



ATUAÇÃO RADIOPROTETORA DO *Ginkgo biloba* NA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL DE RATOS WISTAR EXPOSTOS A 18 GY DE RADIAÇÃO IONIZANTE

Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti^{1*}, Jonas Sérgio de Oliveira Filho², Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes², Leandro Álvaro de Alcântara Aguiar¹, Alexandre Parisio Barbosa de Oliveira³, Romildo de Albuquerque Nogueira¹

¹Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional, UFRPE; ²Laboratório de Biofísica Celular e Molecular, UFPE; ³Instituto de Radioterapia Waldemir Miranda

*camillat.biol@gmail.com

INTRODUÇÃO

A radiação ionizante (RI) é uma modalidade de radiação que tem energia suficiente para, durante a sua interação, remover elétrons orbitais dos átomos (PINO E GIOVEDI, 2005; GARCIA, 2015). Esse processo de ionização, ao alterar os átomos, também pode alterar a estrutura das moléculas que eles constituem. Sendo a energia de ionização maior do que a energia de ligação química entre os átomos, pode ocorrer quebra das ligações químicas e consequentemente mudanças moleculares (TAUHATA *et al.*, 2003). Apesar da crescente utilização da RI pela medicina, ela pode ocasionar diversos efeitos colaterais. Esses efeitos são classificados em estocásticos e determinísticos. Os estocásticos tratam-se dos efeitos colaterais que são proporcionais a dose recebida, dessa forma, não existe um limiar de dose. Já os determinísticos são aqueles que a severidade ou gravidade do dano aumenta com a dose aplicada, nesse caso, existe um limiar de dose, onde abaixo dele os danos celulares são insuficientes para prejudicar o tecido ou órgão (TAUHATA *et al.*, 2003).

O sistema nervoso central (SNC), especificamente, é um sistema de resposta lenta a exposição à RI (SEGRETO E SEGRETO, 2000) e, apesar dos avanços da medicina e da biologia, os mecanismos celulares e moléculas que levam a lesão cerebral, induzida pela radiação ionizante, estão longe de serem compreendidos (LUMNICZKY *et al.*, 2017).

Atualmente, se acredita que as lesões são causadas por um conjunto de múltiplos processos, que acabam contribuindo para o surgimento de diversas doenças. Tais processos podem ser danos no nível vascular, que levam ao extravasamento da barreira hematocefálica, aumento do tronco neuronal, apoptose das células progenitoras e até mesmo perturbações na produção de energia devido a dano mitocondrial (LUMNICZKY *et al.*, 2017).

Um dos efeitos causado pela RI é o estresse oxidativo, como resultado de um distúrbio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos de defesa antioxidante (BALENTOVA E ADAMKOV, 2015), mantendo, dessa forma, os níveis de ROS acima de um limiar tóxico.

Apesar do encéfalo corresponder apenas cerca de 2% do peso corporal, para seu funcionamento adequado, utilizada cerca de 15% do sangue bombeado pelo coração (McCALL, 2004), 20% de todo gás oxigênio inalado e nele se encontra aproximadamente 25% de todo colesterol presente no organismo (DIETSCHY E TURLEY, 2001). Dessa forma, o encéfalo é bastante susceptível ao estresse oxidativo, principalmente devido a sua alta utilização de oxigênio (DORNAS *et al.*, 2007).

Nessa perspectiva surgem os radioprotetores, que são compostos antioxidantes que possuem a capacidade de equilibrar a

quantidade de radicais livres oriundos do efeito das radiações ionizantes (ARUOMA, 1996). Dessa forma, o *Ginkgo biloba* (Gb) surge como uma possibilidade no cenário da radioproteção em decorrência da sua capacidade antioxidante (BANOV *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2008).

O Gb trata-se uma árvore primitiva, sendo considerada um “fóssil vivo”, que já vem sendo utilizada pela medicina tradicional na China há séculos (SINGH *et al.*, 2008). Desde o desenvolvimento do seu extrato em 1990, o Gb tornou-se um dos fitoterápicos mais utilizados, no mundo todo, no tratamento contra demências (YUAN *et al.*, 2017).

