



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Histologia e Embriologia
Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia**

Estudo da propriedade radioprotetora *in vitro* do extrato de *Gingko biloba* através da análise citogenética de linfócitos humanos do sangue periférico irradiado

Júlio César Gomes da Silva

Recife

2023

Júlio César Gomes da Silva

Estudo da propriedade radioprotetora *in vitro* do extrato de *Gingko biloba* através da análise citogenética de linfócitos humanos do sangue periférico irradiado

Projeto, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, do Departamento de Histologia e Embriologia no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para o grau de mestre em morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfotecnologia

Orientação: Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Coorientação: Prof.^a Dr.^a Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes e Dr.^a Fabiana Farias de Lima

Recife

2023



.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Júlio César Gomes da.

Estudo da propriedade radioprotetora in vitro do extrato de Ginkgo biloba através da análise citogenética de linfócitos humanos do sangue periférico irradiado / Júlio César Gomes da Silva. - Recife, 2023.

64f.: il.

Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, 2024.

Orientação: Ivone Antônia de Souza.

Coorientação: Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes.

Coorientação: Fabiana Farias de Lima.

1. Radiação ionizante; 2. Radioprotetores; 3. Ginkgo biloba; 4. Dosimetria biológica. I. Souza, Ivone Antônia de. II. Lopes, Isvânia Maria Serafim da Silva. III. Lima, Fabiana Farias de. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar sabedoria e discernimento para conduzir este projeto. Não foi fácil desenvolver pesquisas durante o ano de pandemia, e com os aeroportos fechados e dificuldades para entrega de reagentes, foram necessários enormes esforços, onde gostaria de registrá-los aqui.

Agradeço a minha super equipe de orientadoras: Profa Dra Ivone Antônia, que me abraçou e apoiou o meu projeto, à Profa Dra Isvânia Maria Serafim, por toda ajuda prestada, e a Dra Fabiana Farias, a qual eu devo agradecer de coração por toda colaboração e apoio durante esses anos.

Também deixo registrado os meus sinceros agradecimentos a toda equipe do Laboratório de Dosimetria Biológica, Fernanda, Gael, Laís, Rimaud, Suy e em especial à Amanda, Eduarda e Mariana, que passaram horas me ajudando nos experimentos, sem vocês não seria possível.

Agradeço aos meus pais Andréia e Luciano, meu irmão Pedro e familiares, por todo incentivo e apoio de diversas maneiras para que conseguisse concluir esta etapa. Agradeço ao meu namorado Péricles que ficou horas na frente do laboratório para me ajudar com as amostras, e aos meus amigos que compreenderam as minhas ausências e nunca deixaram de me incentivar.

Por fim, gostaria de agradecer a CAPES, pelo apoio financeiro fornecido a esta pesquisa e a Universidade Federal de Pernambuco, no âmbito do Programa de Pós Graduação em Morfotecnologia por todo conhecimento adquirido.



“Não podemos esperar construir o mundo melhor sem melhorar as pessoas. Cada um de nós deve trabalhar para o nosso próprio aprimoramento” Marie Curie

RESUMO

Um radioprotetor pode ser definido como um agente químico ou droga capaz de diminuir o dano biológico provocado pela radiação, resultante de alterações cromossômicas, convencionalmente identificadas através de algumas técnicas, sendo duas delas a análise citogenética de cromossomos dicêntricos e a técnica de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular (CBMN - Cytokinesis-Block Micronucleus). Os radioprotetores atuam na captura dos radicais livres com efeito antioxidante. Quando administrados no organismo, atuam diminuindo os sintomas pós-exposição. O presente estudo tem o objetivo de avaliar o efeito radioprotetor *in vitro* do extrato de *Ginkgo biloba* em diferentes concentrações em linfócitos humanos do sangue periférico expostos à dose absorvida de 2Gy de radiação gama por meio da técnica citogenética convencional de cromossomos dicêntricos e técnica de micronúcleos por bloqueio da citocinese celular. Um voluntário saudável e não fumante foi selecionado, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Neste estudo, as amostras foram expostas à fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacel 220), localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE), com dose absorvidas de 2,0Gy. As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir das culturas de linfócitos, onde o extrato de *Ginkgo biloba* foi aplicado em diferentes concentrações nas culturas preparadas. As concentrações de 0,025 mg/ml e 0,05mg/ml do extrato de *Ginkgo biloba* foram capazes de reduzir a frequência de cromossomos dicêntricos e micronúcleos. O teste ANOVA revela uma observação importante quando comparadas as amostras irradiadas e não irradiadas, na qual as análises de dicêntricos obtiveram um valor de ($p < 0,05$), que representa significância estatística, esta diferença é detalhada através do teste de Tukey que mostra entre os grupos irradiador sem Ginkgo (I-0,0) e com o grupo tratado (I-0,025), para as amostras de micronúcleo, não houve relevância estatística significativa ($p > 0,05$). Quando analisadas de forma individual através do teste de Tukey, se observa diferença entre os grupos que não foram tratados com o extrato de Ginkgo (I-0,0) e o grupo tratado (I-0,025), bem como com os grupos (I-0,0 x I-0,05). Com isso foi possível observar que o extrato de *Ginkgo biloba*, foi capaz de reduzir o dano radioinduzido, no entanto, mais estudos com um número maior de células devem ser realizados.

Palavras chaves: Radiação ionizante. Radioprotetores. *Ginkgo biloba*. Dosimetria Biológica.



ABSTRACT

A radioprotector can be defined as a chemical agent or drug capable of reducing the biological damage caused by radiation, resulting from chromosomal alterations, conventionally identified through some techniques, two of which are the cytogenetic analysis of dicentric chromosomes and the micronucleus (MN) technique. with blocking of cell cytokinesis (CBMN - Cytokinesis-Block Micronucleus). Radioprotectors act to capture free radicals with an antioxidant effect. When administered to an organism, they work to lessen post-exposure symptoms. The present study aims to evaluate the in vitro radioprotective effect of *Ginkgo biloba* extract at different concentrations in human peripheral blood lymphocytes exposed to the absorbed dose of 2Gy of gamma radiation through the conventional cytogenetic technique of dicentric chromosomes and the micronucleus technique by blocking cellular cytokinesis. A healthy, non-smoking volunteer was selected after signing the Informed Consent Form. In this study, the samples were exposed to a ^{60}Co source (Gammacel 220 irradiator), located at the Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE), with an absorbed dose of 2.0Gy. Cytological preparations for chromosomal analysis will be obtained from lymphocyte cultures according to a standard protocol, where *Ginkgo biloba* extract was applied at different concentrations in the prepared cultures. Proven by statistical analysis, such as the u test and the Poisson distribution; The concentrations of 0.025 mg/ml and 0.05 mg/ml of *Ginkgo biloba* extract were able to reduce the frequency of dicentric chromosomes and micronuclei. The ANOVA test reveals an important observation when comparing the irradiated and non-irradiated samples, in which the dicentric analyzes obtained a value of ($p < 0.05$), which represents statistical significance, this difference is detailed through the Tukey test that shows between the irradiator groups without *Ginkgo* (I-0.0) and with the treated group (I-0.025), for the micronucleus samples, there was no statistically significant significance ($p > 0.05$). When analyzed individually through the Tukey test, a difference is observed between the groups that were not treated with *Ginkgo* extract (I-0.0) and the treated group (I-0.025), as well as between the groups (I -0.0 x I-0.05). it was possible to observe that the *Ginkgo biloba* extract was able to reduce radioinduced damage, however, more studies with a greater number of cells must be carried out.

Key words: Radiation. Radioprotectors. Micronucleus. *Ginkgo biloba*. Biologyc Dosimetry



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Interação da radiação com a matéria. **A-** Efeito Compton. **B-** Efeito Fotoelétrico. **C-** Produção de pares Pág. 17
- Figura 2.** Ação direta e indireta da radiação Pág. 18
- Figura 3.** Principais formas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fatores que levam a produção de radicais livres e potenciais alvos celulares para danos por estresse oxidativo Pág.22
- Figura 4.** Visão geral generalizada das vias de apoptose extrínseca e intrínseca Pág. 23
- Figura 5.** Alterações Cromossômicas. **A:** Metáfase com dois dicêntricos (Dic) e dois fragmentos (Frag.)/ **B:** Metáfase com um anel e um fragmento Pág. 26
- Figura 6.** A formação dos MNs de cromossomos inteiros atrasados e de fragmentos acêntricos na anáfase Pág. 28
- Figura 7.** Célula binucleada com um micronúcleo disperso em seu citoplasma linfocitário Pág. 28
- Figura 8.** Folhas de *Ginkgo biloba* Pág. 32
- Figura 9.** Viabilidade celular obtida pelo teste colorimétrico MTT Pág. 39
- Figura 10.** Intercomparação entre as frequências controles e testes de amostras de dicêntricos e micronúcleos Pág. 48



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da exposição aguda de corpo inteiro a radiação ionizante	Pág. 20
Tabela 2. Mecanismos de ação dos radioprotetores	Pág. 30
Tabela 3. Frequência e distribuição das alterações cromossômicas estáveis	Pág. 40
Tabela 4. Distribuição intracelular por tipos de alterações	Pág. 41
Tabela 5. Comparação das frequências de dicêntricos com a literatura	Pág. 42
Tabela 6. Análise estatística da variabilidade das amostras por ANOVA e Tukey para amostras de dicêntricos	Pág. 44
Tabela 7. Comparação da frequência de micronúcleos entre o sangue irradiado e o sangue irradiado tratado com o extrato de <i>Gingko biloba</i>	Pág. 45
Tabela 8. Análise da frequência de micronúcleos frente a literatura	Pág. 46
Tabela 9. Análise estatística da variabilidade das amostras por ANOVA e Tukey para amostras de micronúcleos	Pág.47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBMN - Cytokinesis-Block Micronucleus

CNEN- Comissão Nacional de Energia Nuclear

CRCN-NE- Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste

DSB's - Quebra dos filamentos duplos do DNA

Egb761- Extrato de *Ginkgo Biloba* 761

GBLE- extrato de folhas de *Ginkgo biloba*

GHz- GigaHertz

Junções GAP- Junções intercelulares comunicantes

IAEA- International Atomic Energy Agency

IC- Intervalo de Confiança

LET- Transferência Linear de Energia

MeV- equivalência entre massa e energia

MN - Micronúcleo

MTT- (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

rad- unidade de irradiação absorvida

rem- Dose equivalente em mamíferos

SSB's- Quebra de filamento simples do DNA

UFPE- Universidade Federal de Pernambuco

UV-B- Raios Ultravioletas do tipo B

γ - Radiação Gama

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	13
3. HIPÓTESE	14
4. PERGUNTA CONDUTORA	15
5 REVISÃO DE LITERATURA	16
5.1 A Radiação Eletromagnética Ionizante	16
5.2 Efeitos Biológicos da Radiação.	17
5.2.1 Efeitos Determinísticos	19
5.2.2 Efeitos Estocásticos	20
5.3 Estresse oxidativo	21
5.4 Vias de reparo ao dano celular radioinduzido	22
5.5 Radiossensibilidade Celular	24
5.6 O linfócito humano	25
5.7 Técnica de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese Celular	27
5.8 Radioprotetores	29
5.9 <i>Ginkgo biloba</i>	32
6. METODOLOGIA A SER EMPREGADA	34
6.1. Desenho da Pesquisa	34
6.2. Local da Pesquisa	34
6.3. Recrutamento de voluntários	35
6.4. Coleta das amostras e distribuição dos grupos	35
6.4.1. Grupos controles	35
6.4.2. Grupo irradiado tratado com extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	36
6.5. Viabilidade Celular	36
6.8. Cultivo de células	37
6.9. Análise microscópica e estatística	38
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO	48
Referências	49
ANEXO I	58
ANEXO II	62

1 INTRODUÇÃO

Um radioprotetor pode ser definido como um agente químico ou droga capaz de diminuir o dano biológico provocado pela radiação, sendo estes atuantes na captura dos radicais livres promovendo efeito antioxidante. Quando administrados a um organismo, eles atuam diminuindo os sintomas pós-exposição. (MANZI *et. Al.*, 2003).

No final do século XIX, com a utilização em benefício do homem, os efeitos das radiações ionizantes na saúde humana tornaram-se evidentes. Ao longo da história, estes efeitos vêm sendo identificados e descritos, principalmente, a partir de situações nas quais o homem encontrava-se exposto de forma aguda (acidentes e uso médico) (NOUAILHETAS *et Al.*, 2015).

Um dos efeitos identificados são as alterações cromossômicas resultante do DNA mal reparado ou de rupturas de filamentos duplos (DSB). Essas alterações cromossômicas podem ser identificadas por meio de algumas técnicas citogenéticas, sendo duas delas mais comuns: a análise citogenética convencional de cromossomos dicêntricos (POHL-RÜLING, 1992, IAEA, 2011) e a técnica de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular (CBMN - Cytokinesis-Block Micronucleus) (THIERENS & VRAL, 2009). Como essas alterações fornecem uma medida do dano, tornam-se respostas biológicas muito sensíveis à dose absorvida de radiação, sendo utilizadas como marcadores biológicos para a estimativa de dose absorvida na Biodosimetria.

Devido ao avanço da utilização das radiações ionizantes, tornou-se maior a necessidade de descobrir substâncias radioprotetoras, isto é, com caráter antioxidante, que fossem capazes de reduzir ou até proteger as células do dano causado por essas radiações (SIQUEIRA, 2018).

Em 1946, um ano após a explosão da bomba em Hiroshima, enquanto tudo parecia morto, uma árvore de *Gingko biloba* voltou a brotar durante a primavera, diante de um templo completamente destruído à sua frente (DEL-CASTILLO e PASTOR, 2013).

A partir disso, vários estudos com o extrato de Gingko vêm demonstrando a diminuição do estresse oxidativo em células perturbadas por radiações ionizantes e não ionizantes,

principalmente em tratamentos de distúrbios neurológicos, doença de Graves e testes citológicos e genotóxicos em células de ratos (GABY, 1996; DARDANO, 2007; HUANG, 2005; ESMEKAYA, 2011).

