

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO - UNIBRA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

EVELIN MIRELLE LIMA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMITIGADOR DO EXTRATO DE *GINKGO BILOBA*
EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS POR MEIO DO ENSAIO DE
MICRONÚCLEOS**

RECIFE/2024

EVELIN MIRELLE LIMA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOMITIGADOR DO EXTRATO DE *GINKGO BILOBA*
EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS POR MEIO DO ENSAIO DE
MICRONÚCLEOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Disciplina TCC II do Curso de Bacharelado em
Biomedicina do Centro Universitário Brasileiro -
UNIBRA, como parte dos requisitos para conclusão
do curso.

Orientador: Prof. Dr. Andriu dos Santos Catena

Co-orientadoras: Dra. Mariana Esposito Mendes e
Dra. Fabiana Farias de Lima

RECIFE/2024

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Laís Cardoso, CRB-4/PE-1753/P.

A663a Araújo, Evelin Mirelle Lima.

Avaliação do efeito radiomitigador do extrato de ginkgo biloba em
linfócitos humanos irradiados por meio do ensaio de micronúcleos /
Evelin Mirelle Lima Araújo. - Recife: Edição do Autor, 2024.

38p. : il. color.

Orientador(a): Dr. Andriu dos Santos Catena.

Co-orientadoras: Dra. Mariana Esposito Mendes e Dra. Fabiana
Farias de Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário Brasileiro –
Unibra. Curso Graduação em Bacharelado em Biomedicina, 2024.

Inclui Referências.

1. Radiação ionizante. 2. Micronúcleos. 3. Dosimetria biológica. 4.
Radioproteção e Ginkgo biloba. I. Centro Universitário Brasileiro -
UNIBRA. II. Título.

CDU: 616-071

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me guiado e ter me dado forças quando pensei que não conseguiria. À minha família, que sempre me apoiou em meus sonhos e nunca mediu esforços para me ajudar a concretizá-los. Ao meu querido Leo, que sempre acreditou em mim, me ouviu e me ajudou sempre que precisei, me dando ânimo durante minha jornada. Aos meus amigos do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE e aos meus orientadores, Fabiana, Mariana e Júlio, por todo o apoio prestado e todo o conhecimento passado. Ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, por fornecer os meios para a construção deste trabalho e ao CNPq pelo fomento à pesquisa. A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Uma mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará a ser do seu tamanho
original.

(Albert Einstein)

RESUMO

A radiação ionizante é um importante elemento incluído no cotidiano da sociedade atual, seja para a medicina, indústria alimentícia ou farmacêutica, esterilização de materiais e diversas outras aplicações. Devido à energia que transporta com capacidade de ionizar elétrons de uma matéria, o seu uso pode produzir danos à saúde humana. Assim, além do emprego da proteção e segurança radiológica, surge a possibilidade do uso de radiomitigadores - substâncias em estudo que reduzem os danos causados pela radiação, como as alterações cromossômicas que são identificadas utilizando análises citogenéticas. O extrato de *Ginkgo biloba* é uma dessas substâncias que possui potencial radiomitigador graças às substâncias presentes em suas folhas. Essas sequestram e neutralizam radicais livres que causam prejuízo ao material genético e a outros componentes presentes nas células humanas. Este estudo teve a finalidade de avaliar o efeito radiomitigador *in vitro* do extrato de *Ginkgo biloba* em linfócitos humanos do sangue periférico expostos à radiação gama por meio da 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. As amostras foram expostas à fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacel 220) a uma dose de 0,5Gy. As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir das culturas de linfócitos segundo protocolo padrão, onde o extrato de *Ginkgo biloba* em diferentes concentrações foi aplicado após irradiação e antes do processo de cultura dos linfócitos. Para a dose e as concentrações testadas não foi possível confirmar a atividade radiomitigadora, embora outros trabalhos com doses mais elevados conseguiram mostrar resultados satisfatórios. O estudo da melhor concentração radiomitigadora do extrato de *Ginkgo biloba* poderá beneficiar no futuro, não apenas indivíduos envolvidos em exposição acidental, mas também, na medicina para os pacientes que vivenciam procedimentos radiológicos médicos, terapias e diagnóstico.

Palavras-chave: Radiação Ionizante; Micronúcleos; Dosimetria Biológica; Radioproteção e *Ginkgo biloba*.

ABSTRACT

Ionizing radiation is an important element included in the daily lives of today's society, whether for medicine, the food or pharmaceutical industry, sterilization of materials and several other applications. Due to the energy it carries with the ability to ionize electrons in a matter, its use can cause harm to human health. Thus, in addition to the use of radiological protection and safety, the possibility of using radiomitigates arises - substances under study that reduce damage caused by radiation, such as chromosomal changes that are identified using cytogenetic analysis. Ginkgo biloba extract is one of these substances that has radiomitigation potential thanks to the substances present in its leaves. These sequester and neutralize free radicals that cause damage to genetic material and other components present in human cells. This study aimed to evaluate the in vitro radiomitigation effect of Ginkgo biloba extract on human peripheral blood lymphocytes exposed to gamma radiation using the micronucleus technique by blocking cellular cytokinesis. A healthy, non-smoking volunteer was selected after signing the Informed Consent Form. The samples were exposed to the ^{60}Co source (Gammacel 220 irradiator) at a dose of 0.5Gy. Cytological preparations for chromosomal analyzes were obtained from lymphocyte cultures according to a standard protocol, where Ginkgo biloba extract in different concentrations was applied after irradiation and before the lymphocyte culture process. For the dose and concentrations tested, it was not possible to confirm the radiomitigation activity, although other studies with higher doses managed to show satisfactory results. The study of the best radiomitigation concentration of Ginkgo biloba extract could benefit in the future, not only individuals involved in accidental exposure, but also in medicine for patients undergoing medical radiological procedures, therapies and diagnosis.

Keywords: Ionizing radiation; Micronuclei; Biological Dosimetry; Radioprotection and *Ginkgo biloba*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Demonstração de Transferência Linear de Energia	11
Figura 2: Visualização de Linfócito em Sangue Periférico	13
Figura 3: Representação das Fases do Ciclo Celular	14
Figura 4: Ilustração da Formação do Micronúcleo	16
Figura 5: Folhas de <i>Ginkgo biloba</i>	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência e distribuição de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados com 0,5 Gy em radiação gama, tratados e não tratados com Egb nas concentrações de 0,05 e 0,025 µg/ml.....22

Tabela 2 - Comparação entre as frequências de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados com 0,5 Gy e 2 Gy em radiação gama, nos grupos irradiados e não tratados e irradiados e tratados com Egb nas concentrações de 0,05 e 0,025 µg/ml.....23

Tabela 3: Comparação entre as frequências de alterações citogenéticas em linfócitos humanos irradiados com 0,5 Gy e 2 Gy em radiação gama utilizando extrato de própolis como radiomitigador.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	– Celsius
⁶⁰ Co	– Cobalto 60
ATP	– Adenosina Trifosfato
BN	– Binucleada
CBMN	– Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese
CCS-UFPE	– Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco
CRCN-NE	– Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
DEN-UFPE	– Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
DSBs	– Quebra de Dupla Fita
EGB	– Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>
FISH	– Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
Gy	– Gray
IAEA	– Agência Internacional de Energia Atômica
IOE	– Indivíduos Ocupacionalmente Expostos
KCl	– Cloreto de Potássio
LET	– Transferência Linear de Energia
MN	– Micronúcleos
PCC	– Condensação Prematura de Cromossomos
RBE	– Efetividade Biológica Relativa
RI	– Radiação Ionizante
RNA	– Ácido Ribonucleico
RNS	– Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	– Espécies Reativas de Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos	9
3 REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1 Radiação Ionizante	10
3.2 Interação da Radiação Ionizante com a Matéria	10
3.2.1 Efetividade Biológica Relativa (RBE)	10
3.2.2 Transferência Linear de Energia (LET)	11
3.2.3 Dose e Taxa de Dose	12
3.3 Dosimetria Biológica	12
3.3.1 Linfócitos Humanos	13
3.3.2 Ciclo Celular	13
3.3.3 Stress Oxidativo e Antioxidantes	14
3.3.4 Danos Radioinduzidos na Formação do Micronúcleo	15
3.3.5 Ensaio de Micronúcleo por Bloqueio de Citocinese	16
3.4 Radioprotetores e Radiomitigadores	17
3.4.1 Ginkgo biloba e suas propriedades.....	17
3.5 Importância do Profissional Biomédico na Radiobiologia	18
4 DELINEAMENTO METODOLÓGICO	19
4.1 Grupos controles.....	19
4.2 Grupo irradiado tratado com Extrato de Ginkgo biloba.....	20
4.3 Irradiação das amostras.....	20
4.4 Cultivo celular	20
4.5 Preparação das lâminas e análise microscópica.....	21