Quimicamente contém um grande número de compostos ativos, incluindo flavonoides e terpenos (SINGH *et al.*, 2008). O seu extrato é considerado uma substância antioxidante devido a atuação dos flavonoides, que possuem a capacidade de inibir a formação de radicais livres e também a atividade da xantina oxidase (BANOV *et al.*, 2006).

Com base no que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a ação radioprotetora do extrato de *Ginkgo biloba* no cérebro de ratos Wistar expostos à RI. Foram utilizados métodos de dinâmica linear e não linear na análise dos registros da atividade elétrica cerebral.

MATERIAIS E MÉTODOS

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados trinta e cinco (35) animais machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), com 60 dias de idade obtidos do biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, e posteriormente, mantidos no Laboratório de Biofísica Celular e Molecular (LBCM) do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob autorização da Comissão de Ética para Uso de Animais (Nº 23076.014367/2017-89). Os animais foram alojados em gaiolas, mantidos em ambiente adequado com temperatura (23±2°C) e umidade controlada, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com acesso a água e a dieta específica. Os trinta e cinco animais foram agrupados em cinco grupos (n = 7): controle, irradiado, tratado apenas com o Gb, tratado com o Gb antes da exposição a RI (GBRI) e tratado com o Gb depois da exposição a RI (RIGB).

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para o procedimento cirúrgico de implantação dos eletrodos os animais foram anestesiados pela associação de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg) por via intraperitoneal (IP). Inicialmente foi realizada uma tricotomia e assepsia do campo cirúrgico, e posteriormente os animais tiveram suas cabeças fixadas em um

estereotáxico onde uma incisão longitudinal foi realizada, expondo o crânio do animal.

Em seguida, um orifício circular de cerca de 3 ou 4 mm de diâmetro foi trepanado no hemisfério esquerdo na região parietal e o outro na região occipital com o auxílio de um micromotor. Nesse orifício, foi inserido um eletrodo do tipo Ag-AgCl (prata cloretada) sobre o córtex, sendo utilizado uma resina acrílica para melhor fixação dos mesmos.

Após a cirurgia os animais passaram por um pós-cirúrgico com duração de cinco dias, sendo ministrado neoflox e ricofina. Só após esse procedimento é que os animais foram submetidos as demais etapas experimentais.

REGISTRO DO ELETROCORTICOGRAMA

O eletrocorticograma (ECoG) é uma técnica de registro da atividade elétrica cerebral, obtida com os eletrodos fixados diretamente no córtex cerebral.

Esses registros foram obtidos durante 20 minutos com um aparelho EMG 410C (ENG System, Brasil), utilizando uma taxa de amostragem de 750 Hz, após quarenta e oito (48) horas do procedimento experimental de cada grupo.

Os registros do ECoG foram segmentados em janelas de dois minutos, totalizando cinco segmentos por animal, utilizando o WinDaqWaveform Browser. Posteriormente, os segmentos são importados para o programa MATLAB 7.8 (2009) e calculados a Transformada de Fourier (TF), Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e Entropia aproximada (ApEn) desses sinais.

EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE

A irradiação foi realizada nos animais anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (75 mg/kg) aplicadas por via IP. Os animais anestesiados foram expostos a radiação usando-se de um Acelerador Linear do Instituto de Radioterapia Waldemir Miranda (IRWAN) de acordo com o grupo experimental. Foram aplicados 9 Gy de radiação gama na parte superior da cabeça e em seguida mais 9 Gy na parte inferior da cabeça, totalizando 18 Gy, cujo tempo de exposição total foi de 5 min.

TRATAMENTO COM O *Ginkgo biloba*

O tratamento com o *Ginkgo biloba* teve duração de 14 dias, antes ou depois da exposição à RI, de acordo com o grupo experimental. Foi utilizado um extrato seco de origem comercial com uma concentração de 120 mg, sendo administrado oralmente, utilizando uma agulha de gavagem em aço inoxidável com ponta arredondada, que foi introduzida na cavidade oral do animal e conduzida até o esôfago.