Assim, o estudo da propriedade radioprotetora do extrato de *Gingko biloba*, se faz importante e surge como uma possibilidade para beneficiar indivíduos expostos de forma acidental ou não à radiação ionizante.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito radioprotetor *in vitro* do extrato de *Gingko biloba* em linfócitos humanos do sangue periférico expostos à radiação gama por meio da análise citogenética de cromossomos dicêntricos e da técnica de micronúcleo por bloqueio da citocinese celular.

2.2 Específicos

- Analisar a frequência de micronúcleo em linfócitos humanos de sangue periférico exposto a uma dose absorvida de 2 Gy de radiação gama, incubados em diferentes concentrações de *Gingko biloba*.
- Analisar a frequência de dicêntricos em linfócitos humanos de sangue periférico exposto a uma dose absorvida de 2 Gy de radiação gama, incubados em diferentes concentrações de *Gingko biloba*.
- Analisar a viabilidade celular através da técnica colorimétrica MTT em diferentes concentrações de *Gingko biloba*;
- Verificar se o extrato de *Gingko biloba* possui propriedade radiomitigadora e sugerir a melhor concentração.

3. HIPÓTESE

O extrato de *Gingko biloba* possui efeito radioprotetor terapêutico em linfócitos humanos do sangue periférico expostos à radiação ionizante.

4. PERGUNTA CONDUTORA

Alguma concentração do extrato de *Ginkgo biloba* possui propriedade radioprotetora terapêutica em linfócitos humanos do sangue periférico depois da exposição à radiação ionizante?

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 A Radiação Eletromagnética Ionizante

A radiação se encontra presente em nosso planeta, desde a sua formação, sendo assim, considerada um componente natural do ambiente terrestre. Nos primórdios, as taxas de exposição às radiações eram incompatíveis com a vida, mas no decorrer do tempo, os átomos instáveis foram se tornando mais estáveis, por meio da liberação do excesso de energia presentes em seus núcleos. Esta energia liberada é altamente ionizante, isto é, possui a capacidade de interagir com a matéria, arrancando elétrons de seus átomos, modificando moléculas (NOUAILHETAS, 2005).

Os Raios-X e gama (γ) são radiações eletromagnéticas ionizantes, pois possuem energia suficiente para ionizar átomos. Estes fótons transferem sua energia de forma total ou parcial para elétrons que podem se desestabilizar e ser ejetados dos átomos alvo. Estes elétrons, por sua vez, saem ionizando outros átomos até que suas energias se extingam. Na radiobiologia, é considerada uma radiação ionizante os fótons com energia maior do que 10eV (OKUNO, 2013; OKUNO, 2018).

Essas radiações não possuem carga nem massa, pois não se trata de radiação particulada. Suas ondas eletromagnéticas são altamente penetrantes e atravessam facilmente o corpo humano, podendo interagir com moléculas importantes das diferentes células do organismo (QUINDEEL, 2017; DOROW e MEDEIROS, 2019). É sabido que a radiação eletromagnética interage de diversas formas com a matéria, no entanto três mecanismos são de maior relevância: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares (Figura 1).

No efeito Compton (Figura 1A), o fóton incidente é espalhado por um elétron de baixa energia de ligação, que recebe parte de sua energia, e continua sua trajetória dentro do material em outra direção com uma energia menor. Quando essa energia de ligação dos elétrons é desprezível comparada à energia do fóton incidente, a probabilidade de ocorrência do efeito Compton aumenta consideravelmente. (MORAES, 2020; CARUSO e OGURI, 2021).

O efeito fotoelétrico (Figura 1B) é caracterizado pela transferência total da energia da radiação X ou gama (que desaparece) a um único elétron orbital, que é ejetado com uma energia cinética bem definida. Esse efeito é predominante para radiações de baixas energias e para alvos (elementos químicos) com elevado número atômicos (CARUSO e OGURI, 2021;

TOMAZ, 2019; ASSIS e PEIXOTO, 2020).

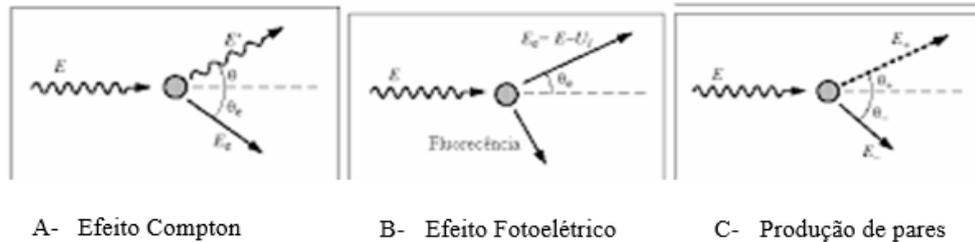


Figura 1. Interação da radiação com a matéria. **A-** Efeito Compton. **B-** Efeito Fotoelétrico. **C-** Produção de pares.

Fonte: (Adaptado de ARAUJO. A. I. L., 2006).

No caso de a radiação incidente possuir energia superior a 1,022MeV e passar perto de núcleos de número atômico elevado, ela interage com o campo elétrico nuclear, desaparece e dá origem a um par elétron-pósitron. Esse é o chamado efeito de produção de pares (Figura 1C). Posteriormente, o pósitron volta a se combinar com um elétron do meio e dá origem a dois fótons com energia de 511keV cada. (BUSHONG, 2010; BUSHONG, 2017).

As interações fotoelétricas ocorrem predominantemente em todos os materiais em energias fotônicas baixas e, à medida que a energia cresce, diminui a probabilidade de efeito fotoelétrico e aumenta rapidamente a probabilidade de efeito Compton e, então, este acaba se tornando o efeito predominante. Porém, se continua ocorrendo aumento da energia fotônica, a probabilidade de efeito Compton diminui absolutamente e, para fótons com energias aproximadamente acima de 5 MeV, a produção de pares passa a ser a principal interação de fótons (TOMAZ, 2019).

5.2 Efeitos Biológicos da Radiação.

O principal efeito biológico causado pela radiação ionizante é a interação com o material genético presente no núcleo das células, promovendo danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) de forma direta ou indireta (Figura 2), como quebras simples em uma das fitas (SSB's) ou em suas duplas fitas (DSB's), resultando em diferentes respostas biológicas (SILVA, et. al, 2002; BARNES, et. al., 2018).

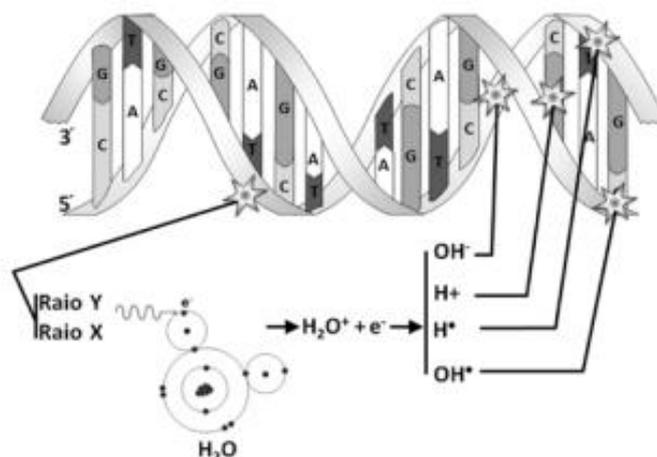


Figura 2. Ação direta e indireta da radiação na molécula do DNA.

Fonte: BONATO & ELNECAVE, 2011.

A lesão direta do DNA promove a quebra de suas ligações estruturais. Na lesão indireta, há deslocamento de elétron (e^-) da molécula de água (H_2O), que se torna um íon água positivo (H_2O^+). O elétron reagirá com outra molécula de água formando H_2O^- , que se dissocia em íon hidroxila (OH^-) e radical livre hidrogênio (H^\bullet). O íon água positivo (H_2O^+) se dissocia em íon hidrogênio positivo (H^+) e radical livre hidroxila (OH^\bullet). Os íons e radicais livres são altamente reativos com as estruturas celulares, inclusive o DNA (BONATO; ELNECAVE, 2011; MUN et. al., 2018).

Esta ação indireta é de grande relevância, tendo em vista que a radiação na maioria das vezes interage desta forma, pelo fato de o corpo humano ser composto por mais de 70% de água (OKUNO, 2013).

A capacidade de reparação bem-sucedida do DNA devolve o estado celular original, saudável, caso contrário, a sinalização celular para apoptose é a hipótese mais segura para manutenção da homeostasia, pois um reparo mal-sucedido pode perpetuar na divisão celular e levar futuramente à formação de tumores malignos. (ALMEIDA, 2007).

Assim, a interação da radiação pode ser subdividida em estágios: Físico, quando ocorre a transferência de energia e a ionização (desprendimento dos elétrons do átomo), com as quebras das ligações químicas; químico, quando ocorre a busca pela mobilização e neutralização dos íons e radicais livres e restauração do equilíbrio químico; biológico

caracterizado pelo aparecimento e busca da restauração de danos bioquímicos e fisiológicos com presença de alterações morfológicas em tecidos ou órgãos; e orgânico, quando surgem os sintomas e as doenças no indivíduo irradiado.

Essa interação biológica pode resultar em dois tipos de efeitos, sendo eles os efeitos determinísticos e os efeitos estocásticos (DE LIMA, et. al., 2020).

5.2.1 Efeitos Determinísticos

Os efeitos determinísticos são aqueles causados, após exposição a doses elevadas, por certo grau de morte celular não compensado por reparo ou reposição, acarretando prejuízo funcional de tecidos ou órgãos. Assim, quando um indivíduo se expõe à radiação ionizante por um período prolongado, uma grande quantidade de células e tecidos serão afetados e como consequência aparecem os efeitos agudos à exposição (OKUNO, 2018). Um dos efeitos é a lesão celular irreversível, sendo caracterizada por necrose tecidual, e ocorre porque alguma mutação engatilhada pela exposição do núcleo celular à radiação desencadeia estímulos que são enviados através de junções GAP celulares, gerando danos recorrentes no tecido circunvizinho (RODRIGUES et. al., 2019).

Para este efeito, existe um limiar de dose abaixo do qual a perda de células é insuficiente para acarretar dano detectável no tecido ou órgão. Isto significa que esses efeitos são produzidos por doses elevadas, acima de um limiar, onde a severidade do dano está relacionada com o aumento da dose.

Geralmente, esses efeitos são agudos e aparecem, dentro de algumas horas após exposição à radiação, como as radiodermites, ou ao passar de algumas semanas, como eritema e descamação seca. Isto vai depender da dose e da taxa de dose absorvida a que o indivíduo foi exposto, do tempo de exposição e se a exposição foi aguda ou fracionada. Por exemplo, no caso da pele, a descamação seca costuma surgir após exposição com doses absorvidas entre 3 e 5 Gy; já a descamação úmida com bolhas, para doses acima de 20 Gy Também podem ser observados diferentes efeitos em gônadas (esterilidade temporária ou irreversível) e cristalino (opacidade detectável e catarata), a depender da dose absorvida e/ou tipo de exposição (TAHUATA, 2014).

Com uma exposição aguda de corpo inteiro, o indivíduo irradiado geralmente só começa a apresentar os efeitos somáticos, de maneira imediata, a partir da dose absorvida aproximada de 4Gy (GONÇALO & BOTELHO, 2007), como observado na tabela 1.

Tabela 1. Efeitos da exposição aguda de corpo inteiro a radiação ionizante.

Dose Gray	Resultado
0,25	Não há efeitos clínicos detectáveis
0,50	Ligeiras alterações sanguíneas
1	Alterações hematológicas
2	Alterações hematológicas, náuseas, vômito e fadiga
4	Alterações hematológicas graves, náuseas ligeiras, vômito, fadiga, anorexia, diarreia, morte de 50% dos indivíduos irradiado em duas a seis semanas (DL50)
7	Morte em uma a duas semanas para exposição de corpo inteiro

Fonte: Adaptado de Gonçalves e Botelho, 2007.

5.2.2 Efeitos Estocásticos

Diferentemente dos efeitos determinísticos, os estocásticos não possuem um limiar de dose absorvida, baseando-se em uma probabilidade de ocorrência do efeito com a dose. No entanto, quanto maior for a dose absorvida, aumenta-se a probabilidade de que o efeito ocorra. Isto significa que com exposição a doses absorvidas baixas, ou até mesmo abaixo dos limites estabelecidos por normas e regulamentos nacionais e internacionais, um efeito estocástico pode surgir (LEITE, et. al., 2020). Entre esses efeitos, destaca-se o câncer.

A probabilidade para surgimento de um câncer radioinduzido depende numericamente da quantidade em que clones de células foram radiomodificadas no tecido ou órgão, já que o aparecimento do mesmo depende da sobrevivência de ao menos uma destas células para garantir uma progressividade cancerígena, no qual o período para detecção do mesmo pode chegar a quarenta anos, com exceção da leucemia que geralmente aparece cinco anos após. (TAHUATA, 2014).

Além disso, a radiação pode resultar em danos para células reprodutivas

(espermatozoides e óvulos) de um indivíduo irradiado, a ponto de que este possa repassar o dano para os filhos e/ou gerações posteriores (YUSHKOVA, 2020). Isto porque o DNA compõe todas as informações genéticas de um indivíduo, a qual é transferida para geração seguinte. Por isso é de extrema importância manter as características bases das sequências de DNA que codificam um peptídeo (genes). Porém, o núcleo celular é um dos componentes citoplasmáticos mais afetados quando expostos a radiação ionizante. Sendo assim, os danos ao DNA promovem a perda de informações genéticas o que compromete a expressão correta dos genes (OBRADOR, et. al., 2020).

5.3 Estresse oxidativo

Como os átomos e moléculas afetados pela radiação ionizante presentes no interior celular possuem metabolismo e diversificada quantidade de substâncias, se espera uma tendência à neutralização gradual dos radicais livres ionizantes ao decorrer do tempo em busca do equilíbrio químico. Esta fase dura cerca de 10^{-10} segundos e, por se tratar de uma ação físico-química, é nela que os radicais livres íons e agentes oxidantes podem atacar as importantes moléculas que compõe a célula, como a cromatina (TAUHATA, et. al., 2003).