4.6 Análise estatística	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
7 REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A exposição à radiação ionizante (RI) é algo permanente na vida dos seres vivos, seja através de fontes naturais ou artificiais, sendo as fontes artificiais provenientes da atividade antropogênica como nos setores de medicina, indústria e produção nuclear, incluindo também acidentes e testes nucleares. As fontes naturais advêm da radiação cosmogênica e de radionuclídeos terrestres que são responsáveis por 84% da exposição dos seres vivos (Dos Santos Junior *et al.*, 2017; Moreno Onofre *et al.*, 2020).

A RI é qualquer onda eletromagnética ou partícula capaz de produzir íons que pode causar alterações químicas imediatas nos tecidos biológicos, levando a danos celulares. Isso ocorre, principalmente, devido a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Os radicais livres, por consistirem de átomos com elétrons não emparelhados, são altamente reativos e capazes de alterar todas as moléculas biológicas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lipídios (Ping xu *et al.*, 2014; Georgieva *et al.*, 2013; Cirilo *et al.*, 2021).

Ao depositar sua energia nas células, de forma parcial ou total, a radiação ionizante leva a um espectro de lesões no DNA, dentre elas, a quebra da dupla fita (DSBs). Os DSBs, por sua vez, se não reparados, ocasionam mutações genéticas, alterações cromossômicas ou morte celular.

As alterações cromossômicas são utilizadas como indicadores citogenéticos para avaliar os efeitos da exposição à radiação ionizante, se destacando o cromossomo dicêntrico, cuja técnica é considerada “padrão ouro” na Dosimetria Biológica, no que se refere a classe de indicadores citogenéticos específicos à radiação ionizante, devido a sua especificidade a este agente clastogênico (IAEA, 2011).

Outro tipo de bioindicador citogenético é o micronúcleo (MN). Os MN consistem em pequenos núcleos encontrados no citoplasma formados durante a anáfase, onde fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros não são incluídos em nenhum dos núcleos filhos. Assim, se manifestam no interior do citoplasma das células filhas como pequenos objetos esféricos que apresentam as mesmas propriedades e coloração que os núcleos, indicando quebra e perda de cromossomos. Embora os MN não sejam específicos a radiação, por ser produzido por outros agentes clastogênicos,

este bioindicador apresenta reprodutibilidade nas respostas diante da exposição à RI. A detecção de MN em células binucleadas, a partir do teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) confere, então, um método confiável à exposição desse agente (Rastkhah *et al.*, 2016; Nairy *et al.*, 2017; Lusiyanti *et al.*, 2016).

O estudo de substâncias com potencial radioprotetor faz-se interessante, tendo em vista a capacidade das mesmas em eliminar a formação de compostos reativos, desintoxicar espécies induzidas por radiação e impulsionar a estabilização de biomoléculas vitais. Um exemplo de vegetal com possível potencial radioprotetor e radiomitigador é a *Ginkgo biloba*, uma árvore existente há 200 milhões de anos, cujo extrato de suas folhas possui compostos ativos, como flavonoides e terpenóides que, além de sequestrar radicais livres, atua como antioxidante e reduz quebras cromossômicas derivadas da radiação ionizante (Grollino *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2020; Cavalcanti, 2021).

Diante disso, este trabalho visou avaliar o potencial radiomitigador do extrato de *Ginkgo biloba*, demonstrando a possibilidade da utilização deste composto como uma via que reduza os efeitos colaterais nos seres humanos expostos à radiação ionizante, principalmente no setor de medicina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados *in vitro* por radiação gama a uma dose absorvida de 0,5 Gy, envolvendo diferentes concentrações do extrato de *Ginkgo biloba*;
- Avaliar o índice de dispersão e a distribuição celular de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados *in vitro* por radiação gama com dose absorvida de 0,5Gy, envolvendo diferentes concentrações do extrato de *Ginkgo biloba*;
- Analisar o efeito radiomitigador em linfócitos humanos irradiados *in vitro* por radiação gama a uma dose absorvida de 0,5 Gy, envolvendo diferentes concentrações do extrato de *Ginkgo biloba*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Radiação Ionizante

Radiações podem ser conceituadas como uma energia emitida por determinados elementos (naturais ou artificiais) ou equipamentos (Moreno Onofre *et al.*, 2020). Podem existir em forma de ondas eletromagnéticas ou partículas móveis, tendo potencial energético variável. Quando essa energia é grande o suficiente para remover elétrons de um átomo de determinada matéria, transformando-os em íons, essa radiação passa a ser classificada como ionizante, e ela segue ionizando átomos que encontra em seu caminho até que sua energia seja completamente absorvida (Cirilo *et al.*, 2021).

3.2 Interação da Radiação Ionizante com a Matéria

A radiação ionizante, sendo uma energia que possui movimento e se difunde em qualquer superfície, caso venha a colidir com um organismo vivo, essa ionização pode causar o rompimento de moléculas ali presentes, induzindo aquele tecido a mutações, câncer ou a própria morte celular, numa tentativa de recuperar o dano causado (Okuno, 2018).

Os átomos do tecido humano se unem por forças elétricas, formando diversos componentes importantes, como a água e DNA, por exemplo. Uma vez que a radiação ionizante retire um átomo dessas substâncias, elas vão se desestabilizar, podendo perder sua capacidade funcional e se rearranjar em outros componentes químicos, causando prejuízo àquele organismo (Okuno, 2013; Palácio *et al.*, 2014; Cirilo *et al.*, 2021).

3.2.1 Efetividade Biológica Relativa (RBE)

A efetividade biológica relativa (RBE) está diretamente relacionada à radiosensibilidade de tecidos humanos, isto é, diz respeito à forma como ele reage à radiação recebida, e pode ser descrita pela seguinte relação adimensional:

$$\text{RBE (A)} = \text{Dose referência} / \text{Dose radiação (A)}$$

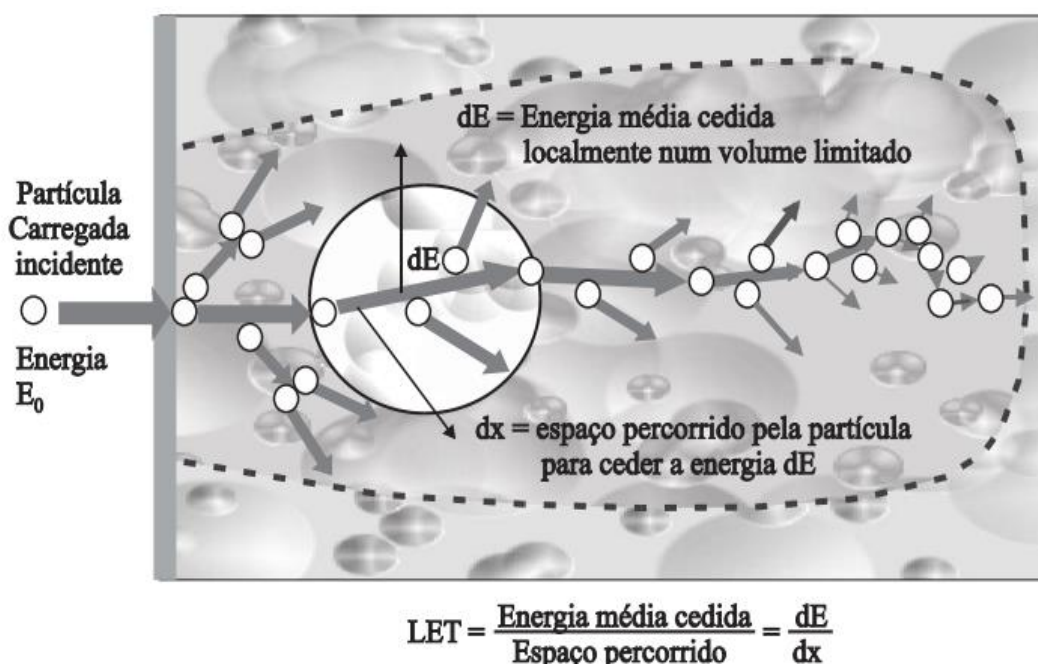
A dose referência diz respeito à dose de radiação e seus efeitos causados previamente definidos, enquanto a dose radiação (A) indica a dose de radiação que causa os mesmos efeitos, porém ela ainda não é conhecida. A RBE possui fatores influenciadores, tais como a transferência linear de energia, a dose e taxa de dose e idade do indivíduo exposto (Tauhata *et al.*, 2003; IAEA, 2011).