A TRANSFORMADA DE FOURIER E O ESPECTRO DE POTÊNCIA

Para calcular o Espectro de Potência das ondas cerebrais do ECoG foi implementado o algoritmo da Transformada de Fourier. Esse método matemático avalia a participação de cada um dos componentes presentes na série-temporal. Portanto, ao aplicar a TF em uma série-temporal se obtém o espectro de potência. A potência média de cada ritmo cerebral permite estimar o valor da contribuição de cada um desses ritmos no sinal ECoG.

COMPLEXIDADE DE LEMPEL-ZIV (CLZ)

A CLZ é uma metodologia utilizada para analisar dados através da compressão da sua sequência via recorrência de padrões, tornando possível a quantificação dos padrões distintos presentes em uma determinada série. Antes de calcular a CLZ de um sinal biológico é necessário converter a série temporal em um sequência binária.

A CLZ é calculada com base nesta sequência binária, onde valores próximos de 1 indicam maior complexidade e o comportamento do

sinal é mais aleatório e aqueles valores próximos de 0 indicam uma menor complexidade, indicando uma maior auto similaridade.

ENTROPIA APROXIMADA (APEN)

A ApEn, é uma ferramenta usada para quantificar a regularidade de um sinal, que varia entre 0 e 2, onde os números mais próximos a 0 representam um sinal determinístico, enquanto que números mais próximos a 2, indicam um sinal aleatório. Ou seja, quanto mais próximo de zero mais organizado é o sinal, e quanto mais próximo de 2 indica maior entropia e aleatoriedade.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada empregando o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as populações através do GraphPad Prism 7. E quando necessário foi utilizado post-hoc de Dunn. Foi considerado um valor de p menor que 0,05 para indicar significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ondas cerebrais representam o resultado de vários tipos de fenômenos eletrofisiológicos que, por sua vez, refletem numerosos processos neurais (TIMO-IARIA E PEREIRA, 1971), estando envolvidas com os estados de humor, as emoções e o nível de tensão muscular (PERNAMBUCO *et al.*, 2003).

Quando o cérebro foi exposto a RI, obteve-se um ritmo distinto do padrão normal (Figura 1), o que pode estar correlacionado aos danos cognitivos observados após as radioterapias, justamente pela atuação fisiológica dessas ondas cerebrais (WONG E KOGEL, 2004; BALETOVA E ADAMKOV, 2015).

Na Figura 1 podem-se observar os valores médios do espectro de potência dos diferentes ritmos cerebrais dos grupos experimentais. Na onda Delta, foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos controle, Gb, RIGB e GBRI, apenas ocorrendo uma diferença significativa desses grupos em relação ao irradiado ($p < 0,05$), observando um aumento da onda delta em relação ao grupo controle.

Na onda Teta, houve uma diferença significativa entre o grupo controle e irradiado ($p < 0,05$). Para os grupos tratados com Gb, tanto o RIGB quanto o GBRI, apresentaram uma diferença significativa daquele irradiado, porém nenhuma diferença foi observada em relação ao grupo controle.

Para a onda Alfa, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo irradiado em relação ao grupo controle. Os grupos RIGB e GBRI foram também estatisticamente diferentes daquele somente irradiado, porém não apresentaram diferenças significativas do controle, o que pode caracterizar uma ação radioprotetora.

Na onda Beta, os grupos RIGB e GBRI não apresentaram uma diferença significativa do grupo controle, mas sim, do grupo irradiado ($p < 0,05$).

O aumento da frequência da onda beta no grupo irradiado em comparação com o grupo controle, também foi observado em outras pesquisas (LOGANOVSKY E YUTYEV, 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2017), sendo considerado, por alguns autores, um marcador da exposição a RI (LOGANOVSKY E YUTYEV, 2001).

