



A APLICAÇÃO DE MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA ANALISAR A AÇÃO RADIOPROTETORA DO *Ginkgo biloba* A NÍVEL CEREBRAL

Application of mathematical methods to analyze the radioprotective action of *ginkgo biloba* at the brain level

Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti¹; Leandro Álvaro de Alcântara Aguiar²; Alexandre Parisio Barbosa de Oliveira³; Jonas Sérgio de Oliveira Filho⁴; Beatriz Cardoso Campos de Assunção⁵; Yasmin Marques dos Santos⁵; Vanessa Ribeiro Leite Celestino⁶; Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes⁷; Romildo de Albuquerque Nogueira⁸.

RESUMO: Introdução: O efeito protetivo do *Ginkgo biloba* (Gb), um antioxidante natural, contra a toxicidade induzida por agentes químicos e físicos tem sido alvo de estudos.

Objetivo: Propor métodos quantitativos associados a técnicas histológicas para analisar a eficácia do Gb como radioprotetor cerebral. **Método:** Utilizaram-se 35 ratos, agrupados em: grupo 1: controle; grupo 2: exposto a radiação ionizante (RI); grupo 3: tratado com o Gb; grupo 4: exposto a RI e posteriormente tratado com o Gb; grupo 5: tratado com o Gb e posteriormente exposto a RI. Os registros obtidos pelo eletrocorticograma, foram avaliados através da Transformada de Fourier, Entropia Aproximada e Complexidade de Lempel-Ziv. Por fim, foi realizado a coleta e análise do hipocampo por meio de técnicas histológicas. **Resultados:** A análise dos experimentos mostra que a RI interfere na atividade elétrica cortical, aumentando a frequência das ondas delta e beta e diminuindo teta e alfa. Já os grupos 4 e 5 se assemelharam ao

Abstract

Introduction: The protective effect of *Ginkgo biloba* (Gb), a natural antioxidant, against toxicity induced by chemical and physical agents has been the subject of studies. **Objective:** To propose quantitative methods associated with histological techniques to analyze the effectiveness of Gb as a cerebral radioprotector. **Method:** 35 rats were used, grouped into: group 1: control; group 2: exposed to ionizing radiation (IR); group 3: treated with Gb; group 4: exposed to IR and subsequently treated with Gb; group 5: treated with Gb and subsequently exposed to IR. The recordings obtained by the electrocorticogram were evaluated using the Fourier Transform, Approximate Entropy and Lempel-Ziv Complexity. Finally, the hippocampus was collected and analyzed using histological techniques. **Results:** The analysis of the experiments shows that IR interferes with cortical electrical activity, increasing the frequency of delta and beta waves and decreasing theta and alpha. While groups 4 and 5 were similar to 1, demonstrating a radioprotective capacity. Regarding histology, apoptosis was identified in group 2 in the CA1 and Dentate Gyrus region of the hippocampus. **Conclusion:** Based on these data, it is concluded that the protective effect of Gb extract can act as an adjunct therapy to reduce IR-induced toxicity.

KEYWORDS: ionizing radiation; neuroprotection; electrophysiology; nervous tissue; mathematical methods

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco¹.

Universidade do Minho, Universidade do Minho².

Instituto de Radioterapia Waldermir Miranda, Pernambuco – Brasil³.


Biomédico pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil⁴.

Discentes de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil⁵.

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Bioquímica de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco⁶.

Docente do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil⁷.

Docente do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco⁸.



1, demonstrando uma capacidade radioprotetora. Em relação a histologia, foi identificada apoptose no grupo 2 na região CA1 e Giro Denteado do hipocampo. **Conclusão:** Com base nesses dados, conclui-se que o efeito protetor do extrato do Gb pode atuar como uma terapia adjunta para redução da toxicidade induzida pela RI.

PALAVRAS-CHAVE: radiação ionizante; neuroproteção; eletrofisiologia; tecido nervoso; métodos matemáticos.

INTRODUÇÃO


A radiação ionizante (RI) é aquela que possui energia suficiente para, durante a sua interação com os átomos, remover elétrons dos seus orbitais^{1,2}. No âmbito médico, é utilizada como uma fonte de terapia para o tratamento de uma diversidade de doenças neoplásicas, especialmente os tumores cerebrais³.