3.2.2 Transferência Linear de Energia (LET)

A definição do termo *Linear Energy Transfer* (LET) ou Transferência Linear de Energia, pode ser dita como a quantidade de energia média depositada ao longo de trajeto percorrido pela radiação um meio material (Salustiano, 2023), conforme se pode observar na figura 1.

Radiações de baixa LET (partículas beta, raios – x e raios gama) vão interagir de forma mais branda por depositarem sua energia de forma mais distribuída em uma trajetória mais longa ao incidir sobre o tecido humano, por exemplo. Já as radiações de alta LET (partículas alfa, nêutrons e fragmentos de fissão) são mais destrutivas por produzirem numerosas ionizações numa trajetória menor (Nuszkiewicz *et al.*, 2020).

Figura 1: Demonstração da Transferência Linear de Energia.



Fonte: Tauhata (2013).

3.2.3 Dose e Taxa de Dose

Um dos efeitos da interação da radiação com um meio é a transferência de energia, que em alguns momentos não é absorvida por completo, devido à variedade de formas de interação e composição do meio em questão. Esta quantidade de energia absorvida pode gerar ionizações dos átomos, quebra de ligações químicas de compostos e produção de energia térmica. A relação entre a energia absorvida e a massa do volume de material atingido diz respeito à grandeza dosimétrica Dose absorvida, sendo sua unidade, no sistema internacional, o joule por quilograma (J/kg), denominada gray (Gy). Já a Taxa de Dose se refere à quantidade de dose absorvida em um intervalo de tempo, sendo sua unidade Gy/s^{-1} (Tauhata, 2003; IAEA, 2011).

Assim, quanto maior a dose absorvida em um meio biológico, maior a probabilidade ou severidade dos efeitos. Da mesma forma, se para uma determinada dose absorvida definida, aquela que for depositada com uma taxa de dose maior, mais severos serão os danos (IAEA, 2011).

3.3 Dosimetria Biológica

A Dosimetria Biológica ou Biodosimetria é um método que busca investigar e avaliar os efeitos biológicos e, a partir de biomarcadores, estimar a dose absorvida em indivíduos expostos à radiação ionizante.

Para esta estimativa de dose absorvida em seres humanos, seja por acidente, indivíduos ocupacionalmente expostos (IOE) ou pacientes que fazem uso de radiação para tratamento de doenças, são utilizadas técnicas citogenéticas que relacionam a quantidade de alterações cromossômicas visualizadas com a dose absorvida de radiação (Amaral, 2002; Wathen, 2021).

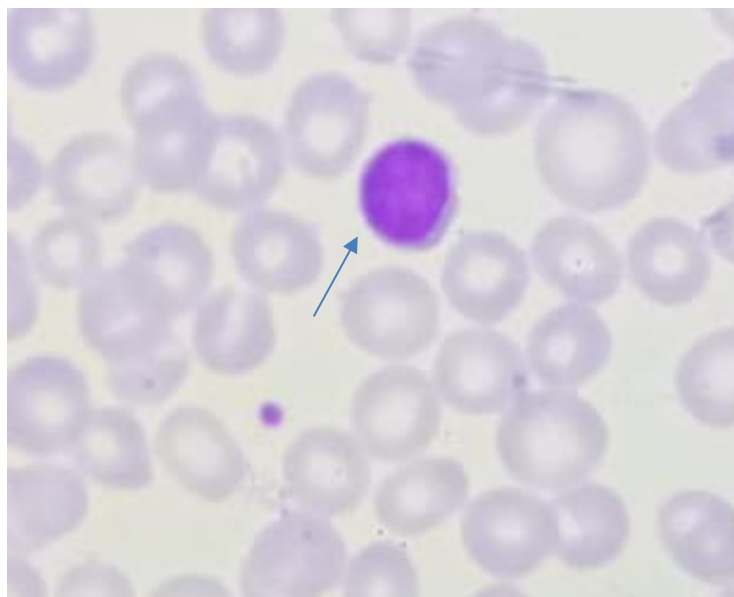
No que se refere à análise citogenética, várias técnicas foram desenvolvidas, sendo a considerada “padrão ouro” a técnica de cromossomos dicêntricos, por se tratar de uma alteração sensível e altamente específica para exposição à radiação (Pujol et al, 2014). Além desta, outras técnicas também são utilizadas, como a técnica de CBMN, ideal para triagem em casos de exposição em massa; a técnica de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), que permite visualizar as alterações cromossômicas em um período maior de tempo em relação ao momento de exposição; e a técnica de PCC (Condensação Prematura de Cromossomos), ideal para exposições a altas doses absorvidas ($>5\text{Gy}$) (IAEA, 2011).

3.3.1 Linfócitos Humanos

Linfócitos são células de defesa presentes no sistema imune humano capazes de atacar agentes infecciosos através de resposta humoral (com a produção de imunoglobulinas) ou citotóxicas (com o lançamento de substâncias destrutivas). Fazem parte do tecido sanguíneo e são originados na medula óssea, podendo ser encontrados em sangue periférico (Beu *et al.*, 2017).

Na biodosimetria, as células de escolha são os linfócitos periféricos por cumprirem alguns requisitos que os tornam ideais para esse tipo de análise, como sua alta radiosensibilidade, circulação por todo o corpo, vida média relativamente extensa e facilidade de obtenção no sangue periférico (IAEA, 2011), conforme observado na figura 2.

Figura 2 – Visualização de linfócito em sangue periférico.



Fonte: Acervo pessoal.

3.3.2 Ciclo Celular

Cada célula humana possui seu próprio ciclo de vida, sendo de muita importância para sua formação, reprodução e reparo. Este ciclo possui duas fases: a Interfase, que compreende os ciclos G1, S, G2 e a fase Mitótica (Díaz, 2003; Jamasbi *et al.*, 2022).

