

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DANO E REPARO DE DNA EM INDIVÍDUOS COM ATAXIA-TELANGIECTASIA E EM SEUS PAIS HETEROZIGOTOS

Roberta Passos Palazzo

Orientadora: Dr^a Laura Bannach Jardim

Porto Alegre, dezembro de 2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.
Faculdade de Medicina – Rua Ramiro Barcellos, 2400, 2º andar. 90035-003. Fone: #55 51 33085605. Fax: #55 51 33085606. E-mail: ppgcm@ufrgs.br

Agradecimentos

Ao Dr. Sharbel Weidner Maluf por todas as oportunidades oferecidas até então, que começaram ainda na iniciação científica; pela presença, dedicação, paciência e principalmente pela amizade.

A Dra. Laura Bannach Jardim pela disponibilidade da orientação e pelo apoio e solicitude no decorrer do trabalho.

A equipe do Serviço de Física Médica: Alexandre Bacellar e Fernanda de Oliveira, pelas inúmeras vezes que me acompanharam nas etapas de irradiação. Obrigada pela disposição.

Aos meus amigos do laboratório de Citogenética por toda a ajuda prática relacionada a essa e a outras pesquisas, por criarem um ambiente de trabalho muito bom e por inúmeras situações.

A todos os funcionários e estudantes do Serviço de Genética Médica, em especial ao Juarez e ao Régis, pelos socorros com eventuais coletas e preparo de soluções.

A minha família, pelo incentivo constante, preocupação e carinho.

A todos os meus amigos, por fazerem parte.

SUMÁRIO

1. Lista de Abreviaturas e Siglas.....	4
2. Lista de Figuras.....	5
3. Resumo.....	6
4. Introdução.....	7
5. Revisão da Literatura.....	8
5.1 Ataxia-telangiectasia: clínica e evolução.....	8
5.2 A proteína ATM.....	9
5.3 Relação entre A-T e Estresse Oxidativo.....	12
5.4 Heterozigotos para o gene ATM.....	12
5.5 Instabilidade Genômica e Radiosensibilidade.....	14
5.6 Achados Laboratoriais.....	14
5.7 Técnicas para avaliação de dano de DNA.....	16
5.7.1 Ensaio Cometa.....	16
5.7.2 Teste de Micronúcleo.....	17
6. Objetivos.....	20
7. Referências da Revisão da Literatura.....	21
8. Artigo 1.....	24
9. Considerações Finais.....	49
10. Anexos.....	54
10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	54
10.2 Questionário de Saúde Pessoal.....	56

Lista de abreviaturas e siglas

AFP	alfa-fetoproteína
AT	ataxia-telangiectasia
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
BRCA1	breast cancer 1 (gene)
CBMN	cytokinesis-blocked micronucleus
MRN	complexo Mre11-Rad50-Nbs1
DI	damage index
DSB	double-strand breaks
MN	micronúcleo
NB	nucleoplasmic bridges
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
SCGE	single-cell gel electrophoresis
V(D)J	processo de recombinação que envolve a formação de linfócitos funcionais (<i>Variable, Diverse, e Joining</i>)

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração das etapas da técnica do cometa	Página 16
Figura 2: Linfócitos processados pela técnica do cometa	Página 17
Figura 3: Linfócitos processados pela técnica de micronúcleos	Página 19

Resumo

A presente pesquisa pretende demonstrar evidências capazes de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na ataxia-telangiectasia, bem como oferecer dados que auxiliem na implementação de técnicas complementares ao diagnóstico desta síndrome.

Desde a descoberta do gene envolvido na ataxia-telangiectasia (o gene ATM), muito conhecimento tem sido acumulado, especialmente sobre os mecanismos moleculares envolvidos na síndrome, bem como nas respectivas doenças relacionadas. Este estudo teve como objetivo avaliar o dano de DNA, a capacidade de reparo e a sensibilidade à radiação ionizante comparada à bleomicina em indivíduos com ataxia-telangiectasia e em seus pais heterozigotos, relacionando-os com um grupo controle. O trabalho foi desenvolvido através de voluntários em acompanhamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras foram submetidas às técnicas de micronúcleo e cometa, de maneira espontânea e com dano de DNA induzido. Os resultados demonstraram que a técnica de micronúcleo sem a indução de dano é o suficiente para a diferenciação de pacientes, pais e controles, incluindo níveis de micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN) e BUDs nucleares. Não foi possível distinguir os três grupos com a técnica do cometa espontâneo, mas a monitoração da cinética de reparo de DNA através dessa técnica demonstrou que o grupo de pacientes apresenta um atraso no processo de reparo do DNA, em relação aos controles. Os achados nas duas técnicas são complementares, e a sua combinação é altamente recomendável na identificação de instabilidade cromossômica, com o objetivo de auxiliar no diagnóstico de pacientes AT.

Introdução

As pesquisas relacionadas com diferentes aspectos da ataxia-telangiectasia são de grande importância na área médica. Apesar de tratar-se de uma síndrome relativamente rara e sem cura, a partir de um diagnóstico precoce é possível inserir novos cuidados na rotina dos pacientes com o objetivo de impedir ou atrasar o surgimento de doenças secundárias a essa patologia, como é o caso das infecções respiratórias e do desenvolvimento de câncer. O diagnóstico da ataxia-telangiectasia pode ser relativamente simples em pessoas com todos os sintomas característicos, entretanto, é mais complexo para aqueles com menor número de sintomas. Uma vez identificado um paciente, os cuidados passam a ser estendidos aos familiares portadores obrigatórios da mutação. Essa situação reforça a relevância das pesquisas nessa área diagnóstica, considerando que atualmente a identificação de indivíduos portadores da mutação na ausência de um familiar afetado ainda é um processo incomum. Esses indivíduos apesar de, na maioria das vezes, não desenvolverem sintomas clínicos, apresentam maior sensibilidade a agentes genotóxicos (como a radiação ionizante, por exemplo), assim como ocorre com os pacientes.

Revisão da Literatura

Ataxia-telangiectasia: clínica e evolução

Ataxia-telangiectasia (AT) é uma doença multissistêmica complexa e rara, herdada de forma autossômica recessiva. Caracteriza-se por uma variedade de manifestações patológicas: ataxia progressiva do córtex cerebelar (com consequente disfunção neuromotora severa), telangiectasia, imunodeficiência profunda (de ambas as porções humoral e celular), atrofia do timo, alfa-fetoproteína (AFP) sérica elevada, retardo no crescimento, disgenesia gonadal, senescência precoce, encurtamento telomérico acelerado, sensibilidade aos efeitos citotóxicos e clastogênicos da radiação ionizante, instabilidade cromossômica (frequentemente envolvendo translocações com pontos de quebra em sítios relacionados a genes do sistema imunológico) e maior risco de desenvolvimento de câncer (Gilad, Chessa et al. 1998; Becker-Catania, Chen et al. 2000).

A AT é diagnosticada em um a cada 40.000 nascidos vivos aproximadamente, nos EUA. São pessoas aparentemente normais ao nascimento, iniciando a caminhar em idade normal; entretanto, entre os 2-3 anos de vida a ataxia (perda da coordenação muscular) torna-se visível e geralmente aos 10 anos de idade os pacientes já estão confinados à cadeira de rodas. A ataxia geralmente precede a telangiectasia, a qual é descrita como uma dilatação crônica de um grupo de capilares, causando manchas elevadas, vermelho escuras, na pele ou nos olhos (Ball and Xiao 2005). Poucos pacientes sobrevivem até a terceira década de vida (Opeskin, Waterston et al. 1998).

A proteína ATM

A proteína ATM (ataxia telangiectasia mutated) é codificada pela região 11q22-23, correspondendo a um polipeptídeo de 3056 aminoácidos da família de quinases com sequência homóloga a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), a qual inclui DNA-PK, ATR, MEC1, TEL1, TOR e FRAP dentre outras. Membros dessa família de proteínas estão envolvidos em vários aspectos da detecção do dano de DNA e controle da progressão do ciclo celular (Gatti, Berkel et al. 1988; Keith and Schreiber 1995; Savitsky, Sfez et al. 1995; Uziel, Savitsky et al. 1996).

Mutações do gene ATM podem incluir pequenas deleções, inserções e substituição de nucleotídeo único; eventos que geralmente levam a defeitos de splicing (Zgheib, Huyen et al. 2005). Estudos de triagem do gene ATM revelaram uma ampla variedade de mutações dentro do grupo de pacientes com AT, sendo que muitas dessas variações mostraram-se restritas a determinados grupos familiares. Os pacientes com o fenótipo clássico AT normalmente não são classificados em subtipos clínicos, entretanto, ocasionalmente casos “AT variantes” são relatados. Esses pacientes podem ter ataxia mais moderada, radiosensibilidade celular intermediária e expectativa de vida maior que a grande parte dos pacientes com AT. A identificação desses fenótipos atípicos, por sua vez, é importante para o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal (Gilad, Chessa et al. 1998).

A sinalização promovida pela ATM é essencial no reparo de quebras de fita dupla (Double-strand breaks - DSB) de DNA, entretanto, seu envolvimento detalhado ainda é desconhecido. De todos os tipos de dano de DNA, as DSBs representam a maior ameaça à integridade de um genoma. Na tentativa de corrigir essas alterações, células eucarióticas desenvolveram sistemas apropriados para diversos tipos de extensão de dano. Nesses sistemas atuam o reparo de DNA e os checkpoints do ciclo

celular, os quais conferem à célula um intervalo para a ação do reparo, antes que a mesma complete subseqüentes eventos celulares como a replicação de DNA e a mitose (Iliakis, Wang et al. 2003; Shiloh 2003).

De acordo com o modelo atual de sinalização da ATM, após a formação de DSBs, em qualquer fase do ciclo celular, a ATM é ativada. Contudo, esse mecanismo de ativação ainda está sendo elucidado. Em células não-irradiadas a ATM existe como um dímero não fosforilado, circulante em todo o núcleo. Após a irradiação, o que leva à formação de DSBs, a ATM torna-se um monômero fosforilado, rapidamente recrutado para os sítios de DSBs (Bakkenist and Kastan 2003).