Por causa do avanço das pesquisas científicas, das técnicas de diagnósticos e dos tratamentos estarem cada vez mais eficaz, houve um aumento nas taxas de sobrevivência e de sobrevida dos pacientes^{3,4}. Entretanto, também é observado um aumento nos efeitos adversos tardios da irradiação na região da cabeça³.

Uma das vias associadas as lesões cerebrais após radioterapia são alterações no microambiente cerebral devido a hipóxia, estresse oxidativo, isquemia e processos inflamatórios⁵. Sendo esse estresse oxidativo caracterizado pelo distúrbio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mecanismos de defesa antioxidante⁶, sendo o sistema nervoso bastante suscetível a esse distúrbio por causa da sua alta utilização de oxigênio⁷.

Nessa perspectiva, nos últimos 60 anos, os cientistas estão cada vez mais envolvidos na busca por radioprotetores, isto é, substâncias naturais ou sintéticas capazes de minimizar ou neutralizar os efeitos causados pela irradiação, cuja principal via metabólica de atuação é o estresse oxidativo⁸. Dessa forma, o *Ginkgo biloba* (Gb) surge como uma possibilidade no contexto da radioproteção em decorrência da sua capacidade antioxidante^{9,10}.

Quimicamente, o Gb, contém um grande número de compostos ativos, incluindo flavonoides e terpenos¹⁰, sendo considerado um antioxidante devido a atuação dos flavonoides,



que possuem a capacidade de inibir a formação de radicais livres⁹. E desde o desenvolvimento do extrato, tornou-se um dos fitoterápicos mais utilizados no tratamento contra demências¹¹.

Com base na literatura, a pesquisa atual propõe que o Gb possui ação radioprotetora; portanto, o presente estudo foi conduzido para identificar a atuação no Gb em resposta a exposição à RI, buscando contribuir na identificação de novos radioprotetores, onde se observa uma crescente utilização de fitoterápicos.

METODOLOGIA

Delineamento Experimental


Para execução das etapas experimentais foram utilizados trinta e cinco (35) ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), todos machos com 60 dias de idade. Esses animais foram agrupados em cinco grupos (n = 7): grupo 1: controle; grupo 2: apenas exposto a radiação ionizante; grupo 3: apenas tratado com o *Ginkgo biloba*; grupo 4: exposto a RI e posteriormente tratado com o *g. biloba*; grupo 5: tratado com o *g. biloba* e posteriormente exposto a RI.

Exposição à Radiação Gama

Para realizar a exposição à radiação ionizante, utilizou-se de um Acelerador Linear do Instituto de Radioterapia Waldemir Miranda (IRWAN). 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 de forma uniforme por todo o órgão, cujo tempo de exposição total foi de 10 minutos.

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, através de gavagem.

Registro do eletrocorticograma

A aquisição da atividade elétrica cortical foi feita através de dois eletrodos posicionados sob a superfície do córtex cerebral por meio de um procedimento cirúrgico; caracterizando dessa forma um eletrocorticograma (ECoG). Ambos os eletrodos são dispostos no hemisfério esquerdo, especificamente um na região frontal e o outro na região parietal.


Os registros do ECoG foram obtidos através do aparelho EMG 410C (ENG System, Brasil), utilizando uma taxa de amostragem de 750 Hz após quarenta e oito (48) horas do término de cada etapa dos grupos. Por meio do WinDaqWavefrom Browser, esses registros são segmentados em janelas de dois minutos, totalizando cinco segmentos por animal. Posteriormente são importados para o programa MATLAB 7.8 (2009) onde os métodos matemáticos são calculados.

Métodos matemáticos

A Transformada de Fourier (TF) é um método que permite transformar um sinal no domínio do tempo para o da frequência, isto é, torna possível descrever a contribuição da frequência de cada onda cerebral presente no sinal. A Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e a Entropia Aproximada (EnAp) são métodos matemáticos que permitem quantificar a regularidade do sinal, indicando o seu grau de complexidade ou repetitividade.

Histotécnica

A coleta do encéfalo foi realizada trinta dias após a obtenção do registro do ECoG, para isso, os animais foram perfundidos, e em seguida, os encéfalos dos animais foram coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído 10%; sendo os órgãos pesados no ato da coleta. As secções do cérebro foram obtidas utilizando um micrótomo rotativo Leica®, com cortes de



4 micrômetros e após esse procedimento, as peças foram coradas utilizando a técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E.). Após a obtenção das lâminas, elas foram analisadas através de uma ferramenta computacional, o GPIM.