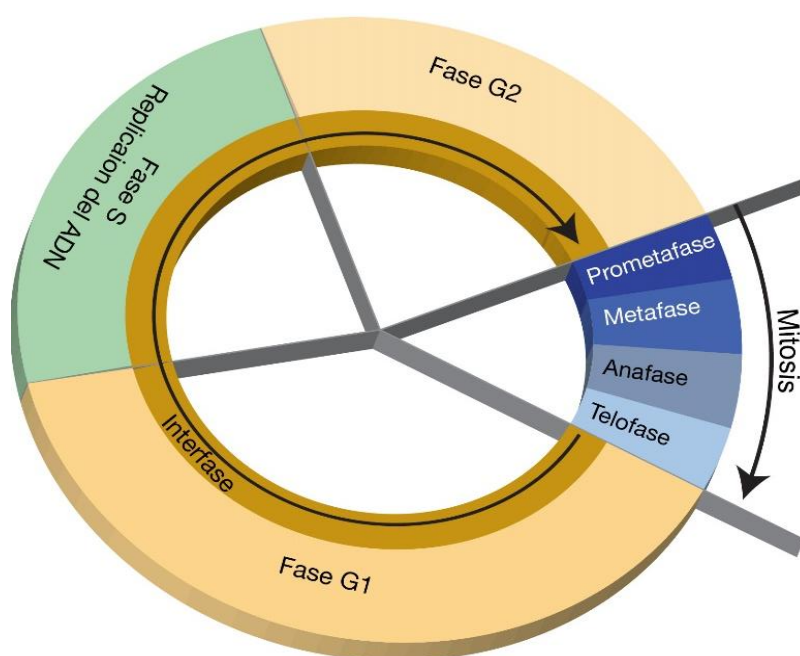
Na Interfase, a célula está em constante atividade metabólica e de crescimento, mais especificamente na etapa G1 observa-se a síntese de proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e o acúmulo de adenosina trifosfato (ATP). Na fase S, sendo a

mais longa da interfase, o material genético é replicado. Por último, na etapa G2, há a preparação final para adentrar na fase mitótica (García, 2014).

Na mitose há quatro etapas, sendo elas a prófase, onde a membrana nuclear é desfeita; a metáfase, onde os cromossomos se encontram altamente condensados e localizados no plano equatorial da célula; a anáfase, onde as cromátides-irmãs se separam e cada uma vai para um extremo da célula; e por fim, a telófase, onde as novas membranas nucleares se formam ao redor dos cromossomos filhos e, ao final desta fase, o resultado será duas células filhas com o material genético idêntico à célula-mãe (Díaz, 2003; Zatulovskiy, 2020).

Há ainda a fase G0, onde as células se encontram em um estado de repouso que pode ter duração variável de tempo, desde dias até anos, podendo permanecer nele até o fim de sua vida ou, se receber estímulos, voltar ao ciclo de reprodução celular novamente (Cruz, 2015).

Figura 3: Representação das fases do ciclo celular.



Fonte: National Human Genome Research Institute, 2020.

3.3.3 Stress Oxidativo e Antioxidantes

Para o funcionamento adequado do organismo, se faz necessário a atuação de moléculas antioxidantes, uma vez que o próprio metabolismo normal do oxigênio e do

nitrogênio gera radicais livres - moléculas com elétrons instáveis que capturam outros elétrons de compostos estáveis que prejudicam o funcionamento celular e geram uma reação em cadeia, capazes de alterar todas as moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídios.

Ainda que seja notável os danos causados pelas espécies reativas de nitrogênio, os efeitos biológicos das radiações ionizantes são intensificados na presença do oxigênio, já que a maior parte dos radicais livres que são formados ocorrem pela radiólise da água, como os peróxidos livres, radicais orgânicos e radicais hidroperóxidos, capazes de provocar a morte celular (Ferreira *et al.*, 2007; Parece, 2022).

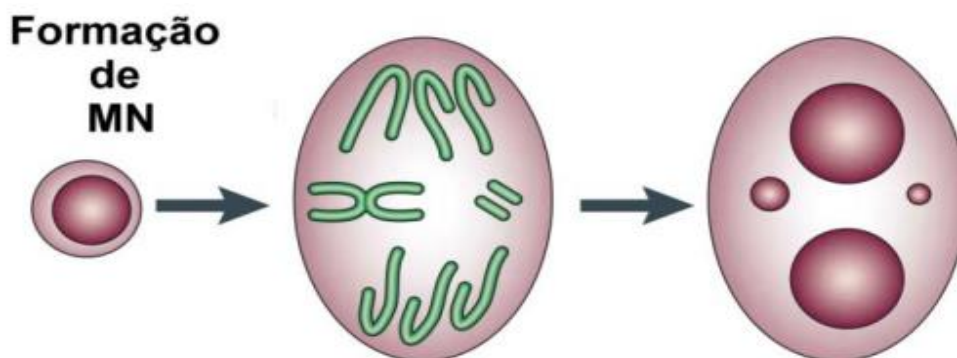
O sistema de defesa antioxidante auxilia na redução dos danos causados promovendo o equilíbrio homeostático do corpo. Pode ser dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático, sendo este último proveniente de substâncias endógenas ou de substâncias resultantes da alimentação (Barbosa *et al.*, 2010; Matos, 2020).

3.3.4 Danos Radioinduzidos na Formação do Micronúcleo

Os MN podem ser formados por fragmentos de DNA não incorporados ao núcleo durante a divisão celular e podem surgir devido à exposição a agentes clastogênicos. Esses podem resultar do DNA mal reparado ou de DSBs. Os MN também podem ser formados a partir de cromossomos inteiros que não foram incorporados aos núcleos principais (Fenech, 2000; Thierens & Vral, 2009).

Os fragmentos ou cromossomos inteiros envolvidos por uma membrana nuclear aparecem como pequenos núcleos no citoplasma de forma separada dos núcleos das células-filhas, como pode ser observado na figura 4. Em casos de acidentes envolvendo radiação ionizante, a estimativa de dose absorvida pode ser baseada na análise desses marcadores biológicos sensíveis que refletem os danos causados (IAEA, 2011).

Figura 4: Ilustração da formação do Micronúcleo.



Fonte: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), 2016.

3.3.5 Ensaio de Micronúcleo por Bloqueio de Citocinese

A técnica de CBMN foi desenvolvida em 1985 por Fenech e Morley, sendo um método para quantificar quebras cromossômicas e perda de células nucleadas. Devido à confiabilidade e reprodutibilidade, o ensaio de MN tornou-se um dos padrões de técnicas citogenéticas para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos em geral. De acordo com a Agência Internacional de Energia Atômica (*International Agency Atomic Energy* - IAEA), indivíduos saudáveis podem apresentar micronúcleos, onde os valores de *background* variam entre 0 a 40 MN a cada 1000 células analisadas (Thierens & Vral, 2009; IAEA, 2011).

Em termos de aplicação na área nuclear, o ensaio de CBMN é bastante versátil, podendo, inclusive, ser aplicada como triagem em casos de grandes acidentes com radiação ionizante envolvendo muitos indivíduos, onde é possível identificar quais foram os mais expostos à RI para que possam obter atendimento médico de forma prioritária (IAEA, 2011).

Este ensaio também pode ser aplicado em biomonitoramento de pacientes submetidos à radioterapia, na avaliação do potencial de risco associado à exposição interna à radiação, no estudo de inibição celular devido ao uso de radiofármacos e na avaliação do potencial de radioproteção de extratos vegetais, como o própolis e *Ginkgo biloba* (Rodrigues *et al.*, 2005).

3.4 Radioprotetores e Radiomitigadores

Devido ao uso recorrente da radiação ionizante pelos seres humanos e suas consequências, fez-se necessário a realização de estudos de substâncias com potencial radioprotetor que atuam inibindo ou reduzindo os efeitos derivados da RI.

Os radioprotetores são administrados antes da exposição à radiação como uma medida profilática, enquanto os radiomitigadores são administrados após a exposição, visando a redução dos efeitos radioativos (Ramalho *et al.*, 2022).

Algumas características devem ser consideradas para que uma substância seja elegível como radioprotetora ou radiomitigadora, tais como: proporcionar proteção para a maioria dos órgãos, possuir estabilidade e toxicidade aceitáveis, ter baixo efeito adverso e ter compatibilidade farmacológica com outras drogas. Embora seja difícil encontrar substâncias que atendam perfeitamente a todos esses requisitos, estudos estão sendo feitos para obtenção de melhores resultados.

Os radioprotetores podem ser sintéticos ou naturais, sendo este último mais vantajoso pela diminuição ou ausência de efeitos colaterais derivados do seu uso (Lopes *et al.*, 2022).