É notório que a presença de oxigênio (O_2) no meio irradiado aumenta os efeitos biológicos das radiações ionizantes (Figura 3), o que se torna um grande problema biológico, já que a maior parte dos radicais livres que são formados ocorre pela radiólise da água e, consequentemente provocam danos oxidantes. Assim, grande parte do efeito indireto e parte do efeito direto das radiações são desencadeadas pela presença de oxigênio, molécula essencial para os biossintese e manutenção dos sistemas biológicos (HEINEINE, 2008).

Radicais formados a partir do nitrogênio também podem participar do processo, porém os radicais derivados do oxigênio são mais agressivos, como é o caso do radical hidroxila (OH) considerado o mais deletério ao organismo, uma vez que o seu tempo de meia vida é muito curto o que o torna mais difícil de ser capturado no organismo vivo (BARREIROS & DAVID, 2006).

Os radicais mais comumente formados são peróxidos livres, radicais orgânicos e radicais hidroperóxidos capazes de provocar morte celular (Figura3).

Mesmo estes efeitos provenientes da radiação são nocivos, mas o organismo humano possui diversos mecanismos de defesa contra eles, como a atuação das enzimas catalase, superóxido desmutase e peroxidase, eficientes ao combate de radicais peróxidos e

superóxidos produzidos pela radiólise da água (RODRIGUES, et. al., 2019; VELLOSA et. al., 2021). Há também a possibilidade do uso de antioxidantes naturais que possuam propriedades e ações inibidoras de radicais livres para auxiliar no mecanismo de defesa do organismo (DE FREITAS MENDES, et. al., 2020).

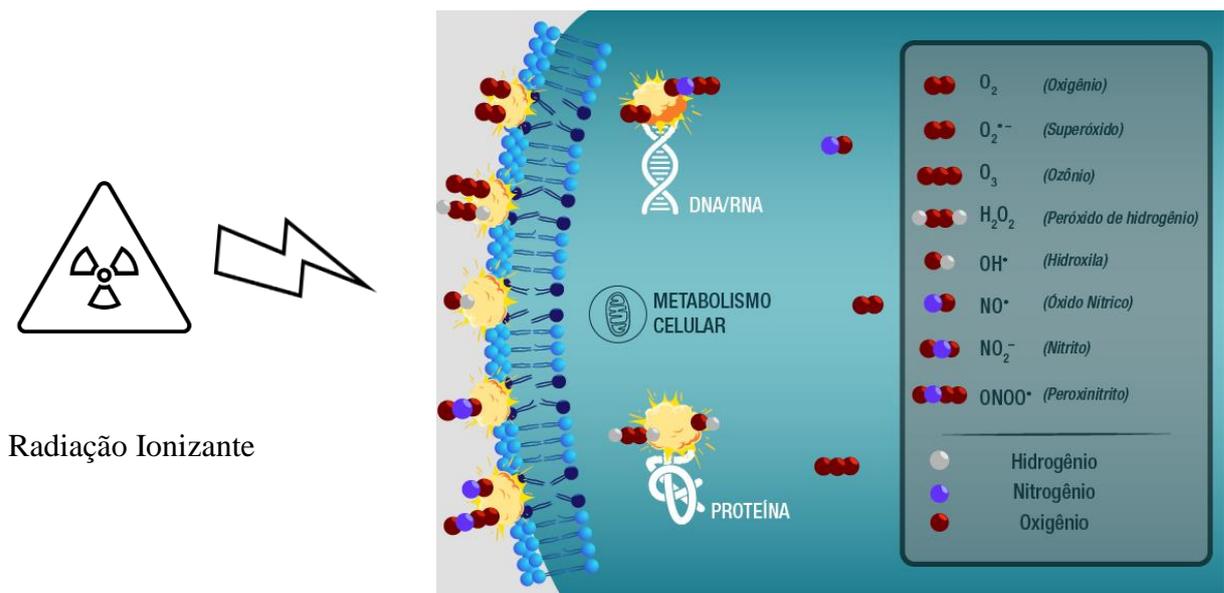


Figura 3. Principais formas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fatores que levam a produção de radicais livres e potenciais alvos celulares para danos por estresse oxidativo.

Fonte: Adptado de Active Pharmaceutica, 2020.

5.4 Vias de reparo ao dano celular radioinduzido

Na radiobiologia clássica, a morte celular é definida pela perda da capacidade replicativa ou reprodutiva, a apoptose, conhecida como morte celular programada (Figura 4). Ela é ativada através de uma cascata de proteases específicas de clivagem (caspases). A via regulada, por características morfológicas e moleculares de estresse intracelular, é a apoptótica intrínseca e/ou mitocondrial, que acontece após o início da reparação dos danos ao DNA; A proteína supressora de tumor p53 suspende o equilíbrio entre os fatores pró-apoptóticos, tais como os genes Bax, Puma, Noxa e Bim, e antiapoptóticos. O resultado disto é a liberação de citocromo C, das mitocôndrias danificadas, para o citoplasma celular que

ativa caspases específicas da via intrínseca, principalmente a caspase 9 (SIA, et. al., 2020; HUTCHINSON, et. al., 2020; PODRALSKA, et. al., 2020).

Quando a apoptose ocorre pela via extrínseca, há um recrutamento de ligantes, como os da família dos fatores de necrose tecidual (TNF e Fas), que ao se ligarem aos respectivos “receptores de morte” da membrana celular, ativam o complexo indutor da morte (SIA, et. al., 2020). Isto ocorre porque tal processo induz a ancoragem de proteínas com a FAD e caspases de via extrínseca 8 e/ou 10 (Figura 4). Vale frisar que os Linfócitos T citotóxicos e as células Natural Killer (NK), também podem atuar na remoção de células pré-malignas quando conseguem identificá-las, tendo em vista que os processos apoptóticos são uma forma de prevenir a formação de câncer (TAYLOR et. al., 2008; SANTIAGO et. al., 2020).

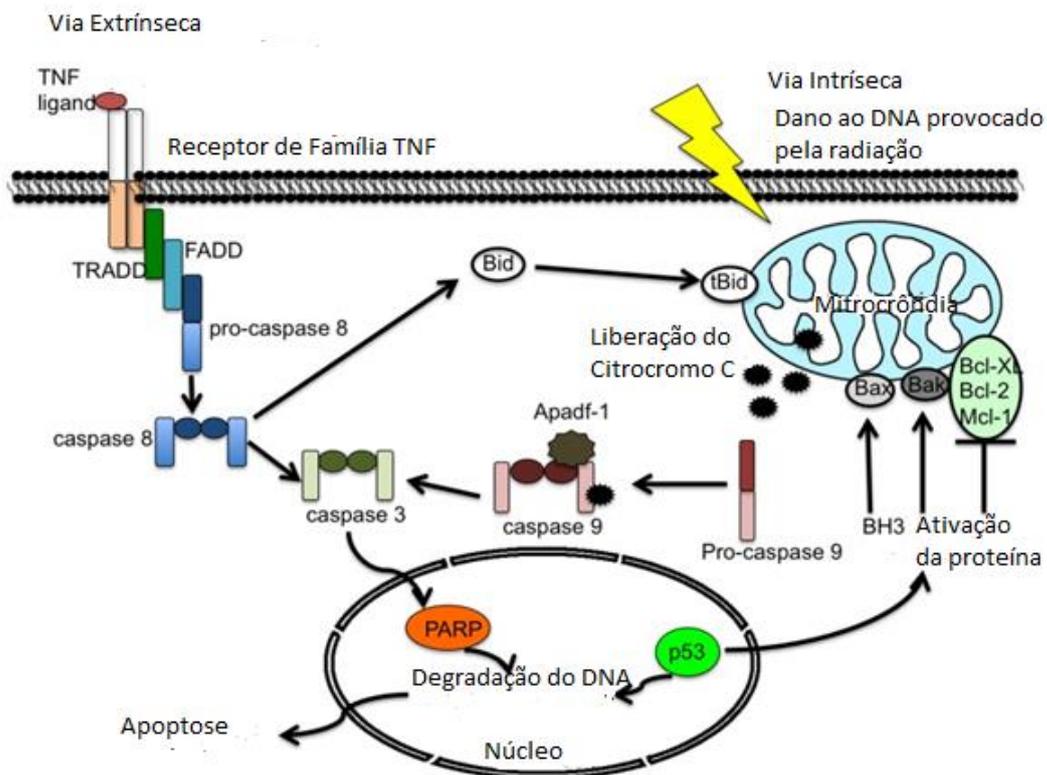


Figura 4. Visão geral generalizada das vias de apoptose extrínseca e intrínseca

Fonte: Adaptado de YUAN, et. al., 2012.

A principal forma como a célula reage as DSB's proveniente do DNA danificado é a Recombinação Homóloga, um processo restrito principalmente aos períodos S e G2 da divisão celular, isto porque uma cromátide irmã íntegra é necessária como modelo para

reparo, este modelo é considerado um dos mais eficientes, pois dificilmente haverá erros. No entanto é demorado, devido seu desencadeamento requerer diversas moléculas especializadas (LEE & HAUSMANN, 2020).

Outra via comumente utilizada para reparo das DSB's acontece por regulação do DNA-PK que desempenha papel fundamental na junção da extremidade não homóloga (NHEJ), processo que pode acontecer durante todo ciclo celular, porém passível de muitos erros (CARACIOLLO, et. al., 2020; LEE & HAUSMANN, 2020).

Durante o ciclo celular, um mecanismo bem atuante para reparação são os checkpoints que acontecem da fase G1 para fase S, no fim da fase G2 e durante a mitose, no caso de não integridade genômica, esses pontos de checagem ativam moléculas eficiente na parada do ciclo celular, porque este processo visa proteger a célula de danos acumulativos e transformação maligna (PROKHOROVA, et. al., 2019).

5.5 Radiossensibilidade Celular

Os estudos acerca da radiossensibilidade celular se tornaram evidentes à ciência a partir das pesquisas de Bergonié e Tribondeau, sobre os efeitos biológicos das radiações ionizantes em tecidos humanos.

Eles afirmaram que a sensibilidade está ligada a diferenciação e proliferação celular, bem como do estado metabólico do tecido que está sendo irradiado. Estes autores determinaram o conceito que ficou conhecido como a “Lei de Bergonié e Tribondeau”, no qual a radiossensibilidade dos tecidos vivos podem ser influenciadas por variantes descritas como: quanto mais diferenciada for a célula, maior é sua resistência à radiação; quanto mais jovem for o tecido ou órgão, mais radiossensível ele será; quanto maior atividade metabólica, maior a radiossensibilidade; quando a taxa de proliferação celular e a taxa de crescimento tecidual aumentam a radiossensibilidade também aumenta (“apud” DE SOUZA SILVA, et. Al., 2014). Sendo os linfócitos uma exceção à esta regra.

Este evento ocorre, devido ao fato de a radiação interagir de maneira aleatória com as células através do mecanismo de Transferência Linear de Energia (LET), que segundo (TAUHATA, et. Al., 2003) é caracterizada pelo efeito da partícula no meio, habitualmente o tecido humano. Quando o material está repleto de elétrons, e um elétron é inserido a este meio, uma série de colisões será provocada por transferência de energia e mudanças de direções, pois a energia do elétron inserido vai passando lentamente para o material, assim

interagindo com vários elétrons sem propriamente se “tocarem”, por repulsão de seus campos elétricos, principalmente em casos em que a distância é pequena entre eles. Posto isto, a distância entre o elétron inserido e o último elétron a mudar sua direção, é denominada de LET.

5.6 O linfócito humano

Como uma ferramenta para rastrear os danos ocasionados pela radiação e, conseqüentemente, realizar um biomonitoramento para detecção e quantificação de alterações cromossômicas, pode ser utilizado células sanguíneas do sistema imune, como os linfócitos (ANDERSON, 2019; SILVA, et. al., 2019b; MENDES, et. al., 2020).

Os linfócitos compõem umas das muitas células do sistema imunológico derivadas da medula óssea, com maturação no timo e na própria medula óssea. Essas células participam do processo de imunidade inata, como as células naturais killers e os linfócitos T citotóxicos, que exercem papel mais imediato frente infecções. Elas ainda atuam na imunidade humoral, como os linfócitos TCD4 e Células B, com apresentação de antígenos e produção de anticorpos, respectivamente, sendo indispensáveis para a imunidade celular (JUNIOR, et. al., 2020). Os linfócitos correspondem de 1.500 a 3.500 μ l da população celular de leucócitos periféricos (HOFFBRAND & MOSS, 2018).

Estas células possuem núcleos esféricos, onde sua cromatina se dispõe em grosseiros grânulos, a ponto de que o núcleo aparece escuro nos preparos histológicos usuais. Seu citoplasma é escasso e, por isso, apresenta-se como um anel delgado em volta do núcleo, podendo deter grânulos azurófilos e cora-se em azul claro devido sua leve basofilia. Ao microscópio eletrônico, seu citoplasma apresenta-se pobre em organelas, mas com uma quantidade moderada de ribossomos livres, dispersos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; LAMBERT & PAYERA, 2019).

Para as análises biodosimétricas, os linfócitos se tornam a célula de escolha, pois dentre as células sanguíneas são as mais radiosensíveis (uma exceção a lei de Bergonié e Tribondeau), permanecem no período (G₀) pré-síntese de DNA da divisão celular e só se dividem quando são estimulados (IAEA, 2011). Com os linfócitos é possível realizar diversas técnicas de análises biodosimétricas, dentre elas a análise citogenética convencional de cromossomos dicêntricos e a técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular (THIERENS & VRAL, 2009).

5.7 Técnica citogenética convencional de cromossomos dicêntricos

Os cromossomos são constituídos por filamentos espiralados de DNA e proteínas histonas, sua estrutura natural é composta por dois braços, denominados cromátides irmãs, uma região central conhecida como centrômero e as suas extremidades, chamadas de telômero. São considerados, portanto, a forma mais condensada do DNA, e podem ser visualizados no período da metáfase durante a mitose. A estrutura cromossômica permite classificá-los como metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico, de acordo com a posição do centrômero.