Estudos sugerem que o recrutamento da ATM é dependente da presença do complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) nos sítios de DSBs. Além disso, modificações na estrutura da cromatina poderiam, por intermédio da 53BP1, resultar na autofosforilação da ATM, ou seja, um monômero ativado de ATM poderia ativar um dímero de ATM distante do sítio da DSB, dissociando-o em dois monômeros ativados de ATM (Bakkenist and Kastan 2003; Zgheib, Huyen et al. 2005).

Mesmo com o esclarecimento de parte da regulação e funcionamento da proteína ATM, alguns pesquisadores ainda questionam a sua participação em situações de DSB. Um estudo realizado no Reino Unido constatou que 25% ou menos das DSBs precisam da ATM para o seu reparo e que essa proteína é específica ao reparo da heterocromatina. Sendo assim, a importância da sinalização da ATM seria proporcional à expansão de componentes heterocromáticos de um genoma (Goodarzi, Noon et al. 2008).

A ATM também responde a quebras fisiológicas no DNA durante o desenvolvimento e a diferenciação de células B e T. Foi demonstrada a participação da proteína na resolução de DSBs geradas durante a recombinação V(D)J.

Apesar de ser uma proteína predominantemente nuclear, existem evidências de uma forma citoplasmática da ATM (~10-20%), presente em peroxissomos (envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos e detoxificação) e em endossomos (responsáveis pela endocitose e pelo transporte de receptores intracelulares e outras moléculas). A ATM também pode existir como uma proteína solúvel no citoplasma, entretanto, ainda não se obteve evidências diretas da ativação citoplasmática da ATM (Lavin, Kozlov et al. 2005).

Outro aspecto instigante da ataxia-telangiectasia refere-se aos índices de mRNA do gene ATM. Do ponto de vista molecular, a maior parte das doenças genéticas exibem uma perda ou redução protéica secundária ao decréscimo de índices de mRNA. Entretanto, já foram reportados diversos casos de pacientes com AT, portadores de níveis normais de mRNA. Isso sugere que a estabilidade e o bom funcionamento da proteína ATM podem também estar relacionados com a formação da estrutura tridimensional da proteína (Chen PC, 1978; Becker-Catania, 2000).

Relação entre AT e Estresse Oxidativo

Além do reparo de DNA e da regulação dos *checkpoints*, existem indícios sobre a participação do gene ATM em processos antioxidantes. Foi observado que culturas de células AT apresentavam estresse oxidativo crônico. Além disso, tanto a análise de pacientes como de modelos animais de ratos revelaram a presença de dano oxidativo

em lipídeos, proteínas e no próprio DNA, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (Berni, Meschini et al. 2008). Reforçando esses indícios, já foram relatadas as seguintes situações: células AT apresentam sensibilidade a agentes oxidantes como óxido nítrico, superóxido e peróxido de hidrogênio em ensaios de cultura celular; células AT resintetizam a glutatona mais lentamente que células normais; suspeita-se que o dano causado pela radiação ionizante envolve espécies reativas de oxigênio; por último, o BRCA1, que demonstrou ser importante para a proteção da célula frente ao dano provocado por peróxido de hidrogênio, é fosforilado e ativado pela ATM (Shackelford, Innes et al. 2001).

Heterozigotos para o gene ATM

O número de indivíduos portadores de uma cópia alterada do gene ATM foi estimado em torno de 0,5-1% da população geral (Broeks, Urbanus et al. 2000). Este grupo não apresenta os sintomas graves dos pacientes AT, mas possuem um risco maior de desenvolver diversas formas de câncer, e estão propensos a efeitos colaterais após radioterapia. Por esta razão, a identificação destes portadores é importante para pesquisas na área da epidemiologia do câncer, particularmente câncer de mama em mulheres, onde se estima que aproximadamente 5% dos pacientes apresentem mutação do gene ATM (Fernet, Moullan et al. 2004).

Os níveis de proteína ATM nos heterozigotos, apesar de inferiores, são suficientes para garantir um desenvolvimento neurológico e funções celulares normais. O risco de câncer elevado pode estar atribuído a um limiar de ATM, abaixo do qual, certas células tornam-se mais suscetíveis aos agentes ambientais carcinogênicos (Becker-Catania, Chen et al. 2000).

Pressupõe-se que existam duas populações de portadores de AT, um grupo com um alelo truncado pareado com um alelo normal e um segundo grupo com uma mutação sem sentido pareada com um alelo normal, sendo que este último estaria mais suscetível ao desenvolvimento de câncer.

Índices maiores de morte celular em resposta ao tratamento com radiação ionizante é uma das características de todas as células homozigotas para o gene ATM, mas o nível dessa radiosensibilidade em heterozigotos aparenta ser mais variável. Muitos autores relataram um índice de sobrevivência intermediário entre aqueles encontrados em células normais e homozigotas para o ATM, entretanto, em outros estudos, algumas sobreposições ou ausências de diferença estatística entre células normais e heterozigotas para ATM foram detectadas (Fernet, Moullan et al. 2004).

Instabilidade Genômica e Radiosensibilidade

Durante os anos 60 foi evidenciada a hipersensibilidade de pacientes AT à radiação ionizante (raios-X, raios- γ) após radioterapia convencional, a qual se demonstrou fatal. Na década de 70 esta hipersensibilidade foi relatada em culturas de células AT (Lavin, Kozlov et al. 2005). Atualmente os relatos de hipersensibilidade estendem-se à bleomicina e outros agentes indutores de DSB (Shackelford, Innes et al. 2001).

Os linfócitos de pacientes AT são caracterizados por uma fragilidade cromossômica que pode incluir estruturas dicêntricas, acêntricas, anéis, inversões e translocações. Esta instabilidade se manifesta *in vivo*, em preparados diretos de medula óssea, com aspecto clonal. A instabilidade é mais óbvia em linfócitos T, mas também pode ser observada em células B e fibroblastos. Alterações cromossômicas induzidas

por radiação também são mais elevadas em linfócitos AT do que em controles (Lavin, Kozlov et al. 2005).

Achados Laboratoriais

Os pacientes com AT apresentam imunodeficiência relacionada com diminuição dos níveis de IgA, IgE e IgG2, bem como aberrações cromossômicas características, maior encurtamento telomérico, e radiosensibilidade (Ball and Xiao 2005).

A presença de anormalidades citogenéticas em pacientes com AT foi descrita pela primeira vez em 1960 e, desde então, é detectada em cerca de 5 a 10% dos portadores da doença, tanto na forma de translocações estáveis como de inversões (McKinnon 1987). Nos linfócitos, estas anormalidades estão primariamente relacionadas com sítios de genes de receptor de células-T e imunoglobulinas de cadeia pesada (Lavin, Kozlov et al. 2005). A frequência aumentada de quebras cromossômicas nos pacientes com AT, tanto por exposição à radiação ionizante como por agentes químicos radiomiméticos, é uma característica importante da patologia.

Na AT, a presença da translocação específica t(7;14) ocorre numa frequência bastante alta e, aplicada em conjunto com o estudo de quebras cromossômicas, auxilia na elaboração de um diagnóstico mais preciso (Mary C. Lowery, Cheryl Sinclair-Hess et al. 1994).

Outro aspecto característico da síndrome é o nível de AFP sérica, o qual se apresenta elevado em mais de 95% dos pacientes. Este parâmetro apresenta-se naturalmente aumentado até os 2 anos de idade, podendo ser utilizado no diagnóstico

apenas após esta idade. Supõe-se que o aumento de AFP seja responsável pela degeneração das células de Purkinje nos pacientes com AT.

Em crianças muito jovens com AT, o cerebelo apresenta tamanho normal, entretanto, por volta dos 10 anos de idade, imagens de ressonância magnética podem revelar decréscimo no volume cerebelar, conferindo mais uma ferramenta de diagnóstico (Ball and Xiao 2005).

Técnicas para avaliação de dano de DNA

1. Ensaio Cometa

O teste Cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, de forma quantitativa. No presente projeto será utilizada a versão alcalina, a qual detecta quebras de fita única e dupla, sítios alcali-lábeis, e crosslinks. Trata-se de uma metodologia simples, barata, rápida e que permite a avaliação de um grande número de pessoas (Maluf S and Erdtmann B 2003). As etapas da técnica são ilustradas na figura 1.