3.4.1 *Ginkgo biloba* e suas propriedades

A *Ginkgo biloba* é uma árvore primitiva, existente há 200 milhões de anos e é considerada um “fóssil vivo”. As árvores de *G. biloba* possuem entre 20 e 30 metros de altura. Suas folhas mais jovens adquirem uma coloração verde clara e suas folhas maduras exibem uma tonalidade verde mais escura, tomando um tom amarelo dourado à medida em que envelhecem (Eisvand *et al.*, 2020), conforme a figura 5.

Figura 5: Folha de *Ginkgo biloba*.



Fonte: Šamec *et al.* (2022).

O extrato de folha de *Ginkgo biloba* (Egb), possui várias propriedades farmacológicas por conter um grande número de compostos ativos, cerca de 110 flavonóides, incluindo flavonol e seus glicosídeos, flavona e seus glicosídeos, flavanona e seus glicosídeos, isoflavona e seus glicosídeos, flavan-3-óis, bioflavonóides e biginkgosídeos. Nos últimos anos, além de novos flavonóides, novos terpenóides e lignanas também foram isolados do Egb, sendo amplamente utilizados como fitoterápicos. Sua utilização deve-se ao fato do seu extrato capturar radicais livres e inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, assumindo assim um papel protetor contra os radicais hidroxil, peroxil e superóxido (Liu *et al.*, 2021).

Diante destas propriedades como: sequestrar radicais livres, atuar como antioxidante, inibir a apoptose e a agregação plaquetária, sua característica como um potencial radiomitigador consiste na tendência em reduzir quebras cromossômicas, resultantes de exposição à radiação ionizante (Grollino *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2020).

3.5 Importância do Profissional Biomédico na Radiobiologia

O profissional Biomédico atua em diversas áreas, como análises clínicas, estética, docência e pesquisa, análise ambiental, entre outras. Como profissional de saúde, um de seus focos é a prevenção da disseminação de doenças, a capacidade de entender como ela surge e o porquê (Da Silva, 2015).

A Radiobiologia é a ciência que estuda os efeitos biológicos da radiação ionizante, como alterações celulares e moleculares, sendo o DNA um dos mais afetados. Este conhecimento leva à aplicação dos conceitos de radiobiologia para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, como a radioterapia. Para ampliar o uso dessa ciência na medicina, se faz necessário a atuação de profissionais biomédicos para realizar estudos e pesquisa científica na área, inclusive no fator radioproteção, devido aos possíveis danos causados pela RI, a fim de que todo o potencial positivo destes tipos de radiações possa ser aproveitado em benefício da sociedade (Arango *et al.*, 2019; Sousa, 2018).

4 DELINEAMENTO METODOLÓGICO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE. O projeto passou por avaliação do comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS – UFPE), (CAAE: 77151723.6.0000.5208 / Parecer: 6.702.069).

A metodologia se iniciou com a seleção de um doador voluntário de 27 anos de idade e do sexo masculino saudável e não-fumante, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Segundo critério utilizado por GAJENDIRAN et al (2001), foi realizada a anamnese por meio de questionário para verificar se nos últimos seis meses antes da coleta o voluntário não foi exposto à radiação terapêutica ou diagnóstica, vacinação viral ou consumiu drogas ilícitas. Posterior a este questionário, foram coletadas amostras de sangue periférico (5 ml cada), por coleta de sangue a vácuo contendo heparina.

4.1 Grupos controles

Foram preparados três grupos controles: controle não irradiado, controle do extrato e controle irradiado.

O sangue controle (não irradiado) foi analisado para verificação do nível de *background* da frequência de micronúcleos derivados dos agentes clastogênicos, no qual foram adotadas as recomendações da Agência Internacional de Energia Atômica (International Agency Atomic Energy - IAEA), onde o número de micronúcleos deve estar na faixa de 0 a 40 em mil células binucleadas (IAEA, 2011).

O controle do extrato foi verificado a partir da cultura de linfócitos não irradiados, contendo o EGB (Merck) nas concentrações de 0,025 e 0,05 µg/ml, a fim de verificar se o extrato leva à estimulação da formação de micronúcleos. As amostras controles foram separadas em alíquotas de 5 ml para cada concentração.

O controle irradiado foi utilizado para verificar a frequência de micronúcleos devido à exposição da amostra com a mesma dose absorvida que as amostras que foram tratadas com a *Ginkgo biloba*. Com isso, por meio de comparação, verificar a existência do potencial radiomitigador no extrato.

4.2 Grupo irradiado tratado com Extrato de Ginkgo biloba

No grupo irradiado tratado, o extrato foi adicionado às amostras 30 minutos depois da irradiação das mesmas. Foram utilizadas duas diferentes concentrações do extrato, 0,025µg/ml e 0,05µg/ml, para verificar qual apresentaria o melhor efeito radiomitigador.

4.3 Irradiação das amostras

No processo de irradiação, cada amostra de sangue foi separada em alíquotas de 5ml, exposta a uma fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (DEN-UFPE), cuja sala de irradiação estava a uma temperatura de $\sim 22^\circ\text{C}$. As amostras foram irradiadas em Kerma no ar e os valores foram convertidos em dose absorvida de forma a resultar nas amostras o valor de dose absorvida de 0,5 Gy (IAEA, 2011).

Vale ressaltar que as amostras não irradiadas foram coletadas no mesmo instante das amostras a irradiar e mantidas no LDB/CRCN-NE também a uma temperatura de $\sim 22^\circ\text{C}$.

4.4 Cultivo celular

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos, onde 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) e 0,1 ml de fitohemaglutinina (Sigma). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C , por 68 horas. Após 24 horas foi adicionado 0,02 ml de citocalasina B (Sigma) para interromper a citocinese e evitar que a célula se divida em duas novas células. Ao completar 72 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 180 g, o sobrenadante desprezado e adicionado 7 ml de cloreto de potássio (KCl), para que ocorresse o choque hipotônico. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 180 g, 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.

4.5 Preparação das lâminas e análise microscópica

As lâminas foram confeccionadas a partir do precipitado de células ressuspenso em 0,5 ml de solução fixadora. Este precipitado foi delicadamente gotejado em dois pontos da lâmina e colocado para secar a temperatura ambiente durante 24h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% durante 20 minutos para posterior análise microscópica.

A contagem de micronúcleos foi realizada no microscópio óptico (Leica DM 500) e foram contabilizadas 3000 células binucleadas viáveis. Há alguns critérios que devem ser seguidos para considerar uma célula binucleada (BN) viável, como: os dois núcleos em uma célula BN devem ter membranas nucleares intactas; devem ter aproximadamente o mesmo tamanho e padrão de intensidade de coloração; entre outros. Os MN, da mesma forma, para serem aceitos na contabilização devem ter diâmetro de 1/16 a 1/3 do diâmetro médio dos núcleos principais; podem se tocar, mas não sobrepor os principais núcleos; e o limite micronuclear deve ser distinguível do limite nuclear (Fenech, 2000; IAEA, 2011).

4.6 Análise estatística

Após a análise microscópica, foram realizados cálculos estatísticos, onde foi observado se a distribuição de células com MN se ajusta ou não a distribuição de Poisson à dose utilizada. Para tal verificação, foi aplicado o teste u de Papworth (AIEA, 2011; Acharya; et. al., 2009). A estatística do teste u é uma unidade normalizada do índice de dispersão (σ^2/y), onde valores de u superiores a 1,96 indicam sobredispersão significativa e os valores de $u < -1,96$ indicam a subdispersão significativa (AIEA, 2011).

Para avaliar o comportamento entre os diferentes tipos de amostras e validar a atuação do radiomitigador, foi utilizado o teste de ANOVA, Tukey e qui-quadrado (valor de $p < 0,005$). (Dardano, 2017 e Georgieva, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises em sua totalidade somaram 18.038 binucleadas viáveis. A frequência de micronúcleos nas células do grupo controle não irradiado e não tratado (0.006) se encontraram dentro do padrão recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica - 40 MN em até 1.000 BN (IAEA, 2011).

Os valores de u presentes na última coluna da tabela 1 se encontraram acima do valor de referência (1,96), indicando uma sobredispersão. Este comportamento já é esperado na análise de micronúcleos, uma vez que podem estar presente por diversos fatores.

