue periférico humano irradiado através da análise citogenética”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C – Modelo do Questionário de Seleção de Doadores

Modelo do Questionário de Seleção de Doadores

I - DADOS PESSOAIS

1.2 N° do Voluntário: _____

1.3 Sexo: M [0] F [1] 1.4 Data de Nascimento ____/____/____ 1.5 Data de hoje ____/____/____

1.6 Estado civil:

Solteiro[0]; Casado[1]; Viúvo[2]; Divorciado[3]; Separado[4];
Outros [5]

1.7 Cargo: _____ Função: _____

1.8 Grau de Instrução (escolaridade):

[1] não estudou / Primário Incompleto

[2] primário Completo / Ginásial Incompleto

[3] ginásio Completo / Colegial Incompleto

[4] colegial Completo / Superior Incompleto

[5] superior Completo / Pós-Graduação Incompleta

[6] pós-Graduação Completa

1.9 Indique nos espaços abaixo a **QUANTIDADE** de itens que existem em sua residência:

Quantos

Quantos

Quantos

[] automóvel

[] rádio

[] máquina de lavar roupa

[] banheiro

[] videocassete

[] empregada mensalista

[] aspirador de pó

[] geladeira

[] TV em cores

Total de Pessoas na Família: []

II - INDICADORES GERAIS DE SAÚDE

2.1 Com relação ao fumo, marque a resposta apropriada para o seu caso:

[1] nunca fumei

[5] fumo de dez a vinte cigarros por dia

[2] parei de fumar há mais de dois anos

[6] fumo mais que vinte cigarros por dia

[3] parei de fumar a menos de dois anos

[7] só fumo charuto ou cachimbo

[4] fumo menos de dez cigarros por dia

2.2 Quantos "drinques" você toma **POR SEMANA**: (um drink = 1/2 garrafa de cerveja, um copo de vinho ou uma dose de destilado)

[1] nenhum
mais que dez

[2] menos que três

[3] cinco a dez

[4]

2.3 Com que frequência você consegue dormir "bem" (7 - 8 horas por noite):

[1] sempre [3] tenho dificuldade para dormir "bem"

[2] maioria das vezes [4] raramente consigo dormir "bem"

2.4 Você acorda descansado?

[1] sim [2] não

2.5 No final da jornada de trabalho você se sente (física e mentalmente)?

[1] bem [2] cansado [3] pouco cansado

2.6 Você está satisfeito com o seu peso?

[1] sim [2] não (gostaria de aumentar) [3] não (gostaria de diminuir)

III - ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL

Para cada questão, responda somente **UMA** alternativa.

ATIVIDADES OCUPACIONAIS DIÁRIAS

3.1 Eu geralmente vou e volto do trabalho caminhando ou de bicicleta (pelo menos 800 metros cada percurso):

[1] sim [2] não

3.2 Eu geralmente vou e volto do trabalho de carro: [1] sim [2] não

3.3 Eu geralmente uso escadas ao invés do elevador: [1] sim [2] não

3.4 Minhas atividades físicas diárias podem ser descritas como:

[1] Passo a maior parte do tempo sentado(a) e, quando muito, caminho de um lugar próximo para o outro.

[2] Na maior parte do dia realizo atividades físicas moderadas, como caminhar rápido, executar tarefas que requerem movimentação.

[3] Diariamente executo atividades físicas intensas por várias horas (trabalho pesado, como jardinagem, construção, limpeza, transporte de cargas, esportes, etc...)

IV - QUESTIONÁRIO DE SAÚDE FÍSICA

4.1 Como você classificaria seu estado de saúde atual?

Ruim	1	Regular	2	Bom	3	Excelente	4
------	---	---------	---	-----	---	-----------	---

4.2 Queixa Principal: _____ []

Antecedentes Pessoais:

	nunca	Já sofreu antes	sofre atual- mente	Desde há ANOS / MESES	Sob Tratamento SIM NÃO
--	-------	-----------------------	--------------------------	---------------------------------	-------------------------------

4.6 Gastrite/Ulcera	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.7 Bronquite/Asma	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.9 Dor no peito aos esforços	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.10 Infarto/Revascularização/Angioplastia	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.11 Hipertensão	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.12 AVC (derrame)	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.13 DST - Dça. sexualmente transmissível	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.14 Infecções urinárias de repetição	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.16 Incontinência urinária	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.20 Dores ou rigidez articulares	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.21 Diabetes mellitus	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.22 Alergias	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.23 Convulsões	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.24 Depressão	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4
4.25 Câncer	0	1	2	<u> a </u> <u> m </u>	3	4

7.27 Cáries a tratar ? Sim [1] Não [2]

7.28 História Familiar:

Possui na família PAI, MÃE ou IRMÃOS que apresentam ou apresentaram:

[1] Angina, Infarto ou morte súbita antes dos 50 anos []

[2] Angina, Infarto ou morte súbita após os 50 anos [] [3] Diabetes []

[4] Pressão alta ou AVC [] [5] Não sabe [6]

Nenhum

[7]Outros:_____

O Srº(a) foi submetido a qualquer procedimento envolvendo o uso de radiação nos últimos seis meses? Sim [1] Não [2]

O Sr^o(a) recebeu qualquer tipo de vacinação nos últimos seis meses? Sim [1] Não [2]

Qual? _____

V - QUESTIONÁRIO DE ESTRESSE FISIOLÓGICO

Os sintomas físicos do estresse são excelentes indicadores numa avaliação. O seguinte questionário nos ajudará a ter uma idéia da severidade do estresse que você está experimentando na sua vida diária, gerando alterações no funcionamento normal de seu organismo. Responda cada número entre 0 e 5, usando a escala abaixo:

0 = nunca 1 = uma a 2 vezes ao ano

2 = quase todos os meses 3 = quase todas as semanas

4 = uma ou mais vezes por semana 5 = diariamente

SINTOMAS CARDIOVASCULAR	SINTOMAS DA PELE
___ taquicardia	___ acne
___ batidas vigorosas e descompassadas do coração	___ caspa
___ mãos suadas e frias	___ transpiração
___ dores ou pontadas na cabeça	___ ressecamento excessivo da pele ou cabelo
SINTOMAS RESPIRATÓRIOS	SINTOMAS IMUNOLÓGICOS
___ respiração rápida ou irregular, ou curta	___ coceira/ardência
___ falta de ar	___ resfriado
___ ataque de asma	___ gripes fortes
___ dificuldade de falar, por pouco controle da respiração	___ rachaduras na pele
SINTOMAS GASTROINTESTINAIS	SINTOMAS METABÓLICOS
___ indisposição estomacal, náuseas e vômitos	___ aumento do apetite
___ constipação	___ aumento da ansiedade por fumo e doces
___ diarreia	___ preocupação generalizada e dificuldade para dormir
___ dor abdominal aguda	
SINTOMAS MUSCULARES	
___ dor de cabeça (dor contínua)	
___ tremores musculares e das mãos	
___ artrites	