As alterações cromossômicas (Figura 5) são resultadas do DNA mal reparado ou por quebra dos seus filamentos duplos DSB, neste caso, a exposição à radiação leva a quebras nas cadeias de DNA, no qual o reparo incorreto destes cromossomos ou replicação anormal pode levar a formação de cromossômicos dicêntricos (Figura 5A), basicamente porque a quebra em dois cromossomos próximos em organização celular pode estimular um mau reparo que resulta na união destes dois cromossomos.

Esta técnica é considerada “padrão ouro” para a dosimetria biológica, pois, além de específica da radiação, esta alteração se mantém nas células, de acordo como a meia vida de linfócitos no sangue que é de meses há anos, esta técnica se torna um ótimo biomarcador para exposição recente a radiação (IAEA, 2011).

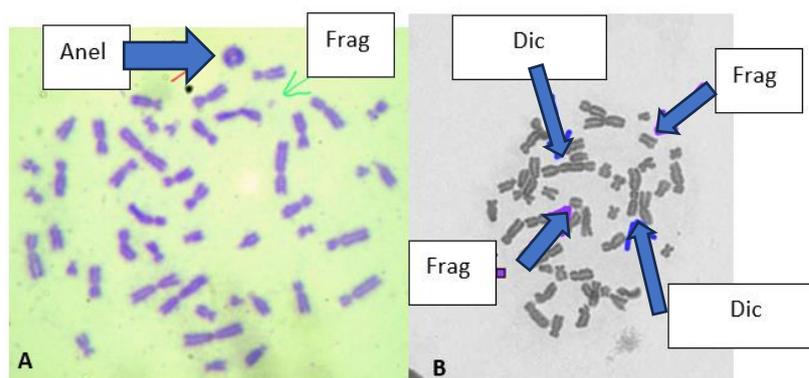


Figura 5. Alterações Cromossômicas. **A:** Metáfase com dois dicêntricos (Dic) e dois fragmentos (Frag.) / **B:** Metáfase com um anel e um fragmento.

Fonte: Acervo do Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste

Além dos dicêntricos, a radiação pode produzir outras alterações, como os anéis cromossômicos (Figura 5B), oriunda da quebra de cada um dos braços de um mesmo

cromossomo, o que leva a ligação das extremidades formadas, sempre acompanhada de fragmentos acêntricos associados. Há também os fragmentos isolados, resultantes de delações cromossômicas terminais ou intersticiais de tamanhos variados.

Estudos com o de Prasad e seus colaboradores (2006), mostram a eficiência desta técnica para avaliação do efeito radioprotetor, o grupo examinou o efeito radioprotetor do ácido ferúlico na concentração de 10µg/ml em três diferentes doses de radiação gama (1, 2 e 4 Gy). O estudo demonstrou que o pré-tratamento (10µg/ml) 30 minutos antes da exposição a radiação diminuiu significativamente ($p<0,05$) os níveis de danos em todas as doses testadas, que comprovaram o potencial uso do ácido ferúlico como radioprotetor.

Arivalagan e seus colaboradores (2015), também utilizaram esta técnica para avaliar o efeito radioprotetor do Carvacrol, os linfócitos cultivados foram tratados com 100 µg/mL de Carvacrol 30 min antes da irradiação de 4 Gy, O pré-tratamento dos linfócitos com CVC (100 µg/mL) alterou essas alterações mediadas pela radiação ($p<0,05$), que indicam claramente que o CVC pode ser um radioprotetor eficaz contra a radiação X.

O efeito radioprotetor da resveratrol e crocina, bem como da combinação de ambos, foi analisado por Faraji e colaboradores (2022). Os autores revelam que a análise citogenética dos linfócitos irradiados com raios X de 2Gy revelou uma redução na frequência de cromossomos dicêntricos em todos os grupos tratados em contraste com o grupo controle. A redução mais significativa ocorreu naqueles tratados com um único agente na concentração de 100 µM e um medicamento combinado na concentração de 50 µM.

Tewari e colaboradores (2022) Avaliaram o efeito radioprotetor do extrato de folhas de bambu, através da técnica de cromossomos dicêntricos. Linfócitos normais do sangue periférico humano foram cultivados com quatro concentrações do extrato hidroalcoólico de folhas de bambu (3,5,7 e 9 µg/ml) da espécie de bambu por 30 minutos antes da radiação γ de doses de 4 Gy ou 6 Gy. O ensaio de cromossomos dicêntricos indicou uma redução significativa na frequência de aberrações cromossômicas nas culturas pré-tratadas com os extratos e 9µg/ml apresentou o menor dano genético, bem como a menor frequência de cromossomos dicêntricos.

5.7 Técnica de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese Celular

Desenvolvida em 1985, por Fenech e Morley; A técnica de MN em linfócitos do sangue periférico com bloqueio da citocinese celular se tornou um método confiável para quantificar

quebras cromossômicas (Figura 6) (FENECH, 2000; THIERENS & VRAL, 2009; FENECH, 2020).

Os MNs são pequenas massas nucleares, revestidos por membranas e dispersos no citoplasma linfocitário, separados dos núcleos principais (Figura 7). Eles são caracterizados como subprodutos resultantes das alterações cromossômicas instáveis (cromossomos dicêntricos, anéis cromossômicos e fragmentos acêntricos) ou perda de cromossomos inteiros. A sua quantidade varia em relação à dose absorvida pelo indivíduo, ao DNA mal reparado ou de DSB's, bem como à exposição de outros agentes clastrogênicos e aneugênicos (FENECH, 2000; FERNANDES, 2005; THIERENS & VRAL, 2009; CHO et. al., 2020).

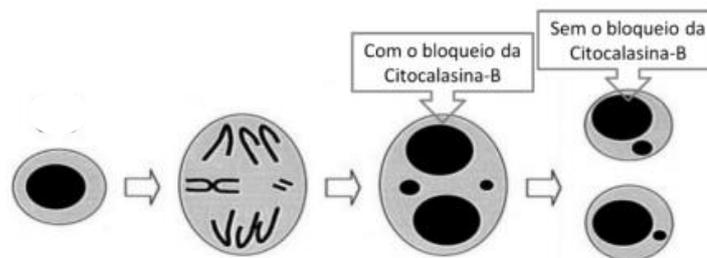


Figura 6. Esquema sobre a formação dos MNs de cromossomos inteiros atrasados e de fragmentos acêntricos na anáfase.

Fonte: Adaptado de FENECH, 2000.

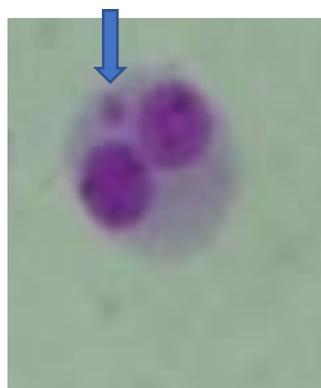


Figura 7. Célula binucleada com um micronúcleo (seta) disperso em seu citoplasma linfocitário.

Fonte: Acervo do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN.

Os micronúcleos aparecem porque os cromossomos ou fragmentos falham ao se incorporar nos núcleos filhos após a mitose, devido seu arranjo inadequado na hora da formação do fuso e na segregação durante a anáfase (STOROZYNSKY & HITT, 2020).

Este método de análise é recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica para triagem de indivíduos expostos à radiação em caso de acidente em larga escala e estimativa de dose em casos de acidentes ocupacionais (IAEA, 2011; FENECH 2013; HERATE & SABATIER, 2019).

A técnica de MN foi utilizada em diversos acidentes para verificação do impacto da exposição à radiação na saúde dos indivíduos, salientando o seu uso no acidente nuclear de Chernobyl (1986), onde se demonstrou ser um excelente biomarcador (GARCIA, 1996; LIVINGSTON et. al., 1997; MAROZIK, et. al., 2007), e no monitoramento dos expostos ao Césio 137 no acidente radiológico de Goiânia, no Brasil, em 1987 (DA CRUZ, 1994).

É também uma das técnicas mais utilizadas para avaliação de efeito radioprotetor de substâncias naturais ou sintéticas. Jagetia *et al* (2002) utilizou a frequência de micronúcleos para avaliar o efeito radioprotetor do *Syzygium cumini*; confirmando a ação da planta, demonstrando ainda a concentração de 12,5mg/ml, como a que possui melhor potencialização do efeito radioprotetor. Da mesma forma, Ahmed *et al* (2018), com uso do teste de MN, identificou efeito radioprotetor em α -tocotrienol, associando as características antioxidante da molécula.

5.8 Radioprotetores

É cónito que a história da radioproteção e radiobiologia tenham sido bem difundidas após a ocorrência de grandes desastres, pois a aplicação da tecnologia nuclear de modo pacífico foi despertada após a detonação das bombas em Hiroshima e Nagasaki, em 1945.

A corrida científica imediata para entender o efeito biológico, focado nos efeitos da dose absorvida, taxa de dose absorvida e redução na expectativa de vida, tumorigênese e alterações genéticas, trouxe benefício no início da segunda guerra mundial. Após este período, começou a se entender melhor o efeito da radiação ionizante, corroborando para interrupção de testes de armamentos nucleares de grande impacto e fazendo com que autoridades mundiais tomassem interesse propellido ao uso da radiação na saúde, inclusive em formas de

tratamento, iniciando também estudos na área de proteção radiológica (WOJCIK & RINGDAHL, 2020).

Os radioprotetores se derivam de agentes projetados ou de origem natural, como os compostos de plantas, e visam diminuir o dano tóxico causado pela radiação ionizante. Devem estar presentes antes, durante ou logo após a exposição e devem ser capazes de minimizar os efeitos biológicos carcinogênicos, teratogênicos, necróticos e apoptóticos em tecidos, sendo aplicáveis para exposições médicas ou ocupacionais (RAVIRAJ, et. al., 2014; MUN et. al., 2018).

Os radioprotetores podem ser classificados como:

- Profiláticos também chamados de radioprotetores clássicos, geralmente administrados antes da exposição à radiação ionizante. Eles visam diminuir os danos aos tecidos e detêm a característica de possuir antioxidantes (MUN et. al., 2018).;
- Terapêuticos:, administrados durante ou depois da exposição à radiação ionizante com objetivo de diminuir os danos radioativos a nível celular/tecidual (KUNTIĆ, et. al., 2013) e bloquear a cascata de citocinas que surgem da irradiação (SMITH, et. al., 2017).

Na tabela 2, podem ser vistos alguns destes mecanismos.

Tabela 2. Mecanismos de ação dos radioprotetores

Espécies reativas de Oxigênio	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminação de radicais livres
Anti-inflamatório	<ul style="list-style-type: none"> • Interleucinas 1 • Interleucina 6 • TNF-alfa
Quebra na dupla fita	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptose • Reparo ao DNA (DSB's e SSB's) • Instabilidade genômica • Síntese de glutatona (GSH)
Direcionamento molecular	<ul style="list-style-type: none"> • P53

	<ul style="list-style-type: none"> • ATM/ATR • BAX • BCL2 • HSPs • PPAR-γ
Regeneração de células hematopoiéticas	<ul style="list-style-type: none"> • Células da série branca e vermelha • Fator de estimulação de células tronco hematopoiéticas

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

A administração dos agentes radioprotetores visa um tratamento intervencionista, onde permitiria que as defesas celulares acompanhassem os radicais livres formados. Assim, o radioprotetor pode suprimir ou eliminar os radicais livres, induzir a produção de radioprotetores naturais de nível intracelular (superóxido desmutase, glutathione e catalase), induzir a reparação do DNA, reduzir a reação inflamatória após a exposição à radiação ou, ainda, atrasar o ciclo celular para favorecer reparo ou a apoptose (SMITH *et. al.*, 2017).

A representação disso pode ser visualizada no estudo de Nosratin *et. al.*(2020), onde partículas à base de albumina conjugada com curcumina (BSA-CUR) foram projetadas para melhorar e avaliar o efeito radioprotetor da CUR. O carregamento de CUR para BSA não só aumentou a estabilidade química da CUR, mas também melhorou a eficácia da radioproteção dele contra a irradiação com raios X. As células HHF-2 apresentaram viabilidade de 107% na presença de BSA-CUR na concentração de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O resultado deste estudo provou que a BSA-CUR pode ser usado como um veículo proficiente para melhorar o potencial efeito radioprotetor da CUR.

O efeito radioprotetor do extrato hidroalcolico de Zataria multiflora foi investigado por Hosseinimehr *et al.* (2011) contra a genotoxicidade induzida pela irradiação γ em linfócitos humanos. O resultado da pesquisa mostrou uma diminuição significativa na incidência de células binucleadas com micronúcleos em comparação com linfócitos irradiados de forma semelhante, mas sem o extrato. A proteção máxima e diminuição na frequência de micronúcleos foram observadas na concentração de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de extrato de Zataria por redução de 32%.

Já são estudados vários compostos sintéticos aplicáveis como potenciais agentes radioprotetores. Dentre os radioprotetores químicos, podemos citar as moléculas contendo Tiol, dentre os quais, o único aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) é a Amifostina (WR-2721). Entretanto, seu uso é limitado à redução de danos nefrotóxicos em tratamento com cisplatina em casos de câncer de ovário avançado e em indivíduos com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia (SIQUEIRA, 2017).

Além disso, existem outros compostos classificados como radioprotetores químicos, como: fitoquímicos polifenólicos, fitoquímicos não polifenólicos, vitaminas, oligoelementos, superóxido dismutação, ex-Rad, nitroxides, hormônios e análogos hormonais, antibióticos, agonistas do receptor de adenosina e moléculas de ligação a DNA.

Além dos radioprotetores, existem os radiomitigadores, que são capazes de modular respostas de combate ao dano pós exposição, entre as composições com propriedades radiomitigadoras, se destacam: glutamina, probióticos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina e bloqueadores do receptor da angiotensina II, estatinas, análogos da somastotina, imunomoduladores, prostaglandinas e medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, BIO 300 (Formulação farmacêutica de nanopartículas de genisteína) (OBRADOR, 2020).

Por ser constituído de alguns desses compostos já reconhecidos, o *Ginkgo biloba* se enquadra como um possível radioprotetor e/ou radiomitigador (DEL-CASTILLO e PASTOR, 2013; ALAM et. al, 2013).

