

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

AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE DNA DANIFICADO EM USUÁRIOS DE CRACK

Thiago Aley Brites de Freitas

Orientadora: **Dr^a Sandra Leistner Segal**

Porto Alegre, Dezembro de 2012

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

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

AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE DNA DANIFICADO EM USUÁRIOS DE CRACK

Thiago Aley Brites de Freitas

Orientadora: **Prof^a. Dra. Sandra Leistner Segal**

Dissertação de Mestrado

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Dezembro de 2012

**Dedico este trabalho a todas as pessoas
que fizeram parte dele, tornando-o
possível.**

Agradecimentos

A Deus por proporcionar-me a vida, e o suporte para vivê-la

À Dra. Sandra Leistner Segal pela disponibilidade da orientação, pelo apoio e solicitude no decorrer do trabalho, oferecendo mais que uma oportunidade, a realização de um sonho.

Ao Dr. Sharbel Weidner Maluf por todas as oportunidades oferecidas até então, que começaram ainda no período de graduação, pela presença, dedicação, ensinamentos, paciência e principalmente pela amizade.

À Doutoranda e querida amiga Isabel Cristina Bandeira, que teve fundamental participação na elaboração desta dissertação, apoiando, incentivando.

À aluna Gisele Gomes de Andrade, por todo auxílio prestado na execução das atividades de bancada.

À Ms. Roberta Passos Palazzo, pelos ensinamentos das técnicas e todo o auxílio prestado e principalmente pela amizade.

Ao estatístico Luciano Guimarães, por toda a ajuda oferecida.

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

Aos meus amigos dos laboratórios de Biologia Molecular e Citogenética Clássica por toda a ajuda relacionada a essa pesquisa. A todos os funcionários e estudantes do Serviço de Genética Médica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela disposição a ajudar e esclarecer dúvidas que surgiram durante essa caminhada, procurando sempre auxiliar para que tudo fosse resolvido da forma mais eficiente possível.

Aos participantes do estudo, pela valorosa contribuição, não apenas pela disponibilização do material genético, mas pela paciência em responder aos questionários, sempre de forma interessada e amistosa.

À minha noiva Camila Pereira Andrade pela compreensão e paciência nos momentos de ausência.

A todos os meus amigos, por fazerem parte.

Às instituições de fomento a pesquisa: CNPq, Fapergs e Fipe-HCPA, pelo valioso apoio financeiro.

Lista de abreviaturas e siglas

CBMN cytokinesis-blocked micronucleus

MN micronúcleo

NPB nucleoplasmic bridges

BUD nuclear bud

SCGE single-cell gel electrophoresis

DNA ácido desoxirribonucléico

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração das etapas da técnica do cometa.....	19
Figura 2: Linfócitos processados pela técnica do cometa.....	20
Figura 3: Linfócitos processados pela técnica de micronúcleos.....	22

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1. Caracterização e Histórico.....	15
2. Dano de DNA.....	17
2.1. Técnicas para avaliação de dano de DNA.....	19
2.1.1. Ensaio Cometa.....	19
2.1.2. Teste de Micronúcleo.....	20
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo Principal.....	23
4.2. Objetivos Secundários.....	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
6. MANUSCRITO.....	31
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	51
8. ANEXOS.....	53
8.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo teste).....	53
8.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle).....	55
8.3. Questionário de Saúde Pessoal.....	57

RESUMO

O crack é um subproduto da cocaína obtido a partir da pasta de coca acrescida do bicarbonato de sódio, sendo comercializado na forma de pequenas pedras porosas.

No Brasil, o consumo de crack tem sido alvo de grande preocupação devido sua expressiva expansão em várias regiões, sendo que o aumento da prevalência do seu consumo vem sendo amplamente documentado nos últimos anos. A dependência de crack é a causa mais prevalente de internação por uso de cocaína. Há uma necessidade imediata de estudos que se direcionem para esta população.

A presente pesquisa pretende demonstrar evidências capazes de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação do psicotrópico crack sobre o DNA, bem como oferecer dados que auxiliem no desenvolvimento de tratamentos para pacientes usuários abusivos desta droga.