No que diz respeito à frequência de MN no grupo controle não irradiado e tratado com o Egb nas concentrações de 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (0,005 e 0,004, respectivamente), foi possível observar que o extrato não causou estresse significativo nos linfócitos, já que a frequência de MN se encontrou dentro do valor de referência, indicando assim uma não toxicidade às células nessas concentrações, conforme demonstra a tabela 1.

TABELA 1: Frequência e distribuição de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados com 0,5 Gy em radiação gama, tratados e não tratados com Egb nas concentrações de 0,05 e 0,025 $\mu\text{g/ml}$.

Dose (Gy)	C	BN	MN	y	Distribuição celular					var	var/Y	u
					0Mn	1Mn	2Mn	3Mn	4Mn			
0	0	3036	17	0,006	3021	14	0	1	0	0,008	1,348	13,965
0	0,025	3000	14	0,005	2987	12	1	0	0	0,005	1,139	5,568
0	0,05	3002	12	0,004	2990	12	0	0	0	0,004	0,996	-0,148
0,5	0	3000	88	0,029	2929	57	11	3	0	0,042	1,426	16,579
0,5	0,025	3000	78	0,026	2928	68	3	0	1	0,031	1,205	7,996
0,5	0,05	3000	85	0,028	2925	67	6	2	0	0,036	1,254	9,911

*Legenda: C: Concentração; BN: Binucleadas; MN: micronúcleos; y: frequência de micronúcleos; var: Variância; var/y: Índice de dispersão; u: Teste u.

Já a frequência de MN nas células do grupo controle irradiado e não tratado obtiveram uma frequência de 0,029, uma vez que a radiação ionizante induz o aumento de MN em linfócitos humanos. Ao comparar os valores das frequências de MN do grupo controle com as do grupo irradiado, foram obtidas diferenças estatísticas através do teste de qui-quadrado (valor de $p < 0,001$).

Por fim, nos grupos irradiados e tratados com Egb nas concentrações de 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/ml}$, a frequência de MN resultou em 0,026 e 0,028, respectivamente. Esses valores de frequências de MN quando comparados estatisticamente (teste qui-quadrado) não apresentaram diferenças, já que foram muito próximos.

Ao comparar os resultados deste trabalho com os estudos de Silva (2023), pode-se observar que o extrato de *Ginkgo biloba* em ambas as concentrações 0,025 e 0,05 $\mu\text{g/ml}$ obtiveram uma função radiomitigadora ao diminuir eficientemente a frequência de micronúcleos nos linfócitos irradiados com dose absorvida de 2Gy, conforme mostra a tabela 2.

TABELA 2: Comparação entre as frequências de micronúcleos em linfócitos humanos irradiados com 0,5 Gy e 2 Gy em radiação gama, nos grupos irradiados e não tratados e irradiados e tratados com Egb nas concentrações de 0,05 e 0,025 $\mu\text{g/ml}$.

Dose (Gy)	C	BN	Mn	y	Distribuição celular						var	var/Y	u
					0Mn	1Mn	2Mn	3Mn	4Mn	5Mn			
0	0	3036	17	0,006	3021	14	0	1	0	0	0,008	1,348	13,965
0	0,025	3000	14	0,005	2987	12	1	0	0	0	0,005	1,139	5,568
0	0,05	3002	12	0,004	2990	12	0	0	0	0	0,004	0,996	-0,148
0,5	0	3000	88	0,029	2929	57	11	3	0	0	0,042	1,426	16,579
0,5	0,025	3000	78	0,026	2928	68	3	0	1	0	0,031	1,205	7,996
0,5	0,05	3000	85	0,028	2925	67	6	2	0	0	0,036	1,254	9,911
2	0	2000	477	0,239	1599	339	52	8	0	2	0,278	1,165	5,209
2	0,025	3000	274	0,091	2755	218	25	2	0	0	0,104	1,135	5,250
2	0,05	3000	277	0,092	2747	230	22	1	0	0	0,101	1,089	3,435

*Legenda: C: Concentração; BN: Binucleadas; MN: micronúcleos; y: frequência de micronúcleos; var: Variância; var/y: Índice de dispersão; u: Teste u.

Estes resultados mostram uma possível melhor resposta do extrato de *Ginkgo biloba* à exposição com doses mais altas. Este comportamento também foi observado

nos resultados de Montoro (2005), que utilizou extrato de própolis como radiomitigador utilizando a análise citogenética de cromossomos dicêntricos para avaliar os danos celulares causados pela exposição à radiação, como mostra a tabela 3.

TABELA 3: Comparação entre as frequências de alterações citogenéticas em linfócitos humanos irradiados com 0,5 Gy e 2 Gy em radiação gama utilizando extrato de própolis como radiomitigador.

Montoro (2005)	Dose (Gy)	Contagem de Dicêntricos	Células Contabilizadas	Y
Grupo tratado com o extrato de própolis	0,5	20	824	0,02
	2	101	649	0,15
Grupo não tratado com o extrato de própolis	0,5	49	1501	0,03
	2	127	440	0,28

*Legenda: Y: frequência de alterações citogenéticas.

Foi possível verificar que o efeito radiomitigador do extrato de própolis foi observado nas amostras irradiadas com 2 Gy, diferente das amostras irradiadas com 0,5 Gy, onde demonstrou não possuir efetividade.

Alguns autores realizaram estudos para verificar o efeito radioprotetor da *Ginkgo biloba*, como Cavalcanti *et al.* (2021), que demonstrou a forma significativa que o Egb atuou no cérebro de camundongos expostos à radiação ionizante reduzindo apoptose no tecido cerebral e minimizando danos que foram visualizados no grupo controle de camundongos irradiados e não tratados com Egb.

No experimento de Lu *et al.* (2024), os efeitos atenuantes do extrato de *Ginkgo biloba* nos danos induzidos pela radiação ultravioleta (UV) foram estudados em fêmeas de *Drosophila melanogaster*, conhecida como “mosca da fruta”. O extrato foi adicionado ao meio alimentar, e o resultados indicaram que a expectativa de vida média de *D. melanogaster* alimentada o extrato aumentou 5,80% em comparação com o grupo controle. Além disso, o extrato também promoveu a fertilidade da *D. melanogaster*.

Também estão presentes na literatura estudos com outros radioprotetores, como Lopes *et al.* (2022), que utilizou o suco de uva derivado da *Vitis labrusca L.*, demonstrando que a mesma não interfere nos efeitos citotóxicos da dose terapêutica

de Iodo-131 em células tumorais em tratamento oncológico, mas protege as células não tumorais, devido ao seu potencial antioxidante, sendo interessante realizar estudos *in vivo* para comprovar seu potencial radioprotetor.

A tese de Salgado (2020) investiga a influência do azul da Prússia (AzP) (composto químico com ação medicamentosa empregue em contaminações com Tálcio, Césio e Rubídio) em diferentes etapas da reprodução de camundongos irradiados. Em seus ensaios *in vitro* com os embriões, foi observado que o composto possui baixa toxicidade, não impediu a gestação e o parto, não interferiu nos parâmetros zootécnicos tais como primeiro parto em semanas e tamanho médio da ninhada, não apresentou efeito teratogênico e atuou ainda protegendo contra os raios gama de ^{60}Co .

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível observar que:

1. O extrato de *Ginkgo biloba* demonstrou não elevar a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos do sangue periférico nas concentrações estudadas (0,05 e 0,025 µg/ml);
2. O extrato de *Ginkgo biloba* não apresentou significância estatística na redução de micronúcleos em linfócitos humanos do sangue periférico após irradiação com 0,5 Gy por radiação gama;
3. O extrato de *Ginkgo biloba* não apresentou comportamento radiomitigador às frequências do dano radioinduzido pela dose de 0,5 Gy;
4. Mais estudos devem ser feitos com outros indivíduos e ampliando o número de células analisadas para confirmar este comportamento, incluindo diferentes doses absorvidas e diferentes tipos de radiação.
5. É importante continuar as pesquisas por radiomitigadores que sejam eficientes para exposição de baixas doses de radiação, tendo em vista que certos indivíduos são expostos a estes níveis de doses, como pacientes em radioterapia, em procedimentos médicos ou trabalhadores da área nuclear.