5.9 *Ginkgo biloba*

Considerada um fóssil vivo, a árvore de *Ginkgo biloba* é integrante da família Ginkgoaceae, datada como habitante da terra há mais de 200 milhões de anos. Por suas árvores individuais conseguirem sobreviver por mais de mil anos, ficou conhecida por possuir os chamados “efeitos do antienvelhecimento” (GABY, 1996).

Estas árvores medem em torno de 20 – 30 metros de altura e suas folhas e sementes são amareladas e mal-cheirosas. O seu nome “biloba” é proveniente de suas folhas que possuem dois lobos (Figura 8) (KIEFER & GERTZ, 2004). A árvore ginkgo cresce por toda a China, Coreia, Japão, Europa e os Estados Unidos. As folhas concentram inúmeros agentes biológicos ativos, como flavonol e glicosídeos de flavona, diterpeno lactonas, ginkgolidos, sesquiterpenos, superóxido dismutase à base de ferro, ácido p-hidroxibenzóico, ácido

ascórbico e catequina (CALABRESE, 2020).



Figura 8. Folhas de *Ginkgo biloba*

Fonte: Adaptado de EISVAND, et. al., 2020.

O extrato de *Ginkgo biloba* egb 761 foi padronizado no final do século XX com objetivo de concentrar as substâncias ativas de potencial clínico e terapêutico (flavonóides glicosídeos e os terpenos). Assim, por meio de vários processos buscou eliminar componentes indesejáveis, tais como ácidos ginkgólicos e as bioflavonas, sob um rigoroso e controlado processo laboratorial, (BANOV, et. al., 2006).

Apesar de já ser utilizada na medicina chinesa há séculos como um estimulante para memória, os efeitos beneficentes da árvore se tornaram cada vez mais evidentes após estudos que apontaram diversas propriedades terapêuticas (GABY,1996). Assim, começou a ser utilizado em pacientes com demência (SAVASKAN, et. al., 2017; YUAN, 2017), em tratamento do câncer colorretal (LIU, et. al., 2017), em ensaios clínicos para tratamento de lesões neurológicas (LI, et.al., 2018; YU, et. al., 2018), como neuroprotetor (SINGH, 2019) e protetor contra raios UV-B (ZHAO, et. al., 2020).

O extrato de folhas de *Ginkgo biloba* foi avaliado por Silva, et. al., (2019c) no estudo da proteção de células HepG2 contra danos oxidativos ao DNA induzidos por Paraquat (Herbicida potente e extremamente nocivo ao homem), onde a co-incubação de células HepG2 por 4 h com extrato de folha de *G. biloba* (75 µg / mL) e Paraquat (1,0 ou 1,5 µM) reduziu significativamente o dano oxidativo ao DNA induzido por Paraquat.

O extrato de kernel derivado das sementes de Ginkgo, que possuem propriedades similares as das folhas, perturbou significativamente a viabilidade das células cancerosas, de maneira dependente da concentração e do tempo, promovendo efeito citotóxico em duas

linhas de células cancerígenas, A2058 e HCT116, e na linha de células não tumorais McCoy-Plovdiv. Isto sugere que o extrato de endosperma pode interagir de forma aditiva ou sinérgica para proteger contra o câncer (FEODOROVA, et. al., 2020).

Mais recentemente, em um estudo que avaliou um total de 80 fitoterápicos e os potenciais de inibição deles contra um dos vírus causador da Síndrome Aguda Respiratória Severa, o Corona Vírus 2 (SARS-CoV-2), Analisados por meio de uma abordagem bioquímica, foi constatado, após triagem, que o extrato de folhas de *Ginkgo biloba* (GBLE) exibiu a atividade mais potente de inibição do SARS-CoV-2, na protease conservada semelhante à 3-quimiotripsina (3CL^{pro}) (IC₅₀ = 6,68 µg / mL). Vale salientar que 3CL^{pro} é caracterizada como uma enzima chave responsável pela replicação do coronavírus e já foi validada como um alvo terapêutico fundamental de estudos para combater a pandemia da Covid- 19 (XIONG, et. al, 2021).

Na área de radioprotetores, o extrato de *Ginkgo biloba* EGB761, foi capaz de reduzir fatores clastogênicos no plasma de trabalhadores expostos ao acidente nuclear de Chernobyl, na qual a atividade clastogênica diminuiu após um dia de início de tratamento, que persistiu por 7 meses. Um terço dos trabalhadores apenas voltou a apresentar fatores clastogênicos após 1 ano do término do tratamento, demonstrando que o processo que produziu tais fatores continuou demonstrando o poder de um antioxidante e, provavelmente, de um radioprotetor (EMERIT, et. al., 1995).

6. METODOLOGIA A SER EMPREGADA

6.1. Desenho da Pesquisa

Este projeto se enquadra na abordagem metodológica de pesquisa experimental com estudo *in vitro* e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, CAAE: 39932720.4.0000.5208.

6.2. Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE em conjunto com o de Biofísica Celular e Molecular do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

6.3. Recrutamento de voluntários

Nesta pesquisa, foram utilizadas amostras sanguíneas de 1 voluntário saudável, do sexo masculino, com 25 anos de idade, proveniente da Região Metropolitana do Recife.

O doador que contribuiu para análise citológica do efeito do extrato de *Ginkgo biloba* passou primeiramente por anamnese individual, onde o voluntário, respondeu a um questionário (Anexo I) para verificar se nos últimos seis meses antes da coleta foram expostos à radiação terapêutica, raios X diagnóstico, ou consumiram drogas ilícitas (GAJENDIRAN *et al.*, 2001), sendo um processo seletivo. Assim, ficaram excluídos do estudo, além dos menores de 18 anos, aqueles que não atenderem os critérios de inclusão.

O recrutamento do voluntário, visando a sua participação na pesquisa, foi realizado entre pessoas que frequentam o campus Recife da Universidade Federal de Pernambuco e o próprio CRCN-NE/CNEN.

6.4. Coleta das amostras e distribuição dos grupos

Este projeto trabalhou com amostras sanguíneas, logo foi necessário o uso dos materiais de coleta de sangue periférico, como agulha para vacutainers, tubo com anticoagulante Heparina, algodão, álcool, garrote e adesivo para o local da punção.

No indivíduo selecionado, foram coletadas amostras de sangue periférico, por nove diferentes punções venosas (15ml cada) referentes a cada concentração aprovada no MTT, do extrato testada, mais as amostras controles. As coletas foram realizadas em tubos de vacutainers contendo Heparina após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) e foram distribuídos em diferentes grupos.

6.4.1. Grupos controles

O **sangue controle** (não irradiado) foi analisado para verificação do nível de *background* da frequência de alterações cromossômicas. Foram adotadas as recomendações da Agência Internacional de Energia Atômica (*International Agency Atomic Energy- IAEA*) para os valores de *background* que devem ficar entre 0 a 40 MN em 1000 células analisadas. (IAEA, 2011).

O **controle positivo** foi resultante da análise do sangue irradiado sem a adição do

extrato, com o objetivo de verificar a frequência de alterações provocadas pela radiação ionizante na dose absorvida de escolha deste estudo (2Gy).

6.4.2. Grupo irradiado tratado com extrato de *Ginkgo biloba*

Nas amostras restantes, foi adicionado o extrato nas concentrações aprovadas no teste MTT (item 6.5) 2 horas após a irradiação. Desta forma, além do efeito radioprotetor, pode ser verificada qual a concentração que melhor respondesse ao objetivo.

6.5. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada por meio do método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), segundo protocolo de DANI *et al* (2011). Assim, após o término da cultura (item 6.8), foram adicionados 1×10^6 células/ μL em placas de cultura celular com 96 poços e, em seguida, 10 μL da solução de 5 mg/mL do corante MTT em cada poço. Vale ressaltar que o teste foi realizado em triplicatas de cada concentração de extrato selecionado para o estudo.

Passado o tempo exposição (3h), o meio de cultura foi removido e 80 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço, para solubilização dos cristais de formazam (resultante da redução do sal tetrazólio, reativo ao corante insolúvel em água). As placas foram agitadas cuidadosamente por 10 min e em seguida a absorbância foi medida no aparelho de ELISA a 570 nm.

O teste foi realizado com as concentrações do extrato de 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Apenas foram avaliados os efeitos radioprotetores nas concentrações do extrato que forem aprovadas no teste de viabilidade celular.

6.7. Irradiação das amostras

Cada amostra de sangue foi separada em alíquotas de 5 ml, 3 alíquotas para teste da concentração do extrato e exposta a uma fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) em uma temperatura de ~ 22 °C. Uma barreira de polietileno de 4 mm foi utilizada para assegurar o equilíbrio eletrônico das amostras irradiadas.

As amostras foram irradiadas em Kerma no ar e os valores de dose de Kerma no ar foram tais que, quando convertidos em dose absorvida, resultaram o valor de 2 Gy. O fator de conversão de KERMA no ar para dose absorvida em tecido mole é a razão entre os coeficientes de massa de absorção de energia. Numericamente, isso será obtido pela multiplicação do valor de KERMA no ar por 1,10 para raios γ de fontes de ^{60}Co . Há também uma diferença entre os fatores de conversão de tecidos moles para o sangue, entretanto, para radiação de baixa Transferência Linear de Energia essa diferença é desprezível (IAEA, 2011).

6.8. Cultivo de células

Antes do início do cultivo celular, as amostras irradiadas e controles permaneceram na estufa a 37 °C, por 2 horas, tempo necessário para que os mecanismos de reparação celular pudessem atuar.

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos. Para tal, foram adicionadas 0,5 ml de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 ml de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 1 ml de soro bovino fetal (Gibco), 0,1 ml de fitohemaglutinina (Sigma) e 0,6ml de Streptomicina (Sigma). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C, por 48 horas. Após 46 horas, foi adicionado 0,1 ml de Colcemid (Sigma).

Para técnica convencional de cromossomos dicêntricos, ao completar 48 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1500rpm, o sobrenadante desprezado e adicionado 8 ml de cloreto de potássio (KCl) para que ocorresse o choque hipotônico. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 1500rpm o sobrenadante retirado e adicionado o fixador metanol: ácido acético (3:1). Para a preparação de lâminas teste, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador quanto o necessário para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

Para técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular, ao completar 72 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000rpm, o sobrenadante desprezado e adicionado 7 ml de cloreto de potássio (KCl) para que ocorra o choque hipotônico. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 1000rpm, o sobrenadante retirado e adicionado o fixador metanol: ácido acético (10:1), diluídos em

solução de ringer (1:1) até completar 7 ml. Para a preparação de lâminas teste, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador quanto o necessário para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

As lâminas foram preparadas a partir do precipitado de células que foi gotejado em dois pontos das lâminas que ficaram secando por 24 horas em temperatura ambiente e, em seguida, coradas com Giemsa 5%.

6.9. Análise microscópica e estatística

A análise de metáfases foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). foram contabilizadas, no mínimo, 100 metáfases viáveis para cada amostra teste. As metáfases viáveis são aquelas células que possuem 46 centrômeros, sem sobreposição, onde é possível verificar as alterações cromossômicas instáveis mais comuns (Cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos isolados e os anéis cromossômicos) (AIEA, 2011).

A análise de micronúcleo foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). foram contabilizadas, no mínimo, 1000 células binucleadas viáveis para cada amostra teste. Estas células viáveis são morfológicamente preservadas, com seu citoplasma e núcleos íntegros e bem corados. Os Núcleos principais devem possuir os tamanhos iguais e não podem estar sobrepostos, da mesma maneira em que os micronúcleos não podem ser sobrepor aos núcleos principais e devem estar morfológicamente preservados, dispersos no citoplasma linfocitário (AIEA, 2011).

Após a análise das lâminas, foram realizados cálculos estatísticos, onde se pode verificar se a distribuição de alterações cromossômicas se ajusta ou não a distribuição de Poisson à dose utilizada. (AIEA, 2011; ACHARYA; et. al., 2009).

Para avaliar a atuação positiva do radioprotetor, será realizado o teste ANOVA, comparando os resultados provenientes das diferentes amostras e o teste Tukey para avaliar as amostras individualmente. (DARDANO, 2007 e GEORGIEVA, 2013).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste colorimétrico por redução dos sais MTT apresentou, em análise resultados conforme o esperado, isto porque, as amostras de *Gingko biloba* se tornaram visivelmente

mais viáveis que as amostras que continham as mesmas concentrações de Bromodeoxiuridina que variaram de 0,025 a 0,25µg/ml. (Figura 9).

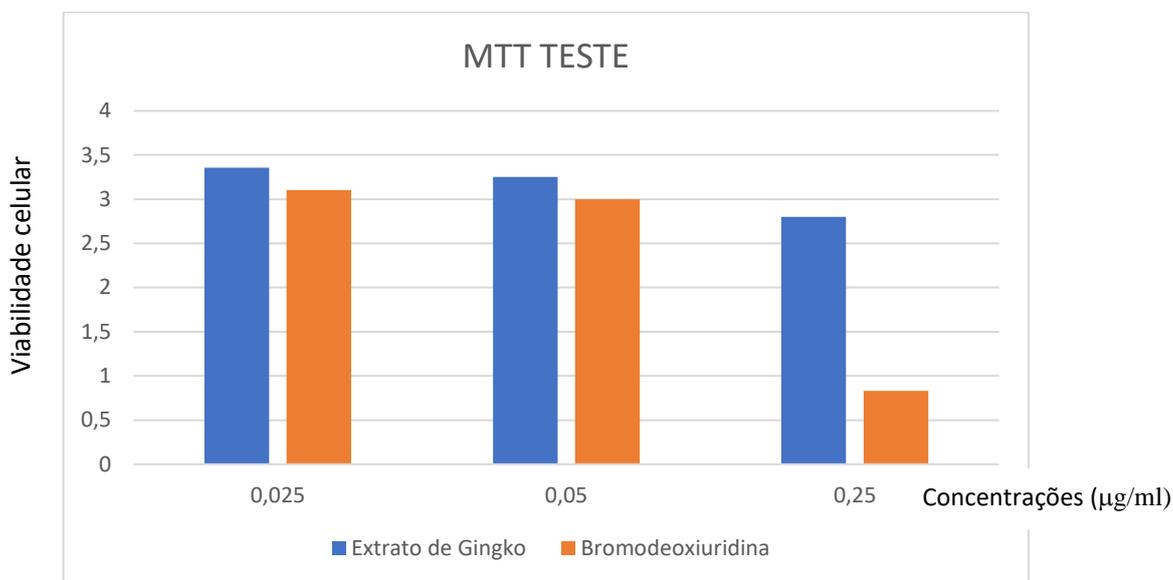


Figura 9. Viabilidade celular obtida pelo teste colorimétrico MTT

Fonte: Autoria própria

O MTT teste mostrou que as concentrações do extrato de Ginkgo biloba, foram mais viáveis quando comparadas as amostras contendo o agente citotóxico bromodeoxiuridina. É notório que, a medida em que aumentamos as concentrações de ambas as substâncias a viabilidade celular diminui, efeito este esperado, pois a tendência farmacodinâmica das medicações tende a se tornar mais danosas de acordo com o aumento das doses administradas.