Este estudo teve como objetivo avaliar o dano ao DNA e a capacidade de reparo, em 31 indivíduos usuários ativos de crack, relacionando-os com um grupo controle com 40 participantes. O trabalho foi desenvolvido através de voluntários recém internados na Clínica Marcelo Campos em São Leopoldo. Foram coletadas amostras em três momentos (internação, 48h após e ao término do tratamento) e submetidas às técnicas de micronúcleo e cometa. Dentre os resultados desta avaliação, foram evidenciados índices de dano significativamente diferentes entre os grupos nas técnicas de micronúcleos e cometa, e entre os períodos de coleta na técnica de cometa. Os valores obtidos para o índice de dano de DNA da técnica do cometa nos três momentos de avaliação revelaram uma diminuição estatisticamente significativa apenas após o término do tratamento.

Em relação à utilização concomitante de outras substâncias, o consumo de tabaco ocorreu em 68% dos indivíduos, maconha em 71% e cocaína em 32%, sendo que 19% faziam uso concomitante de todas as drogas mencionadas. Houve correlação com o tempo de uso do tabaco e o índice de dano ($P=0,043$), MN ($P=0,017$) e NBP ($P=0,023$) em determinados momentos. O consumo de álcool ocorreu em 61,29% dos participantes, não havendo correlação estatisticamente significativa com os marcadores de dano. A idade e o tempo de utilização do crack não apresentaram associação ao índice de dano. Houve associação significativa entre o consumo de chimarrão (*Ilex paraguayensis*) e MN ($P= 0,045$). Estudos associando o crack com dano ao DNA são, ainda, escassos. Este trabalho buscou acrescentar informações quanto ao potencial danoso desta substância.

Palavras-chave: Usuários de Crack, Dano de DNA, Ensaio Cometa, Técnica de Micronúcleos.

ABSTRACT

Crack is a by-product of cocaine resulting from the addition of sodium bicarbonate to cocaine base paste, being sold in the form of small, porous rocks.

In Brazil, the consumption of crack has been the subject of great concern due to its significant expansion in various regions, thus the increasing prevalence of drug use has been documented in recent years. The dependence of crack is the most prevalent cause of hospitalization due to cocaine use, supporting an immediate need for studies to target this population.

This research aims to demonstrate evidence that can contribute to the understanding of the mechanisms involved in the action of psychotropic Crack on DNA, as well as provide data to assist in development of treatments for patients who are drug abusers.

This study aimed to assess the damage and DNA repair capacity in 31 individuals who are active users of crack, comparing them to a control group of 40 participants. The study was conducted by volunteers newly admitted to the Clinic Marcelo Campos in São Leopoldo. Samples were collected at three time points (at admission, 48 hours latter and at the end of treatment) and subjected to the comet and micronucleus techniques. Among the results of this assessment damage indices were evident and significantly different between groups in the comet and micronucleus techniques, and between sampling periods for the comet technique.

The values obtained for the rate of DNA damage in the comet technique in all three time points revealed a statistically significant decrease only after the end of treatment. Regarding the concomitant use of other substances, no significant association was found with the results. Tobacco consumption occurred in 68% of

subjects, marijuana in 71% and cocaine in 32%, being 19% users of all drugs mentioned. There was a correlation over time of tobacco use and the damage index ($P = 0.043$), MN ($P = 0.017$) and NBP ($P = 0.023$) at certain time points.. Alcohol consumption occurred in 61.29% of the participants, there was no statistically significant correlation with markers of damage. The age and duration of use were not associated to the crack damage index. There was a significant association between the consumption of yerba mate (*Ilex paraguayensis*) and MN. ($P = 0.045$). Studies associating the crack with DNA damage are still scarce. This study brings additional information about the potential harmful of substance.