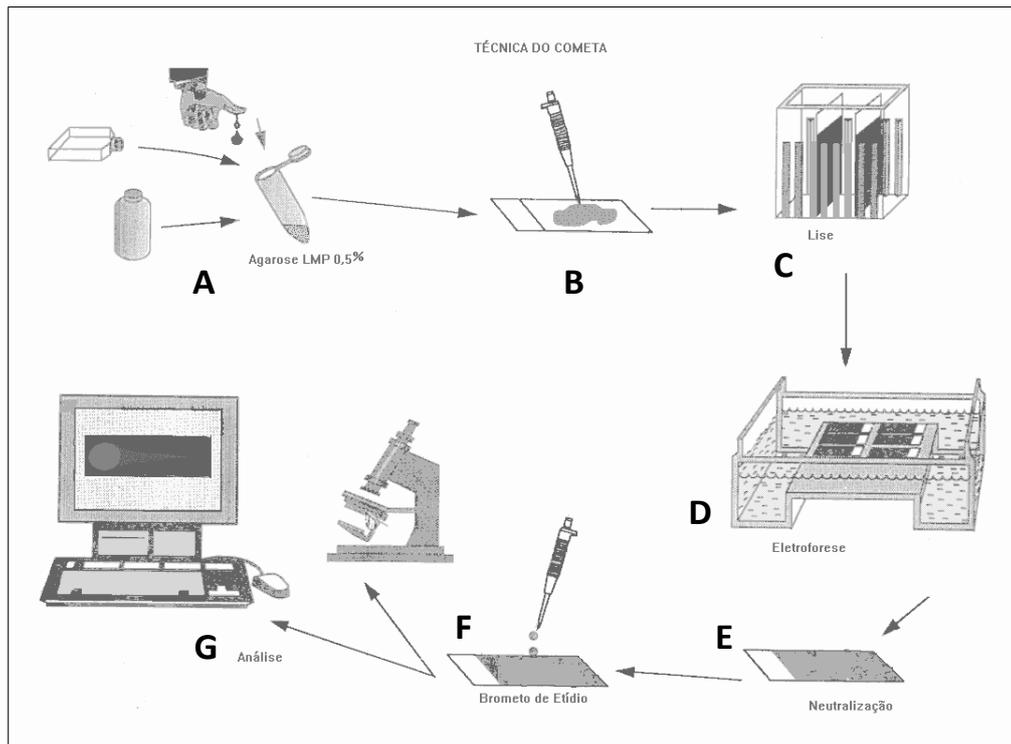


Figura 1: Ilustração das etapas da Técnica do Cometa: (A) Sangue periférico acrescido de agarose LMP (low melting point); (B) Aplicação sobre lâmina com pré-cobertura de gel de agarose; (C) Acomodação das lâminas em solução de lise; (D) Eletroforese em tampão alcalino; (E) Neutralização das lâminas; (F) Coloração; (G) Análise (adaptado de Speit, exposição oral, 1998).

Através dessa técnica, o dano de DNA é visualizado individualmente na célula sob a forma de um aumento na migração de material genético a partir do núcleo (“cauda” do cometa) (figura 2). O mecanismo da técnica relaciona-se com a organização super-helicoidal do DNA, a qual se torna relaxada em função de processos de quebras, podendo formar estruturas alongadas a partir da eletroforese (Maluf 2004).

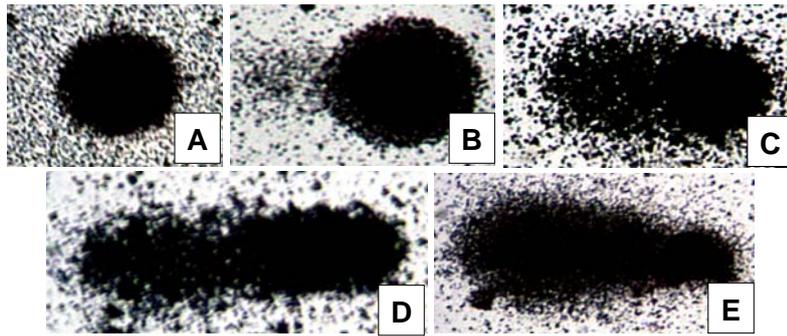


Figura 2: Linfócitos processados pela Técnica do Cometa. A: classe 0 (nenhum dano detectado), B: classe 1, C: classe 2, D: classe 3, E: classe 4 (índices crescentes de dano de DNA).

2. Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleos (MN), ou cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) foi descrito em medula óssea de camundongo, em 1973, por Heddle. Através dele detectam-se agentes genotóxicos clastogênicos e interferentes da formação do fuso mitótico, afetando a distribuição equitativa dos cromossomos na divisão celular. O ensaio serve como primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido do que a análise de quebras cromossômicas (clastogênese), sendo mais eficiente para detectar a perda de cromossomos inteiros (aneugênese) (Heddle 1973).

A frequência de MN em linfócitos do sangue periférico humano foi estudada por Cauntryman e Heddle (1976), mostrando a possibilidade de se medir o dano cromossômico através de um tecido de mais fácil acesso, já que, originalmente, a técnica de MN tinha sido descrita apenas para eritrócitos de medula óssea, em 1975 por Schmid. A dificuldade dessa técnica era distinguir as células que, em cultura, haviam passado por um ciclo de divisão, daquelas que não haviam se dividido.

Fenech e Morley, em 1985, utilizaram citocalasina B para bloquear a citocinese celular. Desta maneira, apenas as células que passam por um ciclo de divisão nuclear (células binucleadas) são consideradas na análise de frequência de MN (Fenech and Morley 1985).

Os linfócitos T analisados pelo teste são células que circulam por diferentes órgãos antes de retornar ao sangue periférico. Os linfócitos podem circular por anos e até mesmo décadas, acumulando mutações no seu DNA, produzidas pela sua exposição durante a sua existência (Carrano and Natarajan 1988).

Na análise das células binucleadas, podemos encontrar três alterações distintas (figura 3). A primeira, como já mencionada, equivale aos MN, os quais correspondem a fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não atingiram o fuso mitótico durante a divisão celular e acabaram expulsos do núcleo (Tucker and Preston 1996). As pontes nucleoplasmáticas (NB – nucleoplasmic bridges), por sua vez, ocorrem quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são transferidos para pólos opostos da célula na anáfase. A análise de NB pode fornecer informações sobre o tipo de mutação envolvida (clastogênese ou aneugênese), além de prover a medida de rearranjos cromossômicos (Umegaki and Fenech 2000). Por último, os “buds” nucleares, correspondem a amplificações de DNA encontradas na periferia nuclear (Fenech and Crott 2002).

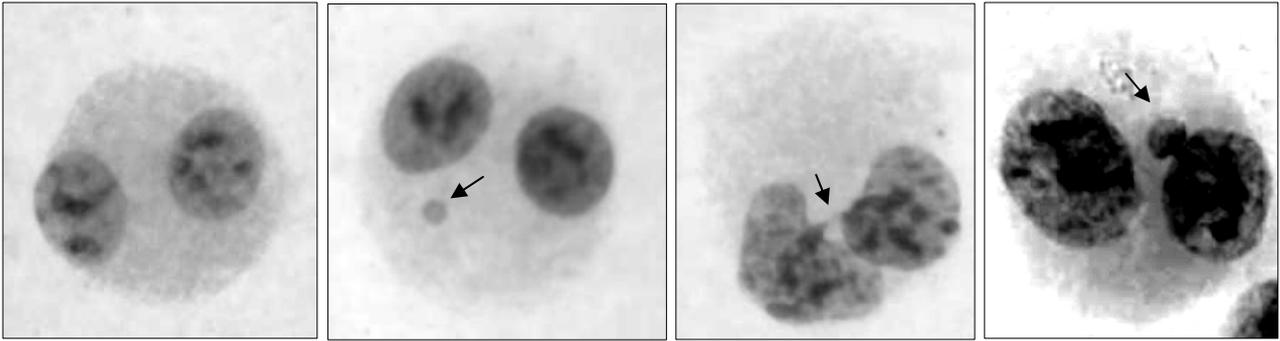


Figura 3: linfócitos processados pela técnica de micronúcleos. (A) linfócito binucleado normal, (B) linfócito binucleado com micronúcleo, (C) linfócito binucleado com ponte nucleoplasmática, (D) linfócito binucleado com BUD.

Objetivos

Objetivo geral:

- Avaliar o dano de DNA, a capacidade de reparo e a sensibilidade à radiação ionizante comparada à bleomicina em indivíduos com ataxia-telangiectasia e seus pais heterozigotos.

Objetivos específicos:

- Avaliar o índice de dano de DNA através da técnica do cometa em pacientes com AT, heterozigotos e controles.
- Avaliar a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos ("buds") nucleares em culturas de pacientes com AT, heterozigotos e controles, espontâneas, expostas à radiação ionizante e a bleomicina.
- Avaliar a ação do Sistema de Reparo, após exposição à radiação ionizante, através de adaptações na técnica do cometa em pacientes com AT e heterozigotos comparando-os com indivíduos controles.
- Avaliar a resposta direta à bleomicina através da técnica do cometa, em amostras de pacientes AT e heterozigotos comparando-os com indivíduos controles.

Referências

- Ball, L. G. and W. Xiao (2005). "Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases." Acta Pharmacol Sin **26**(8): 897-907.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.
- Becker-Catania, S. G., G. Chen, et al. (2000). "Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity." Mol Genet Metab **70**(2): 122-33.
- Berni, A., R. Meschini, et al. (2008). "L-carnitine enhances resistance to oxidative stress by reducing DNA damage in Ataxia telangiectasia cells." Mutat Res **650**(2): 165-74.
- Broeks, A., J. H. Urbanus, et al. (2000). "ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility." Am J Hum Genet **66**(2): 494-500.
- Carrano, A. V. and A. T. Natarajan (1988). "International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques." Mutat Res **204**(3): 379-406.
- Chen PC, L. M., Kidson C, Moss D (1978). "Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer prone population." Nature **274**: 249-256.
- Countryman, P. I. and J. A. Heddle (1976). "The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes." Mutat Res **41**(2-3): 321-32.
- Fenech, M. and J. W. Crott (2002). "Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay." Mutat Res **504**(1-2): 131-6.
- Fenech, M. and A. A. Morley (1985). "Measurement of micronuclei in lymphocytes." Mutat Res **147**(1-2): 29-36.
- Fernet, M., N. Moullan, et al. (2004). "Cellular responses to ionising radiation of AT heterozygotes: differences between missense and truncating mutation carriers." Br J Cancer **90**(4): 866-73.