Em relação as outras ondas cerebrais, Loganovsky e Yutyev (2001) encontraram um aumento da onda delta junto com redução da atividade das ondas alfa e teta, colaborando com os dados encontrados por essa pesquisa (Figura 1). Sendo esse mesmo padrão obtido por Cavalcanti e colaboradores (2017), concordando também com os dados obtidos.

Em relação as modalidades de tratamento, ou seja, a administração do Gb antes (GBRI) ou depois (RIGB) da exposição a RI, não foi identificada diferença significativa entre elas em nenhuma das ondas cerebrais.

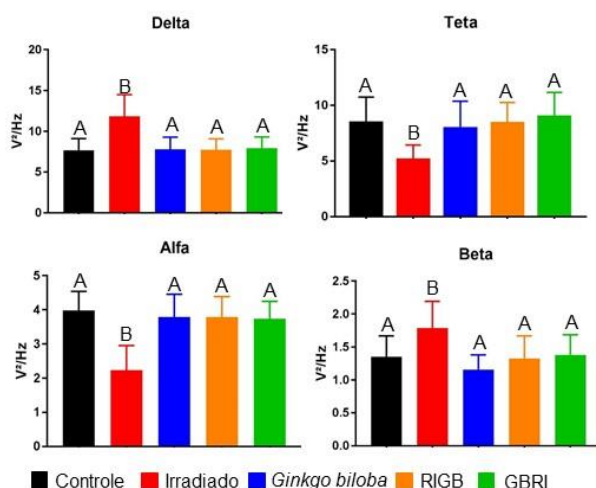


Figura 1. Valores médios do espectro de potência das ondas cerebrais dos grupos controle (preto), irradiado (vermelho), tratado apenas com o *Ginkgo biloba* (azul), RIGB tratado com o *Ginkgo biloba* após a irradiação (laranja) e GBRI tratado com o *Ginkgo biloba* antes da irradiação (verde). Sendo os grupos sem diferença significativa indicados pela letra A e os distintos pela letra B. Fonte: arquivo pessoal.

Outra forma de avaliar a ação do *G. biloba* frente a radiação ionizante no SNC é através da Complexidade de Lempel-Ziv (Figura 2), onde foi observado que o grupo irradiado teve uma diminuição da CLZ, sendo estatisticamente distinto dos demais grupos ($p < 0,05$). No grupo controle o valor médio da CLZ foi de 0,4626 ($\pm 0,08$), enquanto que no irradiado a CLZ = 0,3881 ($\pm 0,09$), obtendo uma diferença significativa, enquanto que os grupos Gb, RIGB e GBRI tiveram os valores da CLZ, respectivamente, 0,4548 ($\pm 0,08$), 0,4437 ($\pm 0,09$) e 0,4529 ($\pm 0,09$).

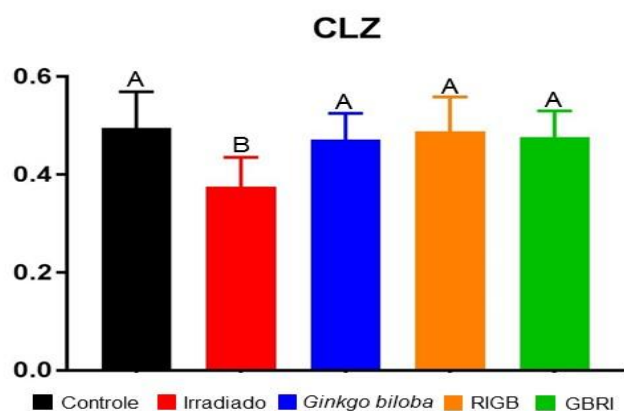


Figura 6. Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) dos grupos controle (preto), irradiado (vermelho), tratado só com *Ginkgo biloba* (azul), tratado com o Gb depois da irradiação (laranja) e tratado com o Gb antes da irradiação (verde). Sendo os grupos sem diferença significativa indicados pela letra A e os distintos pela letra B. Fonte: arquivo pessoal.