Keywords: Crack users, DNA damage, Comet Assay, Micronucleus test

INTRODUÇÃO

O crack é uma droga em rápido aumento de consumo em todo o mundo; é considerada extremamente nociva e com alto poder para causar dependência rapidamente. Inicialmente consumida por camadas mais pobres da população, atualmente, tem seu uso difundido nas classes média e alta. Como ainda é uma substância relativamente recente, seus potenciais danos são muito descritos em termos de saúde geral do indivíduo e impacto socioeconômico. Contudo, pouco é sabido de potenciais danos do crack a aspectos mais específicos, em nível celular.

Assim, o presente projeto propõe-se a estudar os possíveis níveis de dano ao DNA nos leucócitos de usuários de crack e acompanhar esses níveis durante o tratamento em uma clínica de reabilitação. Trata-se de um estudo original, ainda não realizado, nesta população estudada.

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. Segundo KESSLER, (2008), fica evidente tanto para a comunidade científica quanto para a leiga brasileira que o crack é uma droga de grande impacto, representando mais do que um dano específico ao organismo do indivíduo. No momento atual, uma das questões centrais discutidas no país é a prevalência de seu consumo. Os principais estudos nessa área foram realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, sendo que apenas nos últimos levantamentos o uso de crack foi relacionado, corroborando estudos pontuais que sugerem haver realmente um aumento no seu consumo.

A realização deste estudo permitirá conhecer se o DNA de usuários tem mais alterações do que a média da população, podendo estes resultados servir como base para a prevenção de efeitos danosos sobre a saúde.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Caracterização e Histórico

A cocaína é um estimulante do sistema nervoso central, extraída das folhas da planta *Erythroxylon coca* (Ribeiro-Araújo et al., 1998 apud Duailibi et al., 2008). Pode ser consumida sob a forma de cloridrato de cocaína, um sal hidrossolúvel, de uso aspirado ou injetado. Há ainda as apresentações alcalinas, voláteis a baixas temperaturas, que podem ser fumadas em “cachimbos”, como é o caso do crack, da merla e da pasta básica da cocaína (Benowitz, 1992). O crack é um subproduto da cocaína que é obtido a partir da pasta de coca acrescida do bicarbonato de sódio, sendo comercializado na forma de pequenas pedras porosas (Nassif Filho, 1999).

Na transição para os anos 80, a cocaína entrou num contexto no qual se tornara a principal atração. Menos de dez anos depois, o consumo do crack já era maior do que o da cocaína. Essa apresentação, ao contrário da anterior, disseminou-se especialmente em locais socialmente excluídos, tendo os meninos de rua e os usuários de drogas injetáveis seus principais adeptos (Jonnes, 1996; Nappo et. al, 1994). O crack surgiu no Peru na década de 1970, mas veio para os Estados Unidos em meados de 1985 (Washton et al, 1986), no Canadá em 1986 (Smart, 1988) e nos países europeus, um pouco mais tarde (Strang et al., 1990). Desta forma, a partir 1987, o uso da cocaína vem aumentando em todo o mundo, principalmente na forma de pedra, o crack (Das, 1993). No Brasil temos na cidade de São Paulo, o primeiro relato do uso de crack fazendo referência ao ano de 1989 (Dunn et al., 1996).

Em meados dos anos 90, os usuários de cocaína e crack passaram a ser o grupo de usuários de drogas ilícitas que mais procuravam tratamento nos ambulatórios

e serviços de internação para dependência de substâncias psicoativas (Dunn et al., 1996). Existe atualmente no Brasil uma preocupação em estudar o perfil da população usuária de crack que acessa os serviços de saúde (Ferreira Filho et al., 2003).

Estudos que se direcionem a esta população são importantes, pois se observa o aumento da procura por tratamento dos usuários de crack em suas diversas modalidades, inclusive internação para desintoxicação dessa substância (Ferri, 1997 et al.; Parry et al.; Schifano et al., 2008; Borini et al., 2003).