- Gatti, R. A., I. Berkel, et al. (1988). "Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23." Nature **336**(6199): 577-80.
- Gilad, S., L. Chessa, et al. (1998). "Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants." Am J Hum Genet **62**(3): 551-61.
- Goodarzi, A. A., A. T. Noon, et al. (2008). "ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin." Mol Cell **31**(2): 167-77.
- Heddle, J. A. (1973). "A rapid in vivo test for chromosomal damage." Mutat Res **18**(2): 187-90.
- Iliakis, G., Y. Wang, et al. (2003). "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation." Oncogene **22**(37): 5834-47.
- Keith, C. T. and S. L. Schreiber (1995). "PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints." Science **270**(5233): 50-1.
- Lavin, M. F., S. Kozlov, et al. (2005). "Atm and cellular response to DNA damage." Adv Exp Med Biol **570**: 457-76.
- Maluf S and Erdtmann B (2003). Biomonitorização do dano genético em humanos. Genética Toxicológica. Alcance. Porto Alegre, Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. **1**.
- Maluf, S. W. (2004). "Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis." Clin Chim Acta **347**(1-2): 15-24.
- Mary C. Lowery, Cheryl Sinclair-Hess, et al. (1994). "Ataxia telangiectasia revitalized the importance of cytogenetic analysis in the diagnosis of AT." Applied Cytogenetics **20**(2): 3.
- McKinnon, P. J. (1987). "Ataxia-telangiectasia: an inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man. Progress in the elucidation of the underlying biochemical defect." Hum Genet **75**(3): 197-208.
- Opeskin, K., J. Waterston, et al. (1998). "Ataxia telangiectasia with long survival." J Clin Neurosci **5**(4): 471-3.
- Savitsky, K., S. Sfez, et al. (1995). "The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species." Hum Mol Genet **4**(11): 2025-32.
- Schmid, W. (1975). "The micronucleus test." Mutat Res **31**(1): 9-15.

- Shackelford, R. E., C. L. Innes, et al. (2001). "The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts." J Biol Chem **276**(24): 21951-9.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-68.
- Tucker, J. D. and R. J. Preston (1996). "Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment." Mutat Res **365**(1-3): 147-59.
- Umegaki, K. and M. Fenech (2000). "Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils." Mutagenesis **15**(3): 261-9.
- Uziel, T., K. Savitsky, et al. (1996). "Genomic Organization of the ATM gene." Genomics **33**(2): 317-20.
- Zgheib, O., Y. Huyen, et al. (2005). "ATM signaling and 53BP1." Radiother Oncol **76**(2): 119-22.

Article 1 – DNA Damage and repair through the single-cell gel electrophoresis and cytokinesis-blocked micronucleus assays in individuals with ataxia-telangiectasia and their parents

O artigo será submetido à Revista: The Official Journal of the American Society for Radiation Oncology

DNA Damage and repair through the single-cell gel electrophoresis and cytokinesis-blocked micronucleus assays in individuals with ataxia-telangiectasia and their parents.

Roberta Passos Palazzo¹, Sharbel Weidner Maluf^{1*}, Alexandre Bacellar², Fernanda Ramos de Oliveira², Laura Bannach Jardim¹.

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Medical Physics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding author:**

Phone: +55 51 2101 8011

Fax: +55 51 2101 8010

E-mail: smaluf@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Ataxia-telangiectasia (AT) is a multisystem, complex and rare disease, inherited in an autosomal recessive manner. It is characterized by a variety of pathological manifestations: progressive cerebellar ataxia, telangiectasia, profound immunodeficiency, thymic atrophy, elevated serum alpha-fetoprotein, growth retardation, gonadal dysgenesis, premature senescence, accelerated telomere shortening, increased sensitivity to the cytotoxic and clastogenic effects of ionizing radiation, chromosome instability and increased risk of developing cancer. According to some studies, heterozygotes do not present clinic symptom of the disease, only a higher risk of developing cancer. Based on this information, this study evaluated the rates of DNA damage in AT patients, and in their parents, compared to a control group. Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) and Cytokinesis-Blocked Micronucleus (CBMN) assays were used spontaneously and with the induction of damage by bleomycin or ionizing radiation, aiming to evaluate the genomic instability and repair capacity. We evaluated 14 patients, 12 parents and 14 controls, with respective mean age: 16.93 ± 10.62 ; 40.25 ± 10.74 and 26.93 ± 11.87 . The results showed that the use of CBMN assay without inducing damage is sufficient for differentiation of patients, parents and controls, including levels of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NB) and nuclear BUDs. It was impossible to distinguish the groups with the SCGE spontaneous assay, but monitoring the kinetics of DNA repair through this technique was verified that the group of patients showed a delay in the repair process, compared with controls. The findings in the two techniques are complementary, and their combination appears highly recommendable in the identification of chromosomal instability in order to assist in the diagnosis of AT patients.

Keywords: Ataxia telangiectasia; SCGE assay; CBMN assay; DNA damage.

Introduction

Ataxia-telangiectasia (AT) is a multisystem, complex and rare disease, inherited in an autosomal recessive manner. It is characterized by a variety of pathological manifestations: progressive cerebellar ataxia (with consequent severe neuromotor dysfunction), telangiectasia, profound immunodeficiency (of both humoral and cellular compartments), thymic atrophy, high levels of alpha-fetoprotein (AFP), growth retardation, gonadal dysgenesis, premature senescence, accelerated telomere shortening, sensitivity to the clastogenic and cytotoxic effects of ionizing radiation, chromosomal instability (often involving translocations of sites of immune system genes) and a higher risk of developing cancer. This syndrome affects about one in 40.000 born in the U.S. (1,2).

The AT patients have a fail in ATM protein production, encoded by the region 11q22-23. This protein corresponds to a polypeptide of 3056 aminoacids, and belongs to a family of kinases with sequence homologous to phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Members of this protein family are involved in various aspects of DNA damage detection and control of cell cycle progression (3-6).

The signaling promoted by ATM is essential for the repair of the double-strand break (DSB) of DNA. In non-irradiated cells, ATM exists as a non-phosphorylated dimer, circulating around the nucleus. After irradiation, which leads to the formation of DSBs, the ATM becomes a phosphorylated monomer rapidly recruited to sites of DSBs.

The ATM also responds to physiological DNA breaks during development and differentiation of B and T cells. It was demonstrated the involvement of this protein in the resolution of DSBs generated during recombination V(D)J (7). In addition to DNA repair and regulation of the checkpoints, there is evidence on the involvement of ATM

protein in antioxidant processes. It was observed that A-T cell cultures had chronic oxidative stress. Furthermore, the analysis of both patients and animal models of rats revealed the presence of oxidative damage in lipids, proteins and DNA itself, both *in vitro* and *in vivo* (8). In support of these indications, the following aspects have been reported: A-T cells exhibit sensitivity to oxidizing agents such as nitric oxide, superoxide and hydrogen peroxide in cell culture assays; A-T cells re-synthesize the glutathione more slowly than normal cells. It is suspected that the damage caused by ionizing radiation involves reactive oxygen species, and finally, BRCA1, which proved to be important for cell protection against the damage caused by hydrogen peroxide, is phosphorylated and activated by ATM (9).

During the 1960s, the hypersensitivity of AT patients to ionizing radiation (X-rays, γ -rays) was seen after conventional radiotherapy, which is proved to be lethal. In the 1970s, this hypersensitivity was reported in cell culture (7). Currently, reports of hypersensitivity extend to bleomycin and other agents that induce to DSBs. The increased frequency of chromosomal breaks in AT patients, by exposure to ionizing radiation or radiomimetic chemical agents is a fundamental characteristic of the pathology (9).

The number of individuals with an altered copy of the ATM gene was estimated at around 0.5-1% of the general population (10). This group does not show severe symptoms of AT patients, but have a higher risk of developing various forms of cancer, and they are inclined to side effects after radiotherapy. For this reason, the identification of these carriers is important for research in the epidemiology of cancer, particularly breast cancer in women. It is estimated that approximately 5% of patients have mutations in the ATM gene (11).

ATM protein levels in heterozygotes, although lower, are sufficient to ensure a neurological development and normal cell functions. The high risk of cancer may be attributed to an ATM threshold lower which certain cells become more susceptible to carcinogenic environmental agents (2).

The study of different aspects of AT provides significantly help in the characterization of the disease, allowing changes in the conduct and monitoring of patients, aiming to preventing the emergence of secondary diseases to this pathology, such as the development of cancer. In this study, we evaluated the DNA damage, repair capacity and sensitivity to ionizing radiation compared to bleomycin in individuals with AT and their parents, compared to a control group.

Materials and methods

Between 2009 and 2010, total blood samples from 14 patients with AT and 12 parents of patients followed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were collected. The patient group consisted of 12 men and two women, with a mean age of 16.93 ± 10.62 (mean \pm standard deviation), and the parent group for 11 women and one man, with a mean age of 40.25 ± 10.74 (only one person smoking). The control group consisted of 14 healthy subjects, with a mean age of 26.93 ± 11.87 . This work consists in a prospective case-control study.

An informed consent form was read and signed by all study participants, who received a copy signed by the principal investigator where general information about the study was provided. The parents or legal guardians of the children in the study gave their informed consent. In addition, volunteers answered an individual health questionnaire as recommended by the International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (12).

Samples were collected in heparin coated tubes and sent to the following assessments:

Comet assay

The standard alkaline comet assay protocol was used as reported by Singh et al. (13). The assay was performed in accordance with general guidelines for *in vivo* use of the comet assay (14,15), but the slides were fixed and silver-stained according to Nadin et al. (16).

For evaluation of DNA damage, 100 cells per subject were analyzed at 200x magnification under a light microscope. Cells were assessed visually and received scores from 0 (no migration) to four (maximal migration) according to tail intensity (size

and shape). Therefore, the total scores (damage index, or DI) for 100 cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration) (17).

Cytokinesis-blocked micronucleus assay (CBMN)

From each sample collected three cell cultures were performed for CBMN assay: a culture without induction of DNA damage, a culture exposed to bleomycin (0.03 IU/ml of culture) and a culture exposed to 3 Gy (ionizing radiation from a ^{137}Cs γ -ray source). Exposures were performed 48 hours after culture.

Each culture was done according to the method described by Fenech and Morley (18) and revised by Fenech (19). One thousand binucleate cells from each culture were scored for micronuclei (MN), dicentric bridges (nucleoplasmic bridges [NB] between daughter nuclei), and nuclear buds (amplified DNA) (20) in coded, unidentified slides.