Nas concentrações mais baixas o efeito citotóxico da bromodeoxiuridina não se mostra de forma tão nítida, isto porque, as concentrações do agente não foram suficientes para perturbar amplamente as células, porém ao analisarmos a concentração mais alta testada (0,25 µg/ml), o extrato de Ginkgo biloba, continuou apresentando alta viabilidade celular, diferentemente da bromodeoxiuridina, que matou a maioria das células e reduziu drasticamente a viabilidade celular neste grupo.

Sendo assim, o extrato de Ginkgo biloba não se mostrou tóxico, para os linfócitos humanos do sangue periférico, e as concentrações de 0,025 e 0,05 µg/ml foram consideradas de interesse para este estudo por apresentarem maiores viabilidades celulares.

Este comportamento é muito relatado na literatura, por isso faz do teste MTT, um excelente indicador de viabilidade celular. No estudo de Satria e colaboradores (2019), que avaliaram a atividade citoprotetora da fração de etilacetato da erva *Picria felterrae* lour, observaram que as concentrações da erva aumentam a viabilidade celular até um determinado platô (100mg/ml) e, a partir da concentração de 200mg/ml, inicia uma queda da viabilidade celular, sendo ainda mais acentuada na concentração de 400mg/ml.

O efeito do extrato de *Ginkgo biloba* (EGB761) também foi analisado para avaliar os efeitos mutagênicos e morfológicos da radiação modulada de radiofrequência 1,8 GHz, em linfócitos humanos do sangue periférico, a viabilidade celular foi avaliada com ensaio de redução do brometo de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazólio (MTT). As culturas de linfócitos foram expostas à radiação de radiofrequência modulada 1,8 GHz com e sem EGb 761. O pré-tratamento com EGb 761 aumentou significativamente a viabilidade celular em grupos tratados, mostrando que o extrato possui papel protetor contra a mutagenidade induzida e é capaz de reduzir o dano cromossômico provocados pela radiofrequência (ESMEKAYA *et al*, 2011).

A análise de cromossomos dicêntricos ocorreu pela análise de 781 metáfases linfocitárias, onde 525 metáfases foram referentes às amostras controles e 256 metáfases às amostras testes (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência e distribuição das alterações cromossômicas instáveis

Dose (Gy)	Conc* (µg/ml)	Total de Células	Total de Dic	Y	D+R	Y*	Ace	Y**	Cu	% de dano total	0Dic	1Dic	2Dic	3Dic	4Dic	5Dic	% de dano
0	0	113	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.00%	113	0	0	0	0	0	0.00%
0	0.025	179	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.00%	179	0	0	0	0	0	0.00%
0	0.05	133	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.00%	133	0	0	0	0	0	0.00%
2	0	100	17	0.170	17	0.170	17	0.170	32	32.00%	85	13	2	0	0	0	15.00%
2	0.025	142	13	0.092	14	0.099	21	0.148	25	17.61%	129	13	0	0	0	0	9.15%
2	0.05	114	15	0.132	17	0.149	20	0.175	34	29.82%	100	13	1	0	0	0	12.28%

*Legenda: Conc: Concentração do extrato de *Ginkgo*; Y= Frequência de alterações; D+R= total de dicêntricos e anéis; Y*= Frequência de Dic + Anéis; Ace= Fragmentos acêntricos; Y**= Frequência de fragmentos acêntricos.

Quando se compara a amostra irradiada não tratada e as amostras testes, observa-se que a frequência de alterações é maior na amostra que não foi tratada com o extrato de Ginkgo. Entretanto, observa-se que o aparecimento de alterações foi bem similar entres ambas as amostras, o que se denota em interesse futuro para aumentar o número de metáfases analisadas e evidenciar melhor estes resultados.

Análises individuais das frequências de acordo com o tipo de alteração (Tabela 4) revelam frequências muito parecidas, de acordo com a dose (2Gy todas as amostras) e a quantidade de células analisadas, que foi similar; embora o sangue não tratado continue sendo o responsável pelas maiores frequências em todos os tipos de alterações

Tabela 4. Distribuição intracelular por tipos de alterações instáveis

Dose (Gy)	Total de células	Alteração cromossômica	Y	0	1	2	3	Conc.
Dicêntricos								
2Gy	100	17	0,170	85	13	2		0
2Gy	142	13	0,092	134	13			0,025
2Gy	114	15	0,132	102	13	1		0,05
Dicêntricos + Anéis								
2Gy	100	17	0,170	85	13	2		0
2Gy	142	14	0,099	127	13	1		0,025
2Gy	114	17	0,149	96	15	2		0,05
Fragmentos acêntricos								
2Gy	100	17	0,170	83	17			0
2Gy	142	21	0,148	132	14	2	1	0,025
2Gy	114	20	0,165	98	16	2		0,05

***Legenda:** Y: Frequência; Conc: Concentração do extrato de Ginkgo.

Na literatura, alguns estudos (MONTORO et. Al., 2005; SIQUEIRA, et. Al., 2017;

ALOK, et. Al., 2020) que utilizaram a mesma técnica para evidenciar possíveis efeitos radioprotetores, apresentaram comportamentos de frequências similares as observadas neste estudo, onde as amostras tratadas com substâncias investigadas como radioprotetoras apresentam diminuição significativa de suas frequências, quando comparadas com as amostras não tratadas (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação das frequências de dicêntricos com a literatura.

	Dose (Gy)	Extrato/Produto	Concentração	Y dic.
Este trabalho	2	<i>Gingko biloba</i>	0,0µg/ml	0,170
			0,025µg/ml	0,092
			0,05µg/ml	0,132
MONTORO, <i>et. Al.</i> , 2005	2	Própolis	0,0mg/ml	0,28
			1mg/ml	0,15
SIQUEIRA, <i>et. Al.</i> , 2017	2,5	Quercetina	0,0µM	0,092
			37,5µM	0,028
ALOK, <i>et. Al.</i> , 2020.	2	Diclofenaco de sódio	0,0µM	0,15
			10µM	0,13
			100 µM	0,14
			1mM	0,06

***Legenda:** Y dic: Frequências de dicêntricos.

Como observado, os estudos denotam o mesmo padrão encontrado neste estudo; ao comparar as amostras tratadas com as que não receberam tratamento. É evidente que os extratos estudados como possíveis radioprotetores se revelaram capazes de reduzir a frequência de danos intracelulares, revelados como diminuição do aparecimento de cromossomos dicêntricos nas amostras.

Montoro *et al* (2005) revelam em seus estudos que, apesar de encontrar a concentração de 1mg/ml do extrato de própolis com propriedade radioprotetora, é necessário realizar o estudo em mais concentrações, bem como em diferentes tipos e doses de radiação, afim, de avaliar se o comportamento radioprotetor é similar para todos estes parâmetros .

Siqueira et al (2017) não só avaliou o efeito radioprotetor da quercetina, obtendo

sucesso na concentração de 37,5 μM , o autor relata que a evidência de possíveis efeitos radiomitigadores abrem oportunidade de novos estudos para expandir as análises acerca da capacidade radioprotetora da quercetina.

Alok *et al* (2020). observou que a concentração de 1mM de diclofenaco de sódio foi capaz de reduzir drasticamente a frequência de alterações cromossômicas em suas amostras, superando concentrações menores como a de 10 μM e 100 μM , que apesar de apresentarem frequências menores, foram pouco relevantes quando comparado o sangue não tratado.

Para avaliar a variabilidade entre as amostras foram analisadas estatisticamente as médias e o desvio padrão, através dos testes estatísticos de ANOVA que revela o valor de “p” de todas as amostras, onde valores ($<0,05$) denotam relevância estatística e Tukey que analisa os valores das amostras individualmente. (Tabela 6)

O teste ANOVA revela uma observação importante quando comparadas as amostras irradiadas e não irradiadas, na qual as análises de dicêntricos obtiveram um valor de ($p<0,05$), que representa significância estatística, esta diferença é detalhada através do teste de Tukey que mostra entre os grupos irradiador sem Gingko (I-0,0) e com o grupo tratado (I-0,025), além dos demais grupos listados em vermelho (Tabela 6.), revelando que as amostras são tendenciosas de redução ao dano. Porém, quando comparados os grupos irradiados com Gingko e sem Gingko, não houve grande relevância estatística, isto pode ser explicado, devido a necessidade de ampliar o número de células na análise para se obter um número de alterações maior e conseqüentemente melhores comparações.

Sendo assim foi observada relevância estatística sugestiva de diminuição ao dano celular radioinduzido, porém para comprava-la serão necessários estudos futuros com um maior número de células analisadas.

Tabela 6. Análise estatística da variabilidade das amostras por ANOVA e Tukey para amostras de dicêntricos.

Dic		
	Irradiado e não irradiado	Irradiado
Anova	0.002188	0.4779
Tukey		
I-0,05 x I-0,025	0.3763859	0.3799850
I-0,0 x I-0,025	0.0176278	0.0687587
C-0,025 x I-0,025	0.0053536	
C0,05 x I-0,025	0.0053536	
C0,0 x I-0,025	0.0053536	
I-0,0 x I-0,05	0.4268602	0.4122593
C-0,025 x I-0,05	0.0002357	
C-0,05 x I-0,05	0.0002357	
C-0,0 x I-0,05	0.0002357	
C-0,025 x I-0,0	0.0000190	
C- 0,05 x I-0	0.0000190	
C-0,0 x I-0,0	0.0000190	
C-0,05 x C-0,025	1	
C-0,0 x C-0,025	1	
C-0,0 x C-0,05	1	

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

A técnica de micronúcleos por bloqueio da citocinese celular ocorreu a partir das análises de 4.431 células binucleadas viáveis, sendo destas 2.251 células para amostras controles e 2.180 células referentes as amostras testes (Tabela 7). A frequência de MN para amostra controle de sangue não irradiado e sem tratamento com extrato (*background*), conforme se observa na tabela 6, está de acordo com o que já foi relatado na literatura, que é uma faixa de frequência entre 0 a 40 MN em 1000 células.

Em todas as concentrações foram testadas conformidade de distribuição celular de MN com a distribuição de Poisson, utilizando o índice de dispersão (var/y) e o teste u (Tabela 7). A estatística do teste u é uma unidade normalizada do índice de dispersão onde, para uma distribuição perfeita de Poisson o índice deve permanecer em valores próximos a 1. No entanto, com o intervalo de confiança de 95%, os valores de u podem variar entre $\pm 1,96$, onde valores de u superiores indicam sobredispersão e os valores de $u < 1,96$, indicam subdispersão.

Tabela 7. Comparação da frequência de micronúcleos entre o sangue irradiado e o sangue irradiado tratado com o extrato de *Gingko biloba*.

Dose (Gy)	Con	Total células	Mn	Y	0Mn	1Mn	2Mn	3Mn	4Mn	5Mn	% de dano	var	var/Y	u	Dose (Gy)=
0	C	1050	5	0.005	1045	5	0	0	0	0	0.48%	0.005	0.996	-0.098	-
2	0.025	1000	42	0.042	962	34	4	0	0	0	3.80%	0.048	1.150	3.385	0.523
2	0.05	1180	62	0.053	1122	54	4	0	0	0	4.92%	0.057	1.077	1.895	0.655
2	C	1201	303	0.252	939	230	25	6	0	1	21.82%	0.277	1.098	2.416	2.501

*Legenda: Con: concentração ($\mu\text{g/ml}$); y: frequência de micronúcleos; var: Variância; var/y: Variância sobre média; u: Teste u.

Os indicadores na tabela mostram que o sangue controle segue as recomendações de *background* da Agência Internacional de Energia Atômica. As frequências de MN quando comparados o sangue controle irradiado (2 Gy), com as concentrações teste (0,025 e 0,05 $\mu\text{g/ml}$), denotam queda na frequência de alterações, bem como, quando analisadas o aparecimento de MN, verifica-se que é bem mais relevante na amostra irradiada, chegando a apresentar células com até 5 MN, enquanto nas amostras teste o número de alterações é menor, onde não se visualizou células com mais de 2 MN. Sugerindo que o extrato de *Gingko biloba*, foi capaz de reduzir a frequência e o estresse celular, nos linfócitos humanos.

A dispersão das amostras teste seguem a distribuição de Poisson (Tabela 7), com valores próximos a 1, todavia, o teste u, indicou sobredispersão ($>1,96$) nas amostras da concentração de 0,025 e no sangue controle irradiado, comportamento já esperando tendo em vista que a radiação atua de maneira aleatória, e uma célula pode ser mais afetada do que outra, assim como mostra a porcentagem de dano (Tabela 7). Porém na análise da concentração de 0,05, observa-se subdispersão ao teste u ($<1,96$), esta alteração é muito significativa, pois sugere que o extrato de *Gingko* foi capaz de reduzir com maior intensidade o estresse celular, e conseqüentemente o número de alterações, colocando esta concentração como destaque deste estudo.