O crack apresenta efeitos como: excitação, hiperatividade, insônia, muita perda de peso, cansaço, intensa depressão, irritabilidade, comportamento violento, tremores, atitudes bizarras, paranóia, alucinações e delírios e com o uso contínuo perda do interesse sexual. Cabe ressaltar outros efeitos, como por exemplo, “visão borrada”, dor precordial, hipertensão, taquicardia, contrações musculares, rabdomiólise, convulsões e até coma e morte (CEBRID, 2009). Em comparação à cocaína, os sinais e sintomas causados pelo crack são mais intensos e de curta duração (Hartnoll et al., 1987; Jaffe, 1990).

No Brasil, em função dos inúmeros pontos de distribuição e venda de crack, sua composição química exata ainda é desconhecida, de tal forma que interações imprevisíveis podem colocar a vida do usuário em risco, o que o torna um problema de saúde pública relevante (Oliveira et al., 2008). O início precoce de uso de qualquer substância e, em particular, do crack, estão relacionados com pior prognóstico em tratamento ambulatorial para pacientes na adolescência (Scivoletto, 1998).

Estudos realizados no estado do Rio Grande do Sul demonstram que 80% dos usuários de crack relataram início do uso da substância entre 16 e 26 anos, sugerindo

a necessidade de abordagem do problema desde a adolescência (Guimaraes et al., 2008).

A magnitude de violência homicida atinge com maior incidência a faixa etária entre 15 e 24 anos e avança nas regiões metropolitanas como a de Porto Alegre (RS), onde observa-se que, tanto adolescentes, quanto adultos jovens representam uma população exposta ao risco de morte por homicídios, pois o uso do crack levou a roubos, atos de violência e ao endividamento dos usuários com os traficantes (CHESNAIS, 1999). No Brasil, a despeito de todos os esforços empregados para o seu controle, no período de 2001 a 2005, ocorreu um aumento do uso de crack pela população geral (CEBRID, 2007), especialmente nas regiões Sudeste e Sul, com expressivo aumento na cidade de Porto Alegre (Inciardi et al., 2009).

2 Dano de DNA

Um estudo investigativo dos possíveis efeitos tóxicos da cocaína e crack, sobre o DNA contido no macronúcleo do protozoário *Tetrahymena pyriformis*, mostra que tanto a cocaína, quanto o crack, afetam significativamente o conteúdo de DNA, quando comparados as culturas controle. E sugerem, pelo resultado observado, que o crack é muito mais potente e rápido na ação, do que a cocaína (Stefanidou et al., 2001). Neste mesmo estudo foi observada a supressão da fagocitose no protozoário, correlacionando com outros achados em que a cocaína altera a função das células *natural killer*, células T e neutrófilos, e inibe a atividade fagocítica de macrófagos. Este efeito supressivo pode contribuir para o comprometimento da imunidade de tóxico-dependentes (Pirozhkov et al., 1992; Ou et al, 1989).

Correlacionando o dano de DNA com outras drogadições, há na literatura trabalhos que relatam um aumento significativo no dano oxidativo ao DNA em leucócitos de indivíduos expostos à fumaça ambiental do tabaco e uma correlação entre o dano de DNA e da exposição ao tabaco, medido pelos níveis de cotinina no plasma (Howard et al., 1998; Lodovici et al., 2005). Pesquisas de micronúcleos na mucosa esofágica de fumantes e ex-fumantes comparado com grupos controles mostraram que a frequência de micronúcleos foi significativamente maior entre fumantes e ex-fumantes (Dietz et al., 2000).

O potencial do fumo de *cannabis* para causar dano ao DNA foi testado e, na maioria dos trabalhos, não foi demonstrado (Wickelgren, 1997; Linszen et al., 1994). Contrapondo a estes, um estudo publicado na *Chemical Research in Toxicology* fornece evidências para o potencial de danificar o DNA com fumo de *cannabis* e sugere que o consumo de cigarros de *cannabis* pode ser prejudicial para a saúde humana com a possibilidade de iniciar o desenvolvimento de câncer (Singh, 2009). Sherman (1997), observou níveis mais elevados de danos no DNA em forma de rupturas da fita simples, detectados em macrófagos alveolares humanos obtidos