Evaluation of the repair system

For the induction of DNA damage, we used a modified protocol of Singh et al. (15). Briefly, the cells, embedded in agarose on slides were exposed to 3Gy. The radiation dose used was based on a pilot test. Control cells were prepared without exposure. To remove any artifacts related to reactive oxygen species, the slides were carefully submerged in icecold PBS for 3x5 min. Subsequently, the slides were placed in a moist chamber at 37 °C for 1h and 2h, allowing DNA repair.

Response to direct damage induced by bleomycin

We also evaluated the response of the samples before direct exposure to bleomycin. We added 0.003 U/ml of bleomycin in 100 μl of peripheral blood sample for three hours at room temperature. After this period, slides were prepared for the comet assay following the standard protocol of Singh et al. (13).

Statistical Analysis

The differences between the parameters of DNA damage among the three groups were assessed by Kruskal-Wallis. When this test resulted in significant differences, post hoc analysis was performed using Mann-Whitney test with Bonferroni correction. The comparison of data obtained with the SCGE assay in different treatments was performed with Friedman's test for related samples. When this test resulted in significant differences, post hoc analysis was performed using Wilcoxon and also with Bonferroni correction.

The evaluation of the cells' number on each comet class (class 1, 2, 3 or 4) according to the treatment (spontaneous, radiation induced, 1h and 2h after radiation) was performed on each group by Friedman's test to correlated samples. The same post hoc analysis described before were performed.

Results

Considering the frequency of MN, both in cultures of lymphocytes without induced damage(spontaneous) and in cultures with bleomycin-induced damage, the values were higher in patients compared to controls. Regarding to the parents' group, the values were intermediate for spontaneous cultures, however, similar to the patients for cultures with bleomycin.

The frequencies of MN in cultured lymphocytes with the induction of ionizing radiation damage were similar in all groups (patients, parents and controls). The frequencies of NB, in cultures with DNA damage induced and in spontaneous cultures showed no statistically significant differences between the study groups. Regarding to the frequencies of BUD, spontaneous and DNA damage induced cultures showed differences between the three groups.

The irradiated cultures showed increased frequencies of MN, NB and BUD in the three studied groups, except for the frequency of NB in the parents' group, where the increase was not significant.

The frequency of MN showed a significant difference when comparing to the spontaneous cultures with bleomycin-induced damage cultures in the patients' group, the same did not occur with the other parameters (NB and BUD).

The results obtained with the comet assay showed no statistically significant differences between patients, parents and controls, both for spontaneous evaluations (without inducing damage), and assessments induced by bleomycin or radiation (Table 1). The inductions by bleomycin and radiation generated significant increases in levels of DNA damage measured by the comet assay in the three groups (patients, parents and controls).

The results of the evaluation of the repair system by the comet assay are shown in Table 2. The differences between the DNA damage values, including spontaneous, radiation-induced, 1h and 2h post-radiation evaluations were statistically significant in all three study groups, but with different behaviors in terms of damage reduction (Figure 1). The indices of damage found during the test, detailed by damage class, were illustrated in Figure 2.

Discussion

One of the most frequent aspects of AT, present even in AT variant cases, is chromosomal instability, often with clonal translocations involving typical sites of immune system genes, besides the formation of other products of chromosomal breaks, rearrangements such as dicentrics, acentric rings and inversions (7,8). The results obtained with the CBMN assay parameters, MN and BUD, revealed significant differences between patients and controls, reinforcing the idea of chromosomal instability as a common feature of the syndrome.

Analysing only the results of spontaneous cultures, it was possible to differentiate the three study groups in two parameters of analysis (MN and BUDs), unlike what happens in the evaluation of chromosomal aberrations, which is essential the analysis of induced damage cultures to ensure greater specificity of diagnosis (21). Few studies have evaluated the situation of spontaneous ATM heterozygote cells. The most using the prior exposure for both oxidants and ionizing radiation (IR). In assessments of cell survival in response IR, for example, indexes in ATM heterozygote cells seem to be quite variable. Many authors reported an intermediate level of cell survival. However, in other studies, the results overlapped or showed no statistically significant difference for ATM heterozygote cells (22-28). In our study, the cultures with DNA damage-induced both by bleomycin and radiation did not improve the differentiation of the three study groups regarding the parameters MN and NB. In general, the p values increased progressively in the direction: spontaneous, bleomycin-induced and radiation-induced cultures. It is possible that the bleomycin and radiation doses for the CBMN assay have been very high, exceeding the differentiation range of the groups. The choice of bleomycin dose (0.03 IU / ml culture) was based on a review of the literature (21). We decided to use the same dosage of protocols for analysis of chromosomal aberrations.

The radiation dose was decided on a pilot project carried out before the start of the study, which evaluated the DNA damage caused by different radiation doses in healthy blood donors. Considering the response of each group studied, we found that the radiation produced the greatest responses in the trial. However, this response occurred in all three groups strongly.

The only parameter of CBMN assay that has maintained a significant difference among the three groups analyzed in all types of cell culture were BUDs, generally considered biomarkers of elimination of amplified DNA and/or DNA repair complexes (29). We question why this parameter was more effective in differentiating of the groups. It is clear that cells derived from AT patients exhibit defective cell cycle checkpoint responses and increased chromosome aberrations, especially because ATM is responsible for announcing the presence of the double-strand break (DSB), but although DSB end resection is delayed in A-T cells, their end resection occur (8,30). Thus, it is possible that the difference between controls, parents and patients regarding the management of checkpoints, results in a greater accumulation of DNA repair complexes at the end of the cell cycle for the A-T patients, followed by parents and controls, reflecting the results of BUDs. It can also be inferred that the time of induction of damage in the trial, included in the M phase of the cell cycle, might have favored the affinity between interstitial DNA generated (fragments, whole chromosomes or gene amplification) and nuclear envelope proteins, leading to encapsulation of this material during the reconstitution of the nuclear envelope, producing more BUDs than MNs.

NB indices were not significant in the CBMN assay, which usually associates with the involvement of an aneugenic processes, since the formation of NB necessarily requires a clastogenic action, unlike the other parameters. However, because this

structure is generally less frequent, its significance may have been prejudiced by not having performed an analysis of over 1000 binucleated lymphocytes per sample.

Regarding to the analysis involving the SCGE assay, first, we verify that the spontaneous test did not reveal a statistically significant difference between patients and controls. In contrast, Galarraga et al. (31) in similar evaluation showed that the spontaneous comet assay could differentiate A-T patients from parents and controls. In fact, we cannot rule out the possibility of using the comet assay without induction for diagnosis, because although it may not be significant, the difference between patients and controls is approximately 100% more damage in patients. The difficulty in the statistical power of the test is probably caused by the small sample size and the high rates of inter individual variation of the technique, which makes the very high standard deviation.

Using the comet assay, Djuzenova et al. (32) identified all heterozygous for the ATM gene, based on γ -radio sensitivity (3 Gy) in peripheral blood mononuclear cells, however, the protocol had different adaptations. Lymphocytes were previously separated and the processes of irradiation and repair occurred in suspension. SCGE assay slides were prepared subsequently. In our study, radiation caused a significant increase in the DNA damage index of patients, however, this increase, with similar intensity was also observed in the control group. Just as in the CBMN assay induction, adjustments must be considered in relation to radiation dose.

The evaluation of the kinetics of DNA repair revealed that after one h of treatment with 3 Gy, the control group repaired the damage more effectively, followed by the group of parents and patients (Table 2, Figure 1). This result is consistent with other studies such as Berni et al. (8), which investigated the repair after exposure to an

oxidizing agent in A-T cell lines and showed a lower repair capacity in the same recovery time for these cells in relation to control lines.

In the subsequent recovery time (2h), the group of patients maintained their speed of repair, while the other groups decreased significantly (Figure 1). Based on this result, we can infer that the mutation in the ATM protein gave a delayed response on exposure to radiation, which corroborates with the observations of White et al. (30).

Analysis of damage repair per classes (classes 1, 2, 3 and 4) showed that the three study groups performed mainly the repair of minor damage (class 1, 2 and 3), since the levels of damage class 4 did not decrease at any time of the evaluations. This result may be demonstrating an inability to repair cells with large amounts of damage.

The test of response to direct damage induced by bleomycin (0.003 U/ml) in the SCGE assay showed very strong responses and no statistical difference between the groups. As suggested for ionizing radiation, further studies with lower doses of bleomycin are required to evaluate the possibility of using a simple protocol and cost-effective complementary tool for the diagnosis of AT.

In general, the spontaneous CBMN assay and the repair system evaluation by SCGE assay may help in diagnosing A-T patients and ATM gene carriers, as complementary tools. The damage detected by SCGE is repairable, and its detection does not require cell division. Under alkaline conditions, this assay is capable of assessing double- and single-strand breaks and alkali-labile sites. Although, in general, the comet assay may be considered a more sensitive method to assess DNA damage by genotoxic agents. The mechanisms involved in the detection of damage by the CBMN assay are different from the mechanisms involved in the detection of damage by SCGE (33). Thus, the findings in the two techniques are complementary, and their

combination appears highly recommendable in the identification of chromosomal instability.

Since the first discovery of the ATM gene, much about the molecular mechanisms of A-T and its related diseases has been accumulated quickly. However, it is still add a lot of effort to research this area to ensure appropriate early diagnosis and prevention of diseases, including the heterozygotes. Further studies with different dosages and samples are still necessary.

Acknowledgements

We thank all the volunteers who participated in the study and the financial support provided by the FIFE / HCPA and CAPES.