Análise estatística

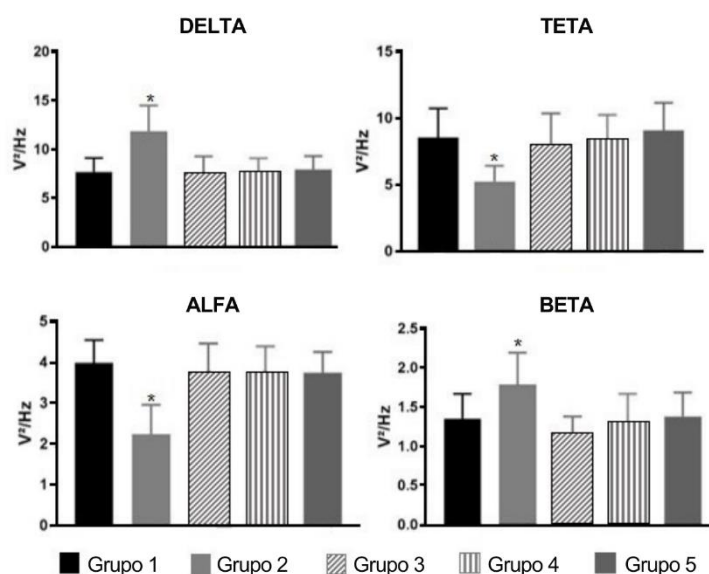
A análise estatística foi realizada empregando o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as populações através do GraphPad Prism 7. E quando necessário foi utilizado post-hoc de Dunn. Foi considerado um valor de p menor que 0.05 para indicar significância.

RESULTADOS

Eletrocorticograma

Em relação a frequência das ondas cerebrais, pode ser observado na Figura 1 que para os animais irradiados (Grupo 2) houve um aumento nas ondas delta e beta e uma diminuição das ondas alfa e teta em relação ao controle (Grupo 1). Em relação aos grupos tratados com *Ginkgo biloba*, tanto antes como após a exposição à radiação ionizante, não alterou o padrão das ondas cerebrais (Figura 1).

Figura 1. Componentes da atividade elétrica cerebral dos grupos experimentais.




Legenda: Grupo 1: controle; grupo 2: exposto a radiação ionizante ; grupo 3: tratado com o Gb; grupo 4: exposto a RI e posteriormente tratado com o Gb; grupo 5: tratado com o Gb e posteriormente exposto a RI. (Fonte: Dados da Pesquisa).

Métodos matemáticos não lineares, tais como CLZ e a EnAp, foram também usados para se avaliar a ação do *G. biloba* frente a radiação ionizante na atividade elétrica cerebral. Sendo identificado uma diminuição da complexidade do sinal cerebral no grupo irradiado (Grupo 2).

Especificamente, o Grupo 1 teve uma CLZ = 0.4626 (\pm 0.08) e a EnAp = 1.6700 (\pm 0.13), enquanto que o Grupo 2 a CLZ = 0.3881 (\pm 0.08) e EnAp 0.8594 (\pm 0.11). Os grupos 3, 4 e 5 tiveram uma CLZ de, respectivamente, 0.4548 (\pm 0.08), 0.4437 (\pm 0.09) e 0.4529 (\pm 0.09); e a EnAp foi de 1.6085 (\pm 0.14), 1.6032 (\pm 0.15) e 1.6065 (\pm 0.14). Portanto, não diferiram estaticamente do Grupo 1, mas apenas do Grupo 2 ($p < 0.05$)

O *Ginkgo biloba* isoladamente não demonstrou alterações a nível da atividade elétrica cerebral, tanto no âmbito da complexidade quanto nas ondas cerebrais (Figura 1). Além disso, não houve diferença significativa entre o grupo 4 e 5, indicando uma necessidade de realizar estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de ação do Gb como um radioprotetor.