Portanto, as análises matemáticas realizadas indicam que o extrato do Gb demonstrou ser capaz de minimizar os danos causados pela exposição a RI, isso pode estar associado a sua capacidade de destruir várias espécies de radicais livres, sendo os seus compostos flavonoides, responsáveis por proteger os sistemas fisiológicos das espécies reativas de oxigênio (DIAMOND *et al.*, 2000).

Além disso, os bilobalídeos, presentes no Gb, também podem proteger os neurônios contra o estresse oxidativo e bloqueiam os mecanismos de apoptose em seus estágios iniciais (FORLENZA, 2003), o que pode justificar sua atuação protetora.

O resultado da Entropia Aproximada colabora com o da CLZ, visto que, o grupo irradiado também apresenta uma diminuição da Entropia em relação ao grupo controle (Figura 3). No grupo

controle o valor médio da ApEn foi de 1,670 ($\pm 0,13$), enquanto que no irradiado a ApEn = 1,1201 ($\pm 0,13$), obtendo uma diferença significativa, enquanto que os grupos Gb, RIGB e GBRI tiveram os valores da ApEn, respectivamente, 1,6032 ($\pm 0,14$), 1,6065 ($\pm 0,15$) e 1,6630 ($\pm 0,14$).

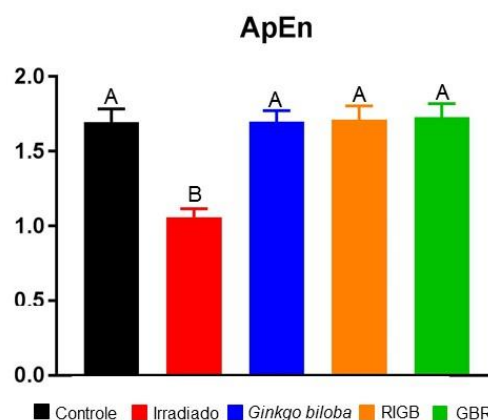


Figura 3. Entropia Aproximada dos grupos controle (preto), irradiado (vermelho), tratado só com *Ginkgo biloba* (azul), tratado com o Gb depois da irradiação (laranja) e tratado com o Gb antes da irradiação (verde). Sendo os grupos sem diferença significativa indicados pela letra A e os distintos pela letra B. Fonte: arquivo pessoal.

Apesar da falta de compreensão dos mecanismos que causam as lesões nos tecidos induzidas pela exposição a RI, acredita-se que seja consequência de uma cascata de reações, cuja formação final são as ROS (SENER *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010), cujo cérebro é bastante susceptível a esse tipo de dano, principalmente devido a sua alta utilização de oxigênio (DORNAS *et al.*, 2007).

Nesse sentido, pesquisas apontam que o extrato do *G. biloba* é um potente eliminador de radicais livres, ou seja, um composto antioxidante (SENER *et al.*, 2006), o que poderia justificar a sua atuação nos grupos RIGB e GBRI, visto que não houve uma diferença significativa desses grupos em relação ao controle (Figuras 1, 2 e 3).

CONCLUSÕES

Através das análises matemáticas dos registros eletrofisiológicos (ECoG) foi identificado que o extrato do *Ginkgo biloba* possui um efeito radioprotetor. Em relação as modalidades de tratamentos, isto é, a administração do Gb antes (GBRI) ou depois (RIGB) a exposição a RI, não mostrou diferença significativa entre elas. Portanto, novos estudos são necessários para elucidar a ação radioprotetor do *Ginkgo biloba*.

O *Ginkgo biloba* isoladamente não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo controle, o que indica a baixa ou ausência de toxicidade, contudo, também se faz importante aprofundar os estudos referentes a esse aspecto do extrato.

Em resumo, a radiação ionizante é conhecida por induzir várias alterações fisiológicas e bioquímicas que limitam a eficácia da radioterapia, nesse sentido, o efeito protetor do extrato do *Ginkgo biloba* pode ser uma escolha de terapia adjunta na redução da toxicidade induzida pela irradiação.