7 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; SANJEEV, G.; BHAT, N. N.; et al. **The effect of electron and gamma irradiation on the induction of micronuclei in cytokinesis-blocked human blood lymphocytes**. Radiation Environmental Biophys, v. 48, p. 197-203, 2009.
- AMARAL, A. **Trends in biological dosimetry: an overview**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 45, n. spe, p. 119-124, set. 2002.
- BARBOSA, K. B. F. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010.
- BEU, C.C.L.; GUEDES, N.L.K.O; DE QUADROS, Â.A.G. **Tecido conjuntivo**, 2017. Disponível em: <https://www.unioeste.br/portal/microscopio-virtual/tecido-conjuntivo/especializado/hematopoetico/leucocitos/agranulocitos/linfocitos>. Acesso em: 28 de out. 2023.
- CAVALCANTI, Camilla De Andrade Tenorio. **Radioproteção e Radiomitigação do Ginkgo Biloba em Cérebro De Ratos Expostos Aos Raios-X De 6 MeV**. 2021.
- CIRILO, Artur Nunes et al. **Radiação ionizante: Uma revisão de literatura**. Revista acadêmica Novo Milênio, v. 3, n. 4, 2021.
- DA SILVA, Camila Joyce Alves. **O papel do Biomédico na Análise Ambiental**. Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO, v. 2, n. 1, p. 11-20, 2015.
- DARDANO, A.; BALLARDIN, M.; FERDEGHINI, M.; LAZZERI, E.; 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.
- DOS SANTOS JÚNIOR, José Araújo et al. **Influence of terrestrial radionuclides on environmental gamma exposure in a uranium deposit in Paraíba, Brazil**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 141, p. 154-159, 2017.
- EISVAND, F.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. **The effects of Ginkgo biloba on metabolic syndrome: A review**. Phytotherapy Research, v. 34, n. 8, p. 1798-1811, ago. 2020.
- FANG, Jiacheng et al. **Extração, estrutura e bioatividades dos polissacarídeos do Ginkgo biloba: uma revisão**. Revista internacional de macromoléculas biológicas, v. 162, p. 1897-1905, 2020.
- FENECH, M. **Cytokinesis-block micronucleus cytome assay**, Nat. Protoc. 2, 1084-1104, 2007.
- FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique**. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 455, n.1, p. 81-95, 2000.
- FERREIRA, ICFR; ABREU, Rui M.V. (2007). **Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos**. Bioanálise. ISSN 1646-1266. IV:2. p. 32-39.
- GAJENDIRAN, N.; TANAKA, K.; KUMARAVEL, T.S.; KAMADA, N. **Neutron-Induced Adaptive Response in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay**. Journal of Radiation Ressearch, v.42, p. 91-101, 2001.
- GEORGIEVA, S.; POPOV, B.; BONEV. G. **Radioprotective effect of Haberlea rhodopensis (Friv.) leaf extract on γ -radiation-induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant levels in rabbit blood**. Indian Journal of Experimental Biology, v. 51, p. 29-36, January, 2013.

GROLLINO, M. G.; RASCHELL, G.; CORDELLI, E.; VILLANI, P.; et al. **Cytotoxicity, genotoxicity and gene expression changes elicited by exposure of human hepatic cells to Ginkgo biloba leaf extract**. Food and Chemical Toxicology, v. 109, p. 486-496, 2017.

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

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Disponível em: <https://www.ipen.br/portal_por/portal/default.php?secao_id=1>.

JAMASBI, Elaheh et al. **"The cell cycle, cancer development and therapy."** Molecular biology reports. Vol. 49,11 (2022).

LAGUNAS CRUZ, M. Del C.; VALLE MENDIOLA, A.; SOTO CRUZ, I. **Ciclo celular: Mecanismos de regulación**. Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud, [S. l.], v. 17, n. 2, 2015. Disponível em: <https://revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/51694>. Acesso em: 29 oct. 2023.

LIU, Lingmei et al. **Avanços nos constituintes químicos e análise química da folha, extrato e fitofármacos de Ginkgo biloba**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 113704, 2021.

DÍAZ, L.; DAVID, L.; et al. **"El ciclo celular."** MedUNAB (2003): 21-29.

SILVA, Eduarda Santos. **Avaliação do efeito radiomitigador in vitro do extrato de Ginkgo biloba em linfócitos humanos irradiados através do ensaio de micronúcleos**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso.

LOPES, N. B. et al. **Citotoxicidade do radiofarmacêutico iodo-131 em células humanas tumorais e não tumorais e radioproteção por sucos integrais de Vitis labrusca L**. Brazilian Journal of Biology, v. 82, p. e253206, 2022.

LUSIYANTI, Y.; ALATAS, Z.; SYAIFUDIN, M.; PURNAMI, S. **Establishment of a Dose response Curve for X ray Induced Micronuclei in Human Lymphocytes**. Genome Integrity, v. 7, p. 7, 2016.

MATOS, Ana Rita Rolo de. **Stress oxidativo e estratégias terapêuticas no contexto das doenças neurodegenerativas**. 2020. Dissertação de Mestrado.

MORENO ONOFRE, M.; ARCEO MALDONADO, C.; GUERRERO CARBAJAL, C. **Chromosomal aberration analysis using modified protocole for G2+ caffeine dicentrics**. 31 SNM Annual Congress: 30 years of nuclear power in Mexico, Mexico: Sociedad Nuclear Mexicana, 2020.

MUÑOZ ARANGO, E. T.; PEIXOTO, J. G.; DE ALMEIDA, C. E. **Uma revisão crítica dos processos de translação em radioterapia pre-clínica associada às limitações na dosimetria de irradiadores biológicos conformacionais**. Brazilian Journal of Radiation Sciences, v. 7, n. 3, 4 jul. 2019.

NAIRY, R. K.; BHAT, N. N.; SANJEEV, G.; YEROL, N. **Dose-response study using micronucleus cytome assay: a tool for biodosimetry application**. Radiation Protection Dosimetry, v. 174, n. 1, p. 79-87, 2017.

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

OKUNO, E. **Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia**. Estudos Avançados, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013.

OKUNO, E. **Radiação**. [s.l.] Oficina de Textos, 2018.

PALÁCIO, Evandro Pereira; RIBEIRO, André Araújo; GAVASSI, Bruno Moreira; STASI, Gabriel Guimarães Di; et al. **Exposure of the surgical team to ionizing radiation during orthopedic surgical procedures.** Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition), [S.L.], v. 49, n. 3, p. 227-232, maio 2014.

PARECE, Margarida Soares. **Infertilidade Masculina: Stress Oxidativo e o Uso de Antioxidantes.** 2022.

PUJOL, Mònica et al. **A new model of biodosimetry to integrate low and high doses.** PLOS One, v. 9, n. 12, p. e114137, 2014.

RAMALHO, Tomás Pedro et al. **Radioprotetores.** 2022. Tese de Doutorado.

RAMÍREZ-GARCÍA, Miguel Ángel, et al. **"Bcl-2: su papel em el ciclo celular, apoptosis y cáncer."** El Residente 9.3 (2014): 84-94.

RASTKHAH, E.; ZAKERI, F.; GHORANNEVISS, M.; et al. **The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose–response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation.** Radiat Environ Biophys, v. 55, p. 41-51, 2016.

RODRIGUES, A.S.; OLIVEIRA, N.G.; MONTEIRO Gil, O.; LÉONARD, A.; RUEFF, J. **Use of Cytogenetic Indicators in Radiobiology.** Radiation Protection Dosimetry, v. 115 (1-4), p 455-460, 2005.