Ademais é importante relatar que ambas as concentrações testadas neste estudo revelaram diminuição na frequência de alterações quando comparada com o sangue irradiado não tratado. Quando avaliada a dose estimada, representada na tabela 3 como (Dose Gy=) nota-se que o sangue irradiado (2Gy) não tratado apresenta uma dose estimada idêntica a que

foi exposto, o que não se repete nas amostras tratadas com o extrato, onde a dose estimada absorvida caiu mais que a metade quando comparado a dose a que foi exposto.

Na literatura (RAHGOSHAI, *et. al.*, 2021; AMANI, *et. al.*, 2020; ALOK *et al.*, 2020) é possível comparar as frequências de MN (Tabela 8), como outras pesquisas que visam caracterizar substâncias radioprotetoras.

Tabela 8. Análise da frequência de micronúcleos frente a literatura.

	Dose (Gy)	Extrato	Concentração	Y MN.
Este trabalho	2	<i>Gingko biloba</i>	0,0µg/ml	0,252
			0,025µg/ml	0,042
			0,05µg/ml	0,053
RAHGOSHAI, et al., 2021.	2	Cimetidina	0,00mg/ml	0,050
			12,6mg/ml	0,043
			25,2mg/ml	0,038
AMANI, et al., 2020.	2	Oleuropeína	0,0µM	0,2
			100µM	0,12
ALOK, et. Al. 2020.	2	Diclofenaco de sódio	0,0 µM	0,096
			100 µM	0,051
			1mM	0,05
			5mM	0,025

*Legenda: Y dic: Frequências de micronúcleos.

Os estudos mostram comportamentos similares nas frequências de dicêntricos, onde as amostras não tratadas apresentam frequências maiores que as amostras testes, o que revela caráter de radioproteção celular. Estes testes de concentração são importantes para avaliar a dose mais eficaz na diminuição do estresse celular.

Rahgoshai et al (2021) afirma em seus estudos que, entre as duas concentrações estudadas, a concentração de 12,6mg/ml obteve uma frequência maior quando comparada com a concentração de 25,2mg/ml, o que colocou no estudo a concentração mais alta como destaque.

Alok *et al* (2020) observaram em sua pesquisa, a frequência de alterações diminuir a cada vez que aumentavam as concentrações de diclofenaco de sódio, obtendo frequência quase quatro vezes menores na concentração de 5mM quando comparada com o sangue não

tratado.

As amostras obtidas através de micronúcleos também foram analisadas estatisticamente (Tabela 9), para verificar a variabilidade das amostras segundo teste ANOVA e Tukey.

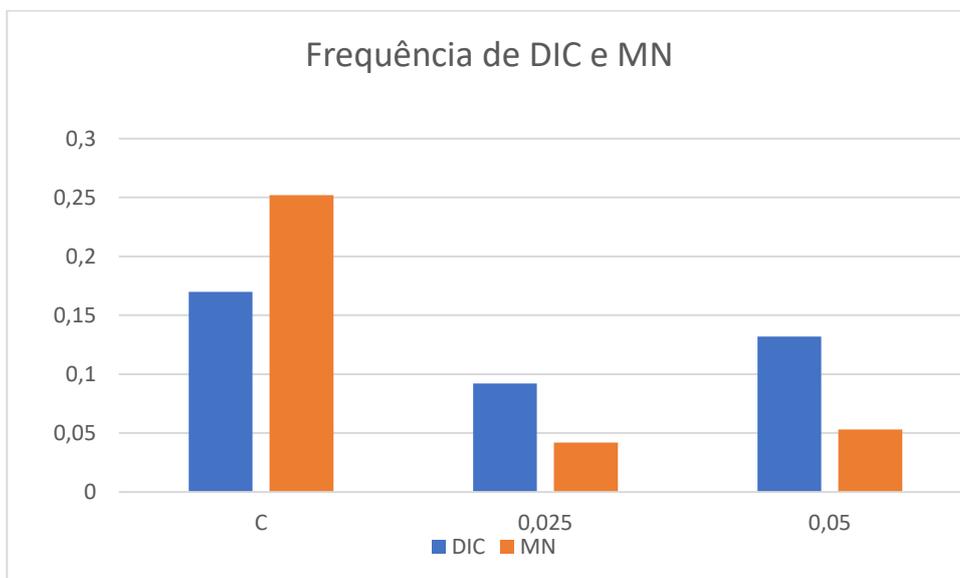
Tabela 9. Análise estatística da variabilidade das amostras por ANOVA e Tukey para amostras de micronúcleos.

MN		
	Irradiado e não irradiado	Irradiado
Anova	0.8477	0.9591
Tukey		
I-0,05 x I-0,025	0.4875640	0.4480842
C-0,0 x I-0,025	0.0046434	
I-0,0 x I-0,025	0.0000000	0.0000009
C-0,0 x I-0,05	0.0008688	
I-0,0 x I-0,05	0.0000000	0.0000011
I-0,0 x C-0,0	0.0000000	

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

Segundo a análise de variância obtida através do teste ANOVA, para as amostras de micronúcleo, não houve relevância estatística significativa ($p > 0,05$). Quando analisadas de forma individual através do teste de Tukey, se observa diferença entre os grupos que não foram tratados com o extrato de Ginkgo (I-0,0) e o grupo tratado (I-0,025), bem como com os grupos (I-0,0 x I-0,05). Apesar do ANOVA não confirmar, o teste de Tukey foi sugestivo de que há uma diferença entre os grupos tratados e não tratados com Ginkgo, e que são necessárias análises mais amplas, com um número de células maiores para confirmar tal diferença estatística.

Quando analisadas juntas, as frequências de dicêntricos e micronúcleos encontradas nesta pesquisa (Figura 10). A concentração de 0,025µg/ml reduziu com maior intensidade as frequências de cromossomos dicêntricos e micronúcleos quando comparadas as frequências da concentração de 0,05µg/ml.



*Legenda: C: Controles irradiados / DIC: Dicêntricos/ MN: Micronúcleos

Figura 10. Intercomparação entre as frequências controles e testes de amostras de dicêntricos e micronúcleos.

Fonte: Autoria própria

8 CONCLUSÃO

- O extrato de *Ginkgo biloba* não aumenta a frequência de alterações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos humanos do sangue periférico nas concentrações estudadas;
- O extrato de *Ginkgo biloba* demonstrou indícios de que é capaz de reduzir a formação de alterações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos humanos do sangue periférico após irradiação com 2Gy por radiação gama;
- O extrato de *Ginkgo biloba* demonstra comportamento radiomitigador ao diminuir o estresse celular ao dano radioinduzido;
- Mais estudos devem ser feitos com um número maior de células para confirmar este comportamento e para avaliar o comportamento do extrato em diferentes doses absorvidas e diferentes tipos de radiação.

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, 2009.

ACTIVE PHARMACEUTICA, O que são radicais livres e como o estresse oxidativo afeta nosso organismo?, Publicado em 06 de julho de 2020. Disponível em: <<https://activepharmaceutica.com.br/blog/o-que-sao-radicais-livres-e-como-o-estresse-oxidativo-afeta-nosso-organismo>> Acesso em: 02/04/2021.

AHMED, Mahmoud Mohamed et al. Papel radioprotetor do α -tocotrienol contra danos oxidativos em hemoculturas humanas irradiadas com y. **Biosci. j. (Online)**, p. 400-409, 2018.

ALAM, Sally S.; HASSAN, Nahed S.; RAAFAT, Bassem M. Evaluation of oxidatively generated damage to DNA and proteins in rat liver induced by exposure to technetium radioisotope 99m and protective role of *Angelica archangelica* and *Ginkgo biloba*. **World Applied Sciences Journal**, v. 24, n. 1, p. 07-17, 2013.

ALMEIDA, Pedro Silva de. Dosimetria biológica: avaliação da exposição às radiações ionizantes através de efeitos biológicos induzidos. 2007.

ALOK, Amit; Agrawala, Paban K. Repurposing sodium diclofenac as a radiation countermeasure agent: a cytogenetic study in human peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, (), 503220–. doi:10.1016/j.mrgentox, 2020.

AMANI, Fatemeh et al. O efeito protetor da oleuropeína contra citotoxicidade induzida por radiação, apoptose e danos genéticos em linfócitos humanos cultivados. **International Journal of Radiation Biology**, v. 97, n. 2, pág. 179-193, 2021.

ANDERSON, Rhona M. Biomarcadores citogenéticos de exposição à radiação. **Clinical Oncology**. 31.5: 311-318. 2019.

ARAÚJO, A. I. L. Nicolucci, P.; Almeida, D. P. Simulação computacional do processo de produção de raios-x para uso diagnóstico por método Monte Carlo utilizando o código PENELOPE. **XI Congresso Brasileiro de Física Médica**, 2006.

ARIVALAGAN S., Thomas N. S., Kuppusamy T., Namashivayam N. Radioprotective Effect of Carvacrol Against X-Radiation-Induced Cellular Damage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. 2015.

BARNES, J. ZUBAIR, M., JONH, K., POIRIER, M. C., MARTIN, F. L.; Carcinogens and DNA damage, **Biochemical Society Transactions** 46 1213–1224, 2018.

BARREIROS, André LBS; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação

entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, 29.1: 113-123., 2006.

BANOV, Daniel et al. Caracterização do extrato seco de Ginkgo biloba L. em formulações de uso tópico. *Acta farmacêutica bonaerense*, v. 25, n. 2, p. 219, 2006.

BONATO, Cassiane Cardoso; ELNECAVE, Regina Helena. Alterações tireoidianas associadas à radiação externa em crianças e adolescentes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 55, n. 6, p. 359-366, 2011.

BUSHONG, Stewart C. Ciência radiológica para tecnólogos : física, biologia e proteção / Stewart Carlyle Bushong ; [tradução Sandro Martins Dolghi... et al.]. – Rio de Janeiro : Elsevier, 2010.

BUSHONG, Stewart C. Radiologic science for technologists: physics, biology, and protection / Stewart Carlyle Bushong. Eleventh edition. | St. Louis, Missouri : Elsevier, 2017.

CARACCIOLO, Daniele, et al. Error-prone DNA repair pathways as determinants of immunotherapy activity: an emerging scenario for cancer treatment. *International journal of cancer*, 147.10: 2658-2668. 2020.

CALABRESE, Edward J. et al. Hormesis and Ginkgo biloba (GB): Numerous biological effects of GB are mediated via hormesis. *Ageing research reviews*, p. 101019, 2020.

CARUSO, Francisco; OGURI, Vitor. Sobre a necessidade do conceito de fóton. *Rev. Bras. Ensino Fís.*, São Paulo, v. 43, e20210011, 2021. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-11172021000100421&lng=en&nrm=iso>. acesso em 17 de maio de 2021. Epub em 10 de fevereiro de 2021. <https://doi.org/10.1590/1806-9126-rbef-2021-0011>.

CHO, Yoon Hee et al. Effects of the DNA repair inhibitors, cytosine arabinoside and 3-aminobenzamide, on the frequency of radiation-induced micronuclei, nuclear buds, and nucleoplasmic bridges. *Genes & genomics*, v. 42, n. 6, p. 673-680, 2020.

DA CRUZ, A. D. et al. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 313, n. 1, p. 57-68, 1994.

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, 2007.

DE FREITAS MENDES, Renata et al. POTENCIAL ANTIOXIDANTE E METABÓLITOS ESPECIAIS DE Coffea arabica: REVISÃO DE LITERATURA. *Anais do Seminário Científico do UNIFACIG*, n. 6, 2020.

DE LIMA, Ivysson Humberto Santos et al. ACIDENTE NUCLEAR DE CHERNOBYL: OS

EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 6, n. 1, p. 107, 2020.

DE SOUZA SILVA, Elaine Cristina; CAVALCANTI, Mariana Brayner; CARNEIRO, Paula Frassinetti Pereira. Radioterapia versus Radiossensibilidade Individual. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 1, n. 3, p. 111-117, 2014.

DEL CASTILLO, José Miguel Soriano; PASTOR, Alegría Montoro (Ed.). **Últimos avances en radioprotectores de origen natural**. Consejo de Seguridad Nuclear, 2013.

DOROW, F.; MEDEIROS, C. Proteção Radiológica no Diagnóstico e Terapia, **publicações do IFSC**, 138p., 2019.

EISVAND, Farhad; RAZAVI, Bibi Marjan; HOSSEINZADEH, Hossein. The effects of Ginkgo biloba on metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 34.8: 1798-1811. 2020.

EMERIT, I., et al. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 120.9: 558-561. 1994.

EMERIT, I., et al. Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. *Radiation research*, 1995, 144.2: 198-205.

ESMEKAYA, Meric Arda et al. Mutagenic and morphologic impacts of 1.8 GHz radiofrequency radiation on human peripheral blood lymphocytes (hPBLs) and possible protective role of pre-treatment with Ginkgo biloba (EGb 761). **Science of the total environment**, v. 410, p. 59-64, 2011.

FARAJI, S., Moosavi, E. A., Neshasteh-riz, A., Cheraghi, S., & Mayahi, S. Efeito Radioprotetor do Resveratrol, Crocin e Suas Combinações em Alterações Citogenéticas em Linfócitos Humanos. *Revista de Física e Engenharia Biomédica*, 2022.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, Michael et al. Iniciativa do projeto HUMN e revisão da validação, controle de qualidade e perspectivas para o desenvolvimento de ensaios automatizados de micronúcleos usando sistemas de citometria de imagem. **Jornal internacional de higiene e saúde ambiental**, v. 216, n. 5, pág. 541-552, 2013.

FENECH, Michael et al. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FERNANDES, T. de S. Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleo no biomonitoramento individual: estudo comparativo [dissertação de mestrado]. **Universidade**

Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

FEODOROVA, Y., Falk, M., Mirny, L. A., & Solovei, I. Viewing nuclear architecture through the eyes of nocturnal mammals. *Trends in cell biology*, 30(4), 276-289. 2020.

GABY, Alan R. Extrato de Ginkgo biloba: uma revisão. **Altern Med Rev**, v. 1, n. 4, pág. 236-242, 1996.

GAJENDIRAN, Natarajan et al. Resposta adaptativa induzida por nêutrons estudada em linfócitos humanos Go usando o ensaio do cometa. **Jornal de pesquisa de radiação**, v. 42, n. 1, pág. 91-101, 2001.