REFERÊNCIAS

- ARUOMA, O.I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med*, v. 20, p. 675 - 705, 1996.
- BALENTOVA, S.; ADAMKOV, M. Molecular, Celular and Functional Effects of Radiation-Induced Brain Injury: A Review. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 27796 - 27815, 2015.
- BANOV, D.; BABY, A. R.; BOSCO, L. M.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Caracterização do extrato seco do *Ginkgo biloba* L. em

formulações de uso tópico. **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219 - 224, 2006.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutri**, v. 23, n. 4, 2010.

CAVALCANTI, C. A. T.; LOPES, I. S. S.; AGUIAR, L. Á. A.; CATANHO, M. T. J. A.; OLIVEIRA, A. P. B.; NOGUEIRA, R. A. Análises Matemáticas da Atividade Elétrica Cerebral de Ratos Expostos a Radiação Ionizante. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 4 - 7, 2017.

DIAMOND, B. J.; SHIFLETT, S.C.; FEIWEL, N.; MATHEIS, R. J.; NOSKIN, O.; RICHARDS, J. A.; SCHOENBERGER, N. E. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 81, p. 668 - 678, 2000.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutica no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 241 - 249, 2007.

FORLENZA, O. V. Ginkgo biloba e memória: mito ou realidade? **Rev. Psiq. Clin.**, v. 30, n. 6, p. 218 - 220, 2003.

GARCIA, E. A. C. **Biofísica**. São Paulo: 2 ed. Editora Sarvier, 2015.

LOGANOVSKY, K. N.; YURIEV, K. L. EEG patterns in persons exposed to ionizing radiation as a result of the Chernobyl accident: part 1: conventional EEG analysis. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 13, n. 4, p. 441 - 458; 2001.

LUMNICZKY, K.; SZATMÁRI, T.; SÁFRÁNY, T. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 517, p. 1 - 13, 2017.

McCALL, A. L. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, p. 147 - 158, 2004.

PERNAMBUCO, C.S.; PIRES, V.N.L.; MAULAZ, M.B.; MESQUITA, M.G.; CAETANO, L.F.; NOVAES, J.S.; DANTAS, E.H.M. A inferência do shiatsu na distribuição de potência das ondas alfas no córtex cerebral em mulheres adultas. **Fitness & Performance Journal**, v.2, n.3, p. 178-182, 2003.

PINO, E. S. GIOVEDI, C. Radiação Ionizante e suas aplicações na indústria. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, n. 2, v. 2, p. 47 - 52, 2005.

SEGRETO, H. R. C.; SEGRETO, R. A. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. **A folha Médica**, v. 119, n. 4, p. 9 - 27; 2000.

SENER, G.; KABASAKAL, L.; ATASOY, B. M.; ERZIK, C.; VELIOGLU-OGUNÇ, A.; CETINEL, S.; GEDIK, N.; YEGEN, B. Ç. Ginkgo biloba extract protects against ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats, **Pharmacological Research**, v. 53, p. 241 - 252, 2006.

SINGH, B.; KAUR, P.; GOPICHAND, R. D.; SINGH, P. S. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. **Fitoterapia**, v. 79, p. 401 - 418; 2008.

TAUHATA, L.; SALATI, I.; PRINZIO, R.; PRINZIO, A. R. **Radioproteção e dosimetria**. Editora: CEP, 2003.

TIMO-IARIA, C.; PEREIRA, W. C. Mecanismos das ondas elétricas cerebrais, **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v. 29, n. 2, 1971.

YUAN, Q.; WANG, C. W.; SHI, J.; LIN, Z. X. Effects of Ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews. **Journal of ethnopharmacology**, v. 195, p. 1-9, 2017.

WONG, C. S.; KOGEL, V. D. Mechanisms of Radiation Injury to the Central Nervous System: Implications for Neuroprotection. **Molecular Interventions**, v. 4, n. 5, p. 273 - 284, 2004.