References

1. Gilad S, Chessa L, Khosravi R, *et al.* Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. *Am J Hum Genet* 1998;62:551-561.
2. Becker-Catania SG, Chen G, Hwang MJ, *et al.* Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. *Mol Genet Metab* 2000;70:122-133.
3. Gatti RA, Berkel I, Boder E, *et al.* Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988;336:577-580.
4. Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 1995;270:50-51
5. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, *et al.* The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 1995;4:2025-2032.
6. Uziel T, Savitsky K, Platzer M, *et al.* Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics* 1996;33:317-320.
7. Lavin MF, Kozlov S, Gueven N, *et al.* Atm and cellular response to DNA damage. *Adv Exp Med Biol* 2005;570:457-476.
8. Berni A, Meschini R, Filippi S, *et al.* L-carnitine enhances resistance to oxidative stress by reducing DNA damage in Ataxia telangiectasia cells. *Mutat Res* 2008;650:165-174.
9. Shackelford RE, Innes CL, Sieber SO, *et al.* The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:21951-21959.
10. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, *et al.* ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet* 2000;66:494-500.
11. Fernet M, Moullan N, Lauge A, *et al.* Cellular responses to ionising radiation of AT heterozygotes: differences between missense and truncating mutation carriers. *Br J Cancer* 2004;90:866-873.
12. Carrano AV, Natarajan AT. International Commission for Protection Against

Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 1988;204:379-406.

13. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-191.
14. Tice RR, Agurell E, Anderson D, *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-221.
15. Singh NP, Graham MM, Singh V, *et al.* Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of gamma-rays. *Int J Radiat Biol* 1995;68:563-569.
16. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1183-1186.
17. Maluf SW, Erdtmann B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 2000;471:21-27.
18. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29-36.
19. Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 1997;392:11-18.
20. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2002;504:131-136.
21. Lowery MC, Sinclair-Hess C, Carey JC, *et al.* Ataxia telangiectasia revitalized the importance of cytogenetic analysis in the diagnosis of AT. *Applied Cytogenetics* 1994;20:3.
22. Chen PC LM, Kidson C, Moss D. Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer prone population. *Nature* 1978;274:249-256.
23. Kinsella TJ, Mitchell JB, McPherson S, *et al.* In vitro X-ray sensitivity in ataxia telangiectasis homozygote and heterozygote skin fibroblasts under oxic and hypoxic

conditions. *Cancer Res* 1982;42:3950-3956.

24. Nagasawa H, Latt SA, Lalande ME, *et al.* Effects of X-irradiation on cell-cycle progression, induction of chromosomal aberrations and cell killing in ataxia telangiectasia (AT) fibroblasts. *Mutat Res* 1985;148:71-82
25. Weeks DE, Paterson MC, Lange K, *et al.* Assessment of chronic gamma radiosensitivity as an in vitro assay for heterozygote identification of ataxia-telangiectasia. *Radiat Res* 1991;128:90-99.
26. West CM, Elyan SA, Berry P, *et al.* A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1995;68:197-203.
27. Shigeta T, Takagi M, Delia D, *et al.* Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations. *Cancer Res* 1999;59:2602-2607.
28. Sun X, Becker-Catania SG, Chun HH, *et al.* Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing. *J Pediatr* 2002;140:724-731.
29. Umegaki K, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 2000;15:261-269.
30. White JS, Choi S, Bakkenist CJ. Transient ATM kinase inhibition disrupts DNA damage-induced sister chromatid exchange. *Sci Signal* 2010;3:ra44.
31. Galarraga LM, Pérez JLS, Ramirez-Tortosa MC, *et al.* Use of the comet test to assess DNA damage in children with ataxia-telangiectasia and their relatives. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2008;18:136-142.
32. Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, *et al.* Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Lab Invest* 1999;79:699-705.
33. Maluf SW, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124:71-75.

Table 1. DNA damage by CBMN and SCGE assay in spontaneous, bleomycin induced and radiation induced cultures

Culture	MN	NB	BUD	DNA DI
Spontaneous:				
Control	2,43 ± 2,43 ^a	0,21 ± 0,43 ^a	1 ± 1,11 ^a	8,07 ± 7,12
Parents	7,75 ± 4,63 ^b	0,67 ± 0,99 ^a	4,25 ± 2,18 ^b	5,92 ± 3,42
Pacients	8,36 ± 4,4 ^c	1,29 ± 1,44 ^a	7,79 ± 6,57 ^c	16,36 ± 20,5
<i>p</i>	0,001	0,043	<0,001	0,589
Bleomycin induced:				
Control	8,79 ± 3,98 ^a	0,29 ± 0,61 ^a	3,71 ± 4,21 ^a	123,57 ± 89,57
Parents	13,97 ± 10,13 ^{a,b}	0,73 ± 0,71 ^a	7,71 ± 3,91 ^b	134,66 ± 118,07
Pacients	15,15 ± 7,16 ^b	1,41 ± 2 ^a	8,89 ± 5,42 ^c	165,21 ± 111,8
<i>p</i>	0,027	0,066	0,005	0,559
Radiation Induced:				
Control	24,29 ± 10,96	1,21 ± 1,48	7 ± 3,9 ^a	67,93 ± 27,71
Parents	28,32 ± 15,65	1,68 ± 1,36	11,48 ± 4,21 ^b	78,17 ± 61,49
Pacients	27,73 ± 17,18	3,28 ± 3,65	13,21 ± 6,87 ^c	119,14 ± 79,83
<i>p</i>	0,747	0,222	0,007	0,222

The results correspond to mean ± SD of three forms of nuclear aberrations analyzed in the CBMN assay: MN (micronucleus), NB (nucleoplasmic bridges) and BUD within groups: spontaneous, bleomycin induced (0.03 IU/ ml of culture) and radiation induced (3 Gy). The last column corresponds to the DNA damage index measured by the SCGE assay, spontaneously, bleomycin induced (0.003 IU/ ml of blood) and radiation induced (3 Gy). Each group presents the values for controls, parents and patients.

The statistical analysis includes post hoc tests through Mann Whitney tests with Bonferroni correction (different letters mean statistical differences at 0.017 level).

Table 2. DNA damage index during repair kinetics evaluation, by the SCGE assay

Study group	DNA damage index	P - value
Controls:		
Spontaneous	8,07 ± 7,12 ^a	
Radiation induced	67,93 ± 27,71 ^b	p<0,001
Repair in 1h	36,5 ± 32,54 ^c	
Repair in 2h	36,36 ± 15,36 ^c	
Heterozygotes:		
Spontaneous	5,92 ± 3,42 ^a	
Radiation induced	78,17 ± 61,49 ^b	p=0,002
Repair in 1h	49,42 ± 48,01 ^{a,b}	
Repair in 2h	68,25 ± 82,82 ^{b,c}	
Homozygotes:		
Spontaneous	16,36 ± 20,5 ^a	
Radiation induced	119,14 ± 79,83 ^b	p<0,001
Repair in 1h	93,21 ± 86,27 ^b	
Repair in 2h	77,14 ± 59,51 ^b	

The results correspond to mean ± SD of DNA damage analyzed in the SCGE assay for controls, AT heterozygotes and AT homozygotes in four different moments: spontaneous, after radiation induced (3 Gy) and after repair in 1h and 2h.

The statistical analysis includes post hoc tests through Wilcoxon tests with Bonferroni correction (different letters mean statistical differences at 0.083 level).

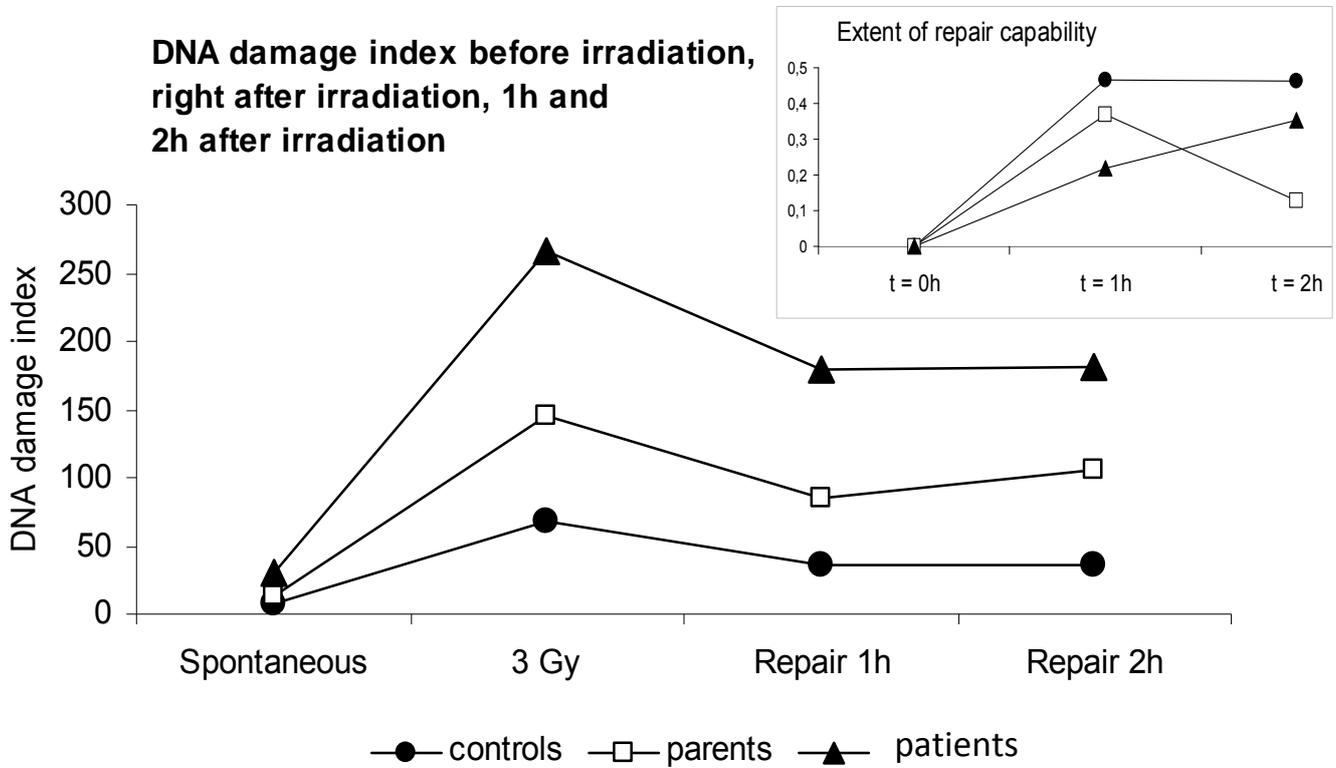


Figure 1. DNA damage index (DI) in peripheral blood leukocytes by SCGE assay in patients, parents and controls at the following times: immediately after collection (spontaneous damage), after 3 Gy irradiation (induced damage) and after repair of 1h and 2h.