GARCÍA, O.; LAMADRID, A.; MANZANO, J. Células con múltiples micronúcleos, asociadas a enfermedad viral, detectadas durante el estudio de niños relacionados con el accidente de Chernobil. **Centro de Protección e Higiene de la Radiaciones**, p. 102-106, 1990.

GEORGIEVA, Svetlana; POPOV, Borislav; BONEV, Georgi. Radioprotective effect of *Haberlea rhodopensis* (Friv.) leaf extract on-radiation-induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant levels in rabbit blood. 2013.

GONÇALO, Margarida; BOTELHO, Maria Filomena. Radiações e electricidade. 2007.
HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand**. Artmed Editora, 2018.

HENEINE, I. F. Biofísica Básica, **Atheneu**, 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, 2020.

HOSSEINIMEHR, Seyed Jalal et al. O efeito radioprotetor de *Zataria multiflora* contra a genotoxicidade induzida pela irradiação γ em linfócitos do sangue humano. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 26, n. 3, pág. 325-329, 2011.

HUTCHINSON, Marsha-Kay ND; MIERZWA, Michelle; D'SILVA, Nisha J. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene*, 39.18: 3638-3649. 2020.

HUANG, Shang-Zhen et al. Effect of ginkgo biloba extract on livers in aged rats. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 11, n. 1, p. 132, 2005.

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

JAGETIA, Ganesh Chandra; BALIGA, Manjeshwar Shrinath. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. **Toxicology letters**, v. 132, n. 1, p. 19-25, 2002.

JUNIOR, Messias Miranda et al. PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA RESPOSTA RELACIONADA A NEURODEGENERAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO EM SITUAÇÕES DE INFECÇÃO VIRAL. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 2, p. 129-144, 2020.

JUNQUEIRA, C. L., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, ed. 13, **Guanabara Koogan**, 2017.

KIEFER, M. et al. Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo). **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 3, p. 261, 2004.

KUNTIĆ, Vesna S. et al. Radioprotetores - o tópico perene. **Química e biodiversidade**, v. 10, n. 10, pág. 1791-1803, 2013.

LAMBERT, A. P. F., PAYERAS, M. R. *Atlas de histologia em cores da PUCRS*. EdIPUCRS, 2020.

Disponível em: <<https://editora.pucrs.br/edipucrs/acessolivre/livros/atlas-de-histologia/>>

Acesso em: 22 de janeiro de 2020.

LEE, Jin-Ho e HAUSMANN, Michael. Super-Resolution Radiation Biology: From Bio-Dosimetry to Nano-Studies of DNA Repair Mechanisms [Online First], **IntechOpen**, DOI: 10.5772, 2021.

LEITE, F. dos santos, Medeiros, M. D. F. C. Z., Militão, A. O., Braga, L. G. O., & Vasconcelos, D. S. C. ANÁLISE DE CONFORMIDADE DE RADIOPROTEÇÃO NOS SERVIÇOS DE ODONTOLOGIA RADIOPROTECTION COMPLIANCE ANALYSIS IN DENTAL SERVICES. *Temas em saúde*, Vol. 20, ed. 1, 2020.

LI, Man-Zhong et al. Investigation of Ginkgo biloba extract (EGb 761) promotes neurovascular restoration and axonal remodeling after embolic stroke in rat using magnetic resonance imaging and histopathological analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 989-1001, 2018.

LIU, Tingting et al. Ginkgo biloba extract EGb 761-induced upregulation of LincRNA-p21 inhibits colorectal cancer metastasis by associating with EZH2. **Oncotarget**, v. 8, n. 53, p. 91614, 2017.

LIVINGSTON K. RH JENSEN EB SILBERSTEIN JD HINNEFELD G. PRATT WL BIGBEE RG LANGLOIS SG GRANT AND R. SHUKLA, G. Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl. **International journal of radiation biology**, v. 72, n. 6, p. 703-713, 1997.

MANZI, Flávio Ricardo et al. Estudo morfológico do efeito radioprotetor da vitamina E (dl-alfa-tocoferil) na reparação tecidual em ratos. **Radiologia Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 367-371, 2003.

MAROZIK, Pavel et al. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident. **Experimental hematology**, v. 35, n. 4, p. 55-63, 2007.

- MENDES, M. E., Mendonça, SILVA, J. C. G., Hwang, S., Giorgio, M. D., Lima, F. F. D., & Santos, N. Calibration curves by ⁶⁰Co with low dose rate are different in terms of dose estimation—a comparative study. *Genetics and molecular biology*, 43(1).2020.
- MONTORO, A. et al. Assessment by cytogenetic analysis of the radioprotection properties of propolis extract. **Radiation protection dosimetry**, v. 115, n. 1-4, p. 461-464, 2005.
- MONTORO, A. et al. Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 2, p. 216-221, 2012.
- NOUAILHETAS, YANNICK et al. Radiações Ionizantes e a vida. **Rio de Janeiro: CNEN**, 2005.
- MORAES, B. T. F. Efeito Compton em Face da Dualidade das Partículas, **IFPA Campus Belém Publicações – Proc. 23051.015762/2020-21** 2020.
- MUN, GI, Kim, S., Choi, E., Kim, CS, & Lee, YS. Farmacologia dos radioprotetores naturais. *Arquivos de pesquisa farmacêutica*, 41 (11), 1033-1050,2018.
- NOUAILHETAS, YANNICK et al. Radiações Ionizantes e a vida. **Rio de Janeiro: CNEN**, 2005.
- NOSRATI, Hamed et al. Evaluation radioprotective effect of curcumin conjugated albumin nanoparticles. **Bioorganic chemistry**, v. 100, p. 103891, 2020.
- OBRADOR, Elena et al. Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice. **Biomedicines**, v. 8, n. 11, p. 461, 2020.
- OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013.
- OKUNO, Emico. Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios, **Oficina de textos**, 2018.
- PRASAD N. R., Srinivasan M., Pugalendi K. V., Menon V. P. Protective effect of ferulic acid on gamma-radiation-induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes. **Mutat Res.** 2006.
- PODRALSKA, Marta, et al. Non-Coding RNAs in Cancer Radiosensitivity: MicroRNAs and lncRNAs as Regulators of Radiation-Induced Signaling Pathways. **Cancers**, 12.6: 1662. 2020.
- POHL-RÜLING, J. Aberrações cromossômicas induzidas por dose baixa em linfócitos de sangue humano. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 45, n. 1-4, pág. 623-627, 1992.
- PROKHOROVA, Evgeniia A., et al. The DNA-damage response and nuclear events as regulators of nonapoptotic forms of cell death. **Oncogene**, 39.1: 1-16. 2020.

QINDEEL, Rabia. Effect of gamma radiation on morphological & optical properties of ZnO nanopowder. **Results in physics**, v. 7, p. 807-809, 2017.

Rahgoshai S, Mehnati P, Aghamiri MR, Haghghi Borujeini M, Banaei A, Tarighatnia A, Nader ND, Kiapour M, Abedi-Firouzjah R. **Evaluating the radioprotective effect of Cimetidine, IMOD, and hybrid radioprotectors agents: An in-vitro study**. *Appl Radiat Isot.* 2021 Aug;174:109760. doi: 10.1016/j.apradiso.2021.109760. Epub 2021.

RAVIRAJ, Jayam et al. Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. **Indian Journal of Dental Research**, v. 25, n. 1, p. 83, 2014.

RODRIGUES, Alice Pontara Pazini et al. O PARADOXO DAS RADIAÇÕES X. **Revista Interdisciplinar Pensamento Científico**, v. 5, n. 5, 2019.

SANTIAGO, Thiago Bosetti, et al. CASPASE NO PROCESSO DA APOPTOSE. **Anais do Seminário Científico do UNIFACIG**, 6, 2021.

Satria D, Silalahi J, Haro G, Ilyas S, Hasibuan PAZ. Cytoprotective Activity of Ethylacetate Fraction of *Picria fel-terrae* Lour. Herbs. Open Access **Maced J Med Sci**. 2019 Nov 14;7(22):3865-3867. doi: 10.3889/oamjms.2019.521. PMID: 32127993; PMCID: PMC7048334, 2019.

SAVASKAN, Egemen et al. Treatment effects of Ginkgo biloba extract EGb 761® on the spectrum of behavioral and psychological symptoms of dementia: meta-analysis of randomized controlled trials. **International psychogeriatrics**, v. 30, n. 3, p. 285-293, 2018.

SIA J, Szmyd R, Hau E and Gee HE. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:41, 2020.

SILVA, C. G., ARAÚJO P. C. M., JUNIOR P. R. B., LUNAS. F. R., O USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE TIREOIDE COM USO DE IODO RADIOATIVO, *Rev. Conexão Eletrônica – Três Lagoas, MS - Volume 16 – Número 1 – Ano 2019a.*

SILVA, J. C. G., LIMA, F. F., MENDES, M. E., GOMES, F. O., MELO, L., FREIRES, J., NASCIMENTO, A., HWANG, S. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM SANGUE HUMANO IRRADIADO COM FEIXE MISTO DE NÊUTRON-GAMA EM TRÊS DIFERENTES DOSES ABSORVIDAS, **ANAIS: ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA**: 24-27. 2019b.

SILVA, Amélia M., et al. Ginkgo biloba L. leaf extract protects HepG2 cells against paraquat-induced oxidative DNA damage. *Plants*, 8.12: 556. 2019c.

SILVA, Luciana Maria et al. DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM LINHAGEM TUMORAL APÓS IRRADIAÇÃO, 2002.

SINGH, Sandeep Kumar et al. Neuroprotective and antioxidant effect of Ginkgo biloba extract against AD and other neurological disorders. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 666-

674, 2019.

SIQUEIRA, Williams Nascimento de. **Estudo do efeito radioprotetor do flavonóide quercetina sobre linfócitos humanos**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SIQUEIRA, W. N., Melo, L. S., Lima, M. V., Luna Filho, R. L., Melo, A. M., & Silva, E. B. Radioprotective effect of flavonoid quercetin on human lymphocytic cells. 2017.

SIQUEIRA, Williams Nascimento de. FTJ, de Souza, TF, de Vasconcelos Lima, M., Silva, HAMF, de Oliveira, PSS, ... e de Albuquerque Melo, AMM. Estudo do efeito radiomitigador potencial da quercetina em linfócitos humanos. *Inflamação*, 42 (1), 124-134, 2019.

SMITH, Tyler A. et al. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2017.

STOROZYNSKY, Quinn; HITT, Mary M. The impact of radiation-induced DNA damage on cGAS-STING-mediated immune responses to cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8877, 2020.

TAUHATA, Luiz et al. **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. CBPF, 2003.

TAUHATA, L., Salati, I. P. A., Di Prinzio, R., Di Prinzio, M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos - 10ª revisão abril/2014 - Rio de Janeiro - **IRD/CNEN**. 344p., 2014.

TAYLOR, Rebecca C.; CULLEN, Sean P.; MARTIN, Seamus J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9.3: 231-241. 2008.

THIERENS, Hubert; VRAL, Anne. O ensaio do micronúcleo em acidentes de radiação. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v. 45, n. 3, pág. 260-264, 2009.

TOMAZ, L. F. Otimização do crescimento dos cristais cintiladores inorgânicos em matriz CsI dopada com lítio para uso como detectores de radiação. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN-SP), São Paulo, SP (Brasil). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear, 2019.

TEWARI, S., Patel, M., Debnath, AV, Mehta, P., Patel, S., & Bakshi, S. Extrato de folha de bambu melhora a genotoxicidade induzida por radiação: um estudo in vitro do ensaio de aberração cromossômica. *Journal of Herbal Medicine*, 31, 100528, 2022.

VELLOSA, José Carlos Rebuglio, et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, 7.1: 10152-10168, 2021.

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, 2011.

WOJCIK, Andrzej; HARMS-RINGDAHL, Mats. Radiation protection biology then and now. **International journal of radiation biology**, v. 95, n. 7, p. 841-850, 2019.

XIONG, Yuan et al. Descoberta de inibidores naturais contra SARS-CoV-2 3CLpro das folhas de Ginkgo biloba por meio de triagem em grande escala. **Fitoterapia** , p. 104909, 2021.

YU, Ting et al. Standardized Ginkgo biloba extract EGb 761® attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage via suppressing neuronal apoptosis through the activation of Akt signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 329-337, 2018.

YUAN, Chung-Hsiang; FILIPPOVA, Maria; DUERKSEN-HUGHES, Penelope. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): **mechanisms and implications for therapy**. **Viruses**, 4.12: 3831-3850. 2012.

YUAN, Qiuju et al. Effects of Ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews. **Journal of ethnopharmacology**, v. 195, p. 1-9, 2017.

YUSHKOVA, Elena. Genetic mechanisms of formation of radiation-induced instability of the genome and its transgenerational effects in the descendants of chronically irradiated individuals of *Drosophila melanogaster*. **Radiation and environmental biophysics**, 1-16, 2020.

ZHAO, Beibei et al. UV-B promotes flavonoid synthesis in Ginkgo biloba leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 112483, 2020.

ANEXO I

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
- [2] parei de fumar há mais de dois anos
- [3] parei de fumar a menos de dois anos
- [4] fumo menos de dez cigarros por dia
- [5] fumo de dez a vinte cigarros por dia
- [6] fumo mais que vinte cigarros por dia
- [7] só fumo charuto ou cachimbo

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
- [2] menos que três
- [3] cinco a dez
- [4]

mais que dez

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	sofre atual-	Desde há ANOS /	Sob Tratamento
--	-------	--------------	-----------------	--------------------	----------------

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

[Digite aqui]

ANEXO II

**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 do extrato de *Gingko biloba* pela análise citogenética em linfócitos humanos do sangue periférico irradiado.), 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 rubriche 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 *Gingko biloba*, em linfócitos humanos do sangue periférico cultivados, comparando a frequência de micronúcleos 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,

[Digite aqui]

[Digite aqui]

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 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 do extrato de *Gingko biloba* pela análise citogenética em linfócitos humanos do sangue periférico irradiado”, 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: _____

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

Impressão
digital
(opcional)

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

[Digite aqui]

[Digite aqui]

[Digite aqui]