Morfologia



Do ponto de vista macroscópico, através da medida do peso cerebral, foi possível identificar a diferença entre os grupos experimentais. O grupo 1 obteve um peso cerebral de 2.0491 gramas (± 0.067), enquanto que o grupo 3, 4 e 5, o peso foi de, respectivamente, 2.0245 (± 0.094), 1.7938 (± 0.119) e 1.9309 (± 0.212). Portanto, não houve uma diferença significativa entre esses grupos, em contrapartida, houve uma diferença significativa entre o grupo 1 e o grupo 2 ($p < 0.05$), visto que a média do peso cerebral do grupo 2 foi de 1,3461 (± 0.337). Em relação a análise microscópica do hipocampo, foi identificado apoptose apenas no grupo 2 em duas regiões: CA1 e no Giro Denteado. Enquanto que no grupo 4 e 5 não houve a ocorrência de apoptose, assim como também não foi identificado apoptose no grupo 3.

DISCUSSÃO


As alterações no padrão da atividade elétrica cerebral, após a exposição a RI, já foram descritas por outros autores^{12,13}. Entretanto, destaca-se que a onda beta vem sendo apontada como um indicador de exposição à radiação ionizante, enquanto a onda delta como um possível marcador para avaliar a dose recebida¹².

O aumento da frequência de delta, especificamente, ocasiona a desinibição dos neurônios nas camadas corticais profundas e no tálamo¹², sendo essas alterações morfofisiológicas as possíveis causas do comprometimento cognitivo identificado em paciências que foram expostos a RI³.

Nessa perspectiva, pesquisas realizadas nos últimos anos identificaram que o Gb tem demonstrado um efeito positivo no desempenho cognitivo em pessoas com demência¹¹. E na pesquisa atual, em relação a sua atuação radioprotetora, identificou-se que o *Ginkgo biloba*, manteve as ondas cerebrais semelhante ao padrão identificado no grupo 1, isto é, não ocorreu um aumento da frequência das ondas delta e beta e uma diminuição das ondas alfa e teta.

Essa condição pode estar associada a capacidade de eliminação de radicais livres do extrato do *Ginkgo biloba*, que já foi comprovado por outras pesquisas¹⁴. Visto que, a exposição a RI ocasiona o estresse oxidativo, cujas estruturas cerebrais são mais propensas aos efeitos colaterais¹⁵.

Essa vulnerabilidade se dá devido as membranas celulares cerebrais serem ricas em ácido graxo poli-insaturados, que são mais suscetíveis ao estresse oxidativo, e ainda utilizam



um alto grau de oxigênio e contém quantidades elevadas de ferro e ascorbato, que se tratam de ingredientes-chave na peroxidação lipídica¹⁵.

Outra pesquisa também identificou a atuação do Gb como um radioprotetor, contudo, as análises foram feitas no pulmão, fígado, rim e íleo de ratos. Durante essa pesquisa, foi observado que o tratamento com o extrato de *G. biloba* deprime a peroxidação lipídica, a infiltração neutrofílica e reabastece o conteúdo de níveis de glutatona nesses tecidos, justificando o efeito protetor do Gb contra a lesão oxidativa¹⁶.

Diversas pesquisas já descreveram os danos na região do hipocampo após a exposição à radiação ionizante, onde destaca-se a diminuição de em média 79% da área do Giro Denteado¹⁷, sendo esse achado é semelhante ao obtido através da pesquisa atual. Sabe-se que essa maior radiosensibilidade do hipocampo ocorre devido a capacidade de neurogênese, que é mantida em indivíduos adultos¹⁸.


Uma outra pesquisa identificou que o Gb tem a capacidade de inibir a cascata de reações do estresse oxidativo que levaram à morte celular programada em neurônios do cerebelo em ratos, isto é, exerceu um efeito protetor¹⁹. Dessa forma, essa inibição pode ser o mecanismo pelo qual o extrato do Gb se mostrou eficaz na radioproteção cerebral.


CONSIDERAÇÕES FINAIS


Já é descrito na literatura científica os diversos efeitos colaterais da exposição cerebral a radiação ionizante, destacando-se os dados cognitivos e morfológicos. Entretanto, ainda é incipiente as pesquisas no âmbito da radioproteção cerebral, dessa forma, a pesquisa atual norteia a aplicabilidade do extrato do *Ginkgo biloba* nesse segmento. Visto que, o Gb se mostrou eficaz na manutenção do padrão das ondas cerebrais mesmo após a irradiação e ainda minimizou a ocorrência de apoptose nas regiões do hipocampo.