SALGADO, Andréia Ruis. **Influência do azul da Prússia alemão e brasileiro no desenvolvimento in vitro de embriões murinos irradiados com cobalto 60 (Co60): uma abordagem reprodutiva e genética.** 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SALUSTIANO, G. **Avaliação do equivalente de dose ambiental em uma sala de radiologia veterinária.** Repositorio.ufu.br, 2023.

ŠAMEC, Dunja et al. Biflavonóides: **Contribuições importantes para os benefícios à saúde do Ginkgo (Ginkgo biloba L.).** Plantas, v. 11, n. 10, pág. 1381, 2022.

SOUSA, Joyce Caroline De Oliveira. **Radiobiologia: revisão conceitual e aplicações no fracionamento da terapêutica radioterápica.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 03, Ed. 11, Vol. 02, pp. 54-66. Novembro de 2018. ISSN:2448-0959.

TAUHATA, L. et al. Radioproteção e dosimetria: fundamentos. Rio de Janeiro: CBPF, 2003.

THIERENS, H.; VRAL, A. **The micronucleus assay in radiation accidents.** Ann Ist Super Sanità, v. 3, p.260-264, 2009.

WATHEN, LK; ÉDER, P; HORWITH, G; WALLACE R.L. **Using biodosimetry to enhance the public health response to a nuclear incident.** International journal of radiation biology, vol. 97, (2021).

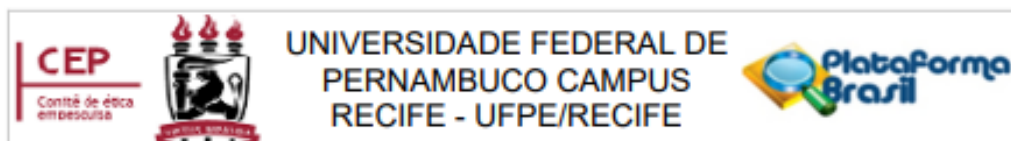
XU, P.; ZHANG, W.B.; CAI, X.H.; LU, D.D.; HE, X.Y.; QIU, P.Y.; WU, J. **Flavonoids of Rosa roxburghii Tratt Act as Radioprotectors.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 15, 2014.

ZATULOVSKIY, Evgeny et al. **"Cell growth dilutes the cell cycle inhibitor Rb to trigger cell division."** Science (New York, N.Y.) vol. 369,6502 (2020).

LU, FANGYUAN et al. **Protective Effect of Ginkgo biloba (Ginkgoaceae Family) Leaf Extracts on Female Drosophila melanogaster Suffering from Ultraviolet Irradiation through Activating the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway.** Biology Bulletin, p. 1-12, 2024.

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.

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL RADIOPROTETOR DO EXTRATO DE ESPÉCIMES MEDICINAIS POR MEIO DE ENSAIOS CITOGENÉTICOS EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Pesquisador: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 77151723.6.0000.5208

Instituição Proponente: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Patrocinador Principal: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.702.069

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa básica com fins de produção científica, que visa investigar o uso de radioprotetores em proteção radiológica diante do crescente uso das radiações ionizantes em diversos setores da sociedade, e dos riscos de acidentes nucleares e outras exposições. O projeto visa investigar radioprotetores naturais, como de espécies de *Allium cepa*, *Ginkgo biloba*, *Punica granatum* e *Schinus terebinthifolia*, na formação de danos cromossômicos induzidos pelas radiações, a exemplo dos dicêntricos e dos micronúcleos em linfócitos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar a atividade radioprotetora do extrato de *Allium cepa*, *Ginkgo biloba*, *Punica granatum* e *Schinus terebinthifolia*, em linfócitos do sangue periférico humano irradiados *in vitro* e não irradiados, e comparar as alterações citogenéticas induzidas por diferentes doses de radiação ionizantes em ambas as amostras, para avaliar se estes extratos (ou quais deles) são radioprotetores e protegem os cromossomos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco algum de exposição a agentes radioativos ou às radiações ionizantes. Os benefícios diretos são os dados, caso os voluntários assim desejem, de tomarem

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Estudo da propriedade radioprotetora *in vitro* do extrato de *Ginkgo biloba* em linfócitos humanos do sangue periférico humano irradiado através da análise citogenética que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) (Júlio César Gomes da Silva), Departamento de Biofísica e Radiobiologia (UFPE), Primeiro andar no prédio do Centro de Ciências da Saúde, Av. da Engenharia, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 52171-011, (81) 2126-8535 / (81) 98672-7569 e-mail: julioxs888@gmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Eduarda Santos Silva, e-mail: eduardas88@gmail.com e Fabiana Farias de Lima Guimarães, e-mail: flima@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 *Ginkgo biloba*, em linfócitos humanos do sangue periférico cultivados, comparando a frequência de micronúcleos e cromossomos dicêntricos após serem expostos à 2Gy de radiação gama. Tal pesquisa é necessária, pois, diariamente, sejam por motivos médicos ou ocupacionais, a população é cada vez mais exposta às radiações, sendo necessário um estudo mais aprofundado que forneça informações que possam ser correlacionadas com os possíveis danos causados aos indivíduos. Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer amostras de sangue (135 ml), por punção venosa, em tubos de vacutainers contendo EDTA, que serão obtidas parcialmente (15 ml por coleta) em nove diferentes punções venosas com intervalo mínimo de 1 semana, após assinatura deste termo. Seu material será usado exclusivamente para efeito desta pesquisa. O(a) Sr(a), também responderá um questionário para verificação do seu estado geral de saúde, apontando se nos últimos seis meses antes da coleta houve alguma exposição à radiação terapêutica ou raios X diagnóstico; aplicação de vacinas; ou consumo de drogas ilícitas. Essas informações são necessárias, pois os fatores citados podem alterar os resultados. Vale ressaltar que esse questionário será respondido de forma individual e particular para evitar qualquer tipo de constrangimento.
- **RISCOS:** Os riscos inerentes à participação podem ser: (1) o constrangimento em não saber ou não querer responder a algum item do questionário, caso a amostra seja considerada apta para pesquisa (2) durante a coleta, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, os voluntários poderão sentir uma ardência local e, eventualmente, após coleta, poderá se formar um hematoma, que desaparecerá em poucos dias. Esses riscos podem ser minimizados (1) realizando o questionário de forma individual e privada; e (2) utilizando compressa de gelo logo após a coleta. Há também a possibilidade de desistência de participação na pesquisa a qualquer momento. Ressaltamos que, em momento algum, o(a) senhor(a) será exposto(a) a quaisquer fontes radioativas.
- **BENEFÍCIOS diretos/indiretos** para os voluntários: O benefício direto ao voluntário será de fornecer a informação dos níveis de background espontâneo que o mesmo possui. Essa informação será enviada pós análise aos doadores por meio de um documento/carta padrão via correio ou e-mail. No caso dos indiretos, os laboratórios de dosimetria biológica do CRCN/NE e de Biofísica molecular do Departamento de Biofísica e Radiobiologia DBR/UFPE localizado no Estado, Com a implementação desta técnica, será possível expandir a compreensão sobre os níveis de radiosensibilidade dos indivíduos, contribuindo ainda mais para a melhoria do uso da radiação tanto para tratamento e diagnóstico quanto para o uso industrial.

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

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

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

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

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

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

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

Nome: _____	Nome: _____
Assinatura: _____	Assinatura: _____

ANEXO C – Modelo do Questionário de Seleção de Doadores

I - DADOS PESSOAIS

1.2 Nº 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 / Ginásio 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:

Quanto	Quanto	Quanto
[] automóvel	[] rádio	[] máquina de lavar roupa
[] banheiro	[] videocassete	[] empregada mensalista
[] aspirador de pó	[] geladeira	[] TV em cores

Total de Pessoas na Família: []

II - INDICADORES GERAIS DE SAÚDE

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

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

2.2 Quantos "drinques" você toma **POR SEMANA**: (um drinque = 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 antes	sofre atualmente	Desde há ANOS / MESES	Sob Tratamento SIM NÃO
--	-------	-----------------	------------------	-----------------------	------------------------

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

Nenhum

[5] Não sabe [6]

[7]Outros: _____

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

O Sr(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	