The smaller graphic presents the percentage reduction of the DI, and was determined by subtracting the DI at 0h obtained from that at either 1h and 2h, and dividing the result by the value at 0h of recovery time.

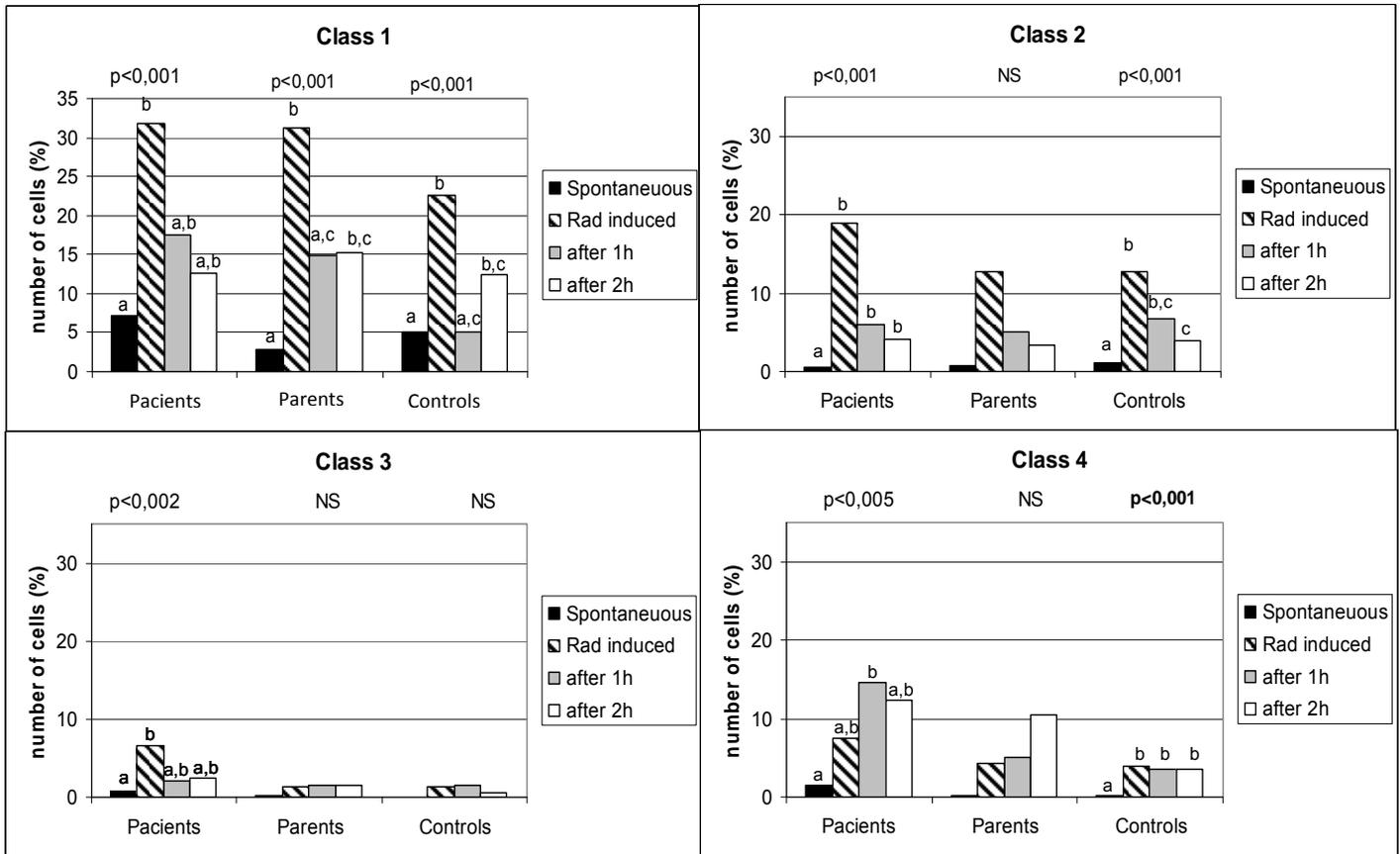


Figure 2. DNA damage index (DI) in peripheral blood leukocytes by SCGE assay, specified by damage class (class 1 – class 4). Illustrates the results of patients, parents and controls at the following times: immediately after collection (spontaneous damage), after 3 Gy irradiation (induced damage) and after repair of 1h and 2h.

Considerações Finais

A AT é uma síndrome que atinge os indivíduos ainda na primeira infância. Além do comprometimento das habilidades motoras, outro aspecto grave da patologia é a sua associação com doenças secundárias, como as infecções do trato respiratório (especialmente infecções brônquicas e pneumonias) e o desenvolvimento de neoplasias (particularmente leucemias e linfomas). O diagnóstico precoce da AT tem sua importância vinculada à indicação precoce de cuidados relacionados à alimentação, à exposição desnecessária a agentes mutagênicos e à utilização de medicamentos profiláticos. A confirmação de um diagnóstico de AT consequentemente garante a identificação dos familiares portadores da mutação, o que também é de grande importância, pois, mesmo sem evidências clínicas, esse grupo apresenta maior sensibilidade diante de agentes mutagênicos (como por exemplo, a radiação ionizante). Os cuidados com o tipo de exposição e a manutenção de uma alimentação saudável têm uma importância bastante expressiva para o grupo de portadores do gene ATM, os quais correspondem de 0,36–1% da população geral (Fernet, Moullan et al. 2004).

As anormalidades citogenéticas nos pacientes AT foram primeiramente descritas nos anos 1960. Desde então, uma série de informações foram acumuladas em relação à síndrome. Sabe-se que as células ATM homozigotas apresentam maior índice de morte celular em resposta ao tratamento com radiação ionizante e que células heterozigotas geralmente apresentam índices intermediários ou similares ao de amostras controle, sendo que essa hipersensibilidade estende-se à bleomicina e outros indutores de quebras de fita dupla de DNA. A fragilidade detectada nos cromossomos de linfócitos com a mutação do gene ATM inclui diferentes estruturas, especialmente translocações envolvendo os cromossomos 7 e 14. Outros aspectos clínicos e laboratoriais também podem ser úteis no diagnóstico da síndrome, como a redução dos

níveis de imunoglobulinas, encurtamento telomérico, aumento dos índices de alfa-fetoproteína, decréscimo do volume cerebelar, neurodegeneração progressiva relacionada à perda de células de Purkinje e maior suscetibilidade ao câncer.

Dentro dos estudos na área da mutagênese, algumas evidências relacionadas com amostras de pacientes AT têm sido documentadas: o ensaio cometa (com eletroforese alcalina) demonstrou ser uma técnica válida na quantificação do dano de DNA de pacientes AT e seus pais, podendo diferenciar esses dois grupos de amostras controle (Djuzenova, Schindler et al. 1999; L Moreno Galarraga, JL Santos Pérez et al. 2008). Culturas de células AT e modelos animais com deficiência de ATM revelaram dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA *in vivo* e *in vitro* (Berni, Meschini et al. 2008). Em estudo de aberrações cromossômicas, Tomanin et al. (Tomanin, Sarto et al. 1990) verificaram que linfócitos de pacientes AT apresentam mais de 10% de quebras cromossômicas espontâneas. Dörk et al (Dork, Bendix-Waltes et al. 2004) observaram que alguns tipos de mutação conferem uma atividade residual de ATM, o que está relacionada com maior sobrevida e um fenótipo clínico mais atenuado. Além disso, ensaios com avaliação de sobrevivência de colônia pós exposição à radiação ionizante também podem ser úteis na confirmação de um diagnóstico precoce de AT (Sun, Becker-Catania et al. 2002).

Com a realização do nosso estudo, primeiramente, conseguimos verificar com o ensaio CBMN, que MNs e BUDs são parâmetros úteis na diferenciação de pacientes e controles, considerando tanto culturas espontâneas como culturas com dano induzido por bleomicina. Interessantemente, com a avaliação isolada das culturas espontâneas já foi possível fazer a diferenciação dos três grupos estudados, o que não ocorre com o ensaio de aberrações cromossômicas, onde é necessária a comparação de culturas

espontâneas com culturas de dano induzido por drogas específicas, para garantir maior especificidade ao ensaio.

As culturas com dano induzido por radiação (3 Gy) revelaram respostas muito intensas, mas sem diferença estatística entre grupos para a maioria dos parâmetros. Isso nos leva a crer que dosagens mais baixas ainda poderiam auxiliar no diagnóstico e deveriam ser testadas.

Ao longo do ensaio, os índices de BUD mantiveram-se significativamente diferentes entre o grupo controle, o grupo de pacientes e o grupo de pais, tanto nas culturas espontâneas como nas culturas com dano de DNA induzido. É possível que a avaliação de BUDs seja mais eficiente na diferenciação dos grupos em função das diferenças no manejo dos checkpoints do ciclo celular. A mutação na proteína ATM pode favorecer o acúmulo de complexos de reparo de DNA no final do ciclo celular para os pacientes, seguidos pelos pais e pelos controles, refletindo nos resultados de BUDs. É possível também que o horário da exposição à radiação tenha favorecido a interação entre o DNA intersticial gerado (o que inclui fragmentos cromossômicos, cromossomos inteiros e ampliações gênicas) e as proteínas do envelope nuclear, levando ao encapsulamento desse material durante a reconstituição do envelope nuclear, gerando BUDs, ao invés de ser envolvido por uma membrana nuclear formando diretamente um MN.

O ensaio SCGE alcalino não forneceu índices significativamente diferentes entre os grupos, apesar de, espontaneamente, os pacientes apresentarem o maior índice de dano. Talvez em uma amostra maior seja possível detectar significância entre as diferenças de valores.

As lâminas irradiadas com 3 Gy revelaram uma resposta significativa e intensa para controles, pais e pacientes, porém, novamente sem diferença estatística entre os

grupos. É possível que doses inferiores de radiação apresentem melhor adaptação ao ensaio e, por isso, também deveriam ser testadas.

O acompanhamento da cinética de reparo, por sua vez, revelou desempenhos diferentes entre os grupos. Percebemos que, na primeira hora de reparo, os controles repararam o dano de maneira mais eficaz, seguidos pelo grupo de pais e pelo grupo de pacientes, respectivamente. Na segunda hora de reparo, os controles já não refletiam ação do sistema de reparo através da técnica, enquanto que os pacientes apresentaram uma cinética constante de reparo. O grupo de pais, por sua vez, teve um aumento no índice de dano na segunda hora. Esses resultados possibilitaram a suposição de que a mutação na proteína ATM garanta um atraso na resposta à exposição de 3 Gy, o que confere com as observações de White et al. (White, Choi et al. 2010), os quais afirmam que, apesar de existir um atraso no reparo de quebras de fita dupla nas células AT, o reparo e a posterior ativação da proteína ATR (responsável pelo reparo das quebras de fita única) acabam ocorrendo nessas células.

A avaliação da cinética de reparo considerando a proporção de cada classe de dano de DNA (classe 1, 2, 3 e 4) ao longo do ensaio (lâminas espontâneas, irradiadas, irradiadas com posterior reparo de 1h e irradiadas com posterior reparo de 2h), revelou que tanto os pacientes como os pais e controles reparam preferencialmente danos menores (de classe 1 a 3). Os cometas de classe 4 aparentemente são mais difíceis de reparar. A proporção dessa classe de dano entre os controles se manteve constante e aumentou nos grupos de pais e pacientes. Aparentemente a resposta apoptótica não ocorreu, ou talvez ela necessite um maior intervalo de tempo para ocorrer.

Os resultados obtidos com a pesquisa realizada favorecem a utilização do ensaio CBMN espontâneo e avaliação da cinética de reparo pela técnica SCGE dentro

da rotina de investigação de familiares e pacientes AT. Apesar de todos os conhecimentos acumulados em relação à síndrome, ainda fazem-se necessários mais esforços em pesquisas que garantam um diagnóstico apropriado e precoce, bem como a prevenção das doenças secundárias. A avaliação de diferentes dosagens de agentes indutores de dano de DNA dentro dos ensaios trabalhados também seria recomendável.

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Dano e reparo de DNA e índices de estresse oxidativo de indivíduos com ataxia-telangiectasia e de seus pais heterozigotos: relação com a variabilidade fenotípica dos pacientes.

I - Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo consiste em uma avaliação das alterações no material genético (DNA) de cada participante. Estas alterações ocorrem normalmente nas células em níveis bastante baixos, e são apontadas como responsáveis, entre outros efeitos, pelos processos de envelhecimento.

II - Procedimentos que serão utilizados:

Será feita uma coleta de 10 ml de sangue periférico com o propósito de avaliar a frequência de mutações através da técnica de micronúcleos (que avalia quebras cromossômicas e perdas do cromossomo inteiro) e da técnica do "cometa" (que acusa lesões menores do material genético). Além disso, serão avaliadas a atuação do sistema de reparo do DNA, a presença de alterações cromossômicas e alguns marcadores de estresse oxidativo.

III - Benefícios que se podem obter e procedimentos alternativos que podem ser vantajosos para os indivíduos estudados:

A realização deste estudo permitirá conhecer se o DNA dos pacientes tem mais alterações do que a média da população, podendo servir estes resultados como base para o entendimento dos efeitos do tratamento sobre o material genético dos pacientes.

Pelo presente Consentimento Pós-Infomação, declaro que fui informado de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;

- Da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade.

O Pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é Sharbel Weidner Maluf (fone: 3586-8800, R8938).

Data: ___/___/___.

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário:

Nome e assinatura do Responsável Legal, quando for o caso:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Anexo B – Questionário de Saúde Pessoal

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

(De acordo com modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) Mutation Research, 204:379-406,1988) (Carrano, 1988)

Este questionário, assim como o estudo a ele relacionado, deve ser de seu interesse. A participação é espontânea e constará destas informações gerais sobre saúde e dieta, mais uma coleta de sangue para estudo citogenético. O estudo consiste em uma avaliação de mutações nos cromossomos de cada participante. Mutações cromossômicas ocorrem normalmente nas células de todas as pessoas em nível bastante baixo, e são apontadas, entre outros efeitos, nos processos de envelhecimento e câncer.

Trabalhadores em atividades de risco (por exemplo, radiologia, quimioterapia, uso de óxido de etileno e outras), se não seguirem normas adequadas de segurança, podem aumentar a frequência de mutações cromossômicas em suas células. Este estudo poderá servir como sinal de alerta para prevenir e melhorar as condições de segurança. Caso não se encontrem diferenças entre trabalhadores de atividades de risco e outros de atividades diversas, poderemos concluir que os itens de segurança são efetivos neste aspecto. Isto servirá de estímulo para continuar tomando cuidados com a vida no local de trabalho.

Leia e responda cuidadosamente as seguintes questões. A informação dada por você não será associada com o seu nome, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores associados a este estudo. As respostas deste questionário poderão ter influência direta na interpretação de nossos resultados. Por isso, contamos com sua cooperação em fornecer informações corretas.

Obrigado pelo seu interesse.

1. Nome: _____

Data: ____/____/____

2. Para ser preenchido pelo pesquisador: Código n°: _____

Esta folha será destacada das demais do questionário e arquivada. Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se os espaços adicionais forem necessários para completar uma resposta, por favor, escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

Código n°: _____

HISTÓRIA PESSOAL

1. Data de hoje: _____
2. Qual a sua idade? (em anos) _____
3. Sexo: () Masculino () Feminino

HISTÓRIA OCUPACIONAL

4. Qual o seu local de trabalho?

5. Há quanto tempo você trabalha neste local?

6. Se há menos de dez anos, onde você trabalhou previamente e por quanto tempo?

7. Que tipo de trabalho você faz?

EXPOSIÇÃO

8. Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos, etc.) ou físicos (radiação) a que você se expôs nos últimos 10 anos em seu trabalho. Qual foi a frequência? Qual foi o período?

9. Liste os agentes químicos (agrotóxicos e outros que julgar necessário) ou físicos a que você se expôs nos últimos 10 anos fora de seu trabalho. Qual foi a frequência? Qual foi o período?

Código n°: _____

HISTÓRIA DE FUMO

10. Alguma vez você fumou? ()Sim ()Não

Se **não**, passe para a questão 11. Se **sim**, continue:

a) Quanto tempo você fumou? (em anos) _____

b) Você fuma atualmente? ()Sim ()Não

Quando parou de fumar? (mês e ano)

O que você fumava?

c) Você fuma cigarros? ()Sim ()Não

Se **sim**, quantas carteiras por dia? () Menos de ½ carteira

() ½ a 1 carteira

() Mais de 1 (quantas? _____)

Você fuma cigarros com filtro? ()Sim ()Não

Qual a sua marca usual? _____

d) Você fuma charutos? Quantos por dia? _____

e) Você fuma cachimbos? Quantos por dia? _____

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

11. Você tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico no último ano? (por exemplo, comprimidos para a pressão, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares, etc.)
()Sim ()Não

Se sim, por favor, indique:

TIPO DE MEDICAMENTO	DOSE	QUANTIDADE POR DIA	INÍCIO (MÊS)	TÉRMINO (MÊS)
------------------------	------	-----------------------	-----------------	------------------

12. Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano? (por exemplo, aspirina, anti-ácidos, anti-histaminas, sedativos ou outras drogas)

()Sim ()Não

Se sim, por favor, indique

TIPO DE MEDICAMENTO	DOSE	QUANTIDADE POR DIA	INÍCIO (MÊS)	TÉRMINO (MÊS)
---------------------	------	--------------------	--------------	---------------

13. Você teve ou tem alguma dessas doenças?

- | | |
|---------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Câncer | <input type="checkbox"/> Doença cardiovascular |
| <input type="checkbox"/> Hepatite | <input type="checkbox"/> Diabete |
| <input type="checkbox"/> Mononucleose | <input type="checkbox"/> Outras doenças importantes |
| <input type="checkbox"/> Herpes | |
| <input type="checkbox"/> AIDS | |
| <input type="checkbox"/> Meningite | |

Se sim, indique:

DOENÇA	PERÍODO	TRATAMENTO
--------	---------	------------

14. Você já passou por algum tratamento medicamentoso agressivo? (como quimioterápicos e anti-retrovirais)

15. Liste as vacinações que você recebeu no último ano (vacina e data)

16. Você já se submeteu a uma cirurgia? Qual? Quando?

DIETAS
(deve refletir apenas os hábitos frequentes)

21. Você come apenas vegetais? Sim Não

22. Comente sobre a sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc)

23. Você ingere alguma dessas bebidas? Qual a frequência?

() café _____

() chá _____

() chimarrão _____

24. Você bebe cerveja? () Sim () Não

() 1 – 6 garrafas por semana ou menos

() 7 – 12 garrafas por semana

() Mais de 12 garrafas por semana. Quantas? _____

25. Você bebe vinho? () Sim () Não

() 1 – 4 copos por semana

() 5 – 8 copos por semana

() 9 – 16 copos por semana

() Mais de 16 copos por semana. Quantos? _____

26. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

() Sim () Não

Se sim, qual ou quais? _____

Por favor, indique a sua média de consumo semanal:

() 1 – 4 copos por semana ou menos

() 5 – 8 copos por semana

() 9 – 16 copos por semana

() Mais de 16 copos por semana. Quantos? _____