REFERÊNCIAS

1. Segreto, H.; Segreto, R. Revisão e atualização em radiobiologia. A Folha Médica, Vol. 119, 2000.

- 
2. Okuno, E. Efeitos biológicos das Das Radiações Ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. *Estudos Avançados*, 27(77), 185–200, 2013
 3. Hladik, D.; Tapio, S. Effects of ionizing radiation on the mammalian brain. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 770, 219–230, 2016.
 4. Lumniczky, K., Szatmári, T., & Sáfrány, G. (2017). Ionizing radiation-induced immune and inflammatory reactions in the brain. *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, pp. 1–13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00517>
 5. Wong, C. S. MECHANISMS OF RADIATION INJURY TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: IMPLICATIONS FOR NEUROPROTECTION. *Molecular Interventions*, 4(5), 273–284, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1124/mi.4.5.7>
 6. Balentova, S., & Adamkov, M. (2015). Molecular, cellular and functional effects of radiation-induced brain injury: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27796–27815, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161126068>
 7. Dornas, W. C., Oliveira, T. T., Rodrigues-das-Dores, R. G., Santos, A. F., & Nagem, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. 28(1808–4532), 241–249, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0837>
 8. Hosseinimehr, S. J. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discovery Today*, 12(19–20), 794–805, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.017>
 9. Banov, D., Baby, A. R., Del Bosco, L. M., Kaneko, T. M., & Velasco, M. V. R. Caracterização do extrato seco de Ginkgo biloba L. em formulações de uso tópico. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(2), 219–224, 2006.

- 
10. Singh, B., Kaur, P., Gopichand, Singh, R. D., & Ahuja, P. S. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia*, 79(6), 401–418, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.05.007>
11. Yuan, Q., Wang, C., Shi, J., & Lin, Z. Effects of Ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews. 195(December 2016), 1–9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.005>
12. Loganovsky, K. N., & Yuryev, K. L. EEG Patterns in Persons Exposed to Ionizing Radiation as a Result of the Chernobyl Accident. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 13(4), 441–458, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1176/jnp.13.4.441>
13. Cavalcanti, C. de A. T., Lopes, I. S. da S., Aguiar, L. Á. de A., Catanho, M. T. J. de A., Oliveira, A. P. B. de, & Nogueira, R. A. Análises Matemáticas Da Atividade Eletrica Cerebral De Ratos Expostos a Radiação Ionizante. (2526--607-1), 4–7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5151/biofisica2017-002>
14. Ren, Q., Chen, J., Ding, Y., Cheng, J., Yang, S., Ding, Z., ... Ding, Z. In vitro antioxidant and immunostimulating activities of polysaccharides from Ginkgo biloba leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 972–980, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.276>
15. Demir, P., Akkas, S. B., Severcan, M., Zorlu, F., & Severcan, F. Ionizing radiation induces structural and functional damage on the molecules of rat brain homogenate membranes: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Applied Spectroscopy*, 69(1), 154–164, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1366/13-07154>
16. Şener, G., Kabasakal, L., Atasoy, B. M., Erzik, C., Velioglu-Öğünç, A., Çetinel, Ş., ... Yeğen, B. Ç. Ginkgo biloba extract protects against ionizing radiation-induced oxidative organ



damage in rats. *Pharmacological Research*, 53(3), 241–252, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.11.006>

17. Costa, V. C. I., Moreira, R. de C. M., Bueno, J. L. O., Xavier, G. F., Ramos, B. Aquisição de uma tarefa espacial por ratos submetidos a lesão hipocampal neonatal induzida por radiação ionizante. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 20(1), 96–103, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-79722007000100013>

18. Khoshbin-khoshnazar, A. R., Jahanshahi, M., & Azami, N. S. Gamma Radiation-induced Impairment of Hippocampal Neurogenesis, Comparison of Single and Fractionated Dose Regimens. *International Journal of Morphology*, 30(1), 145–149, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-95022012000100026>

19. Diamond, B. J., Shiflett, S. C., Feiwei, N., Matheis, R. J., Noskin, O., Richards, J. A., & Schoenberger, N. E. Ginkgo biloba extract: Mechanisms and clinical indications. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 81(5), 668–678, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1053/mr.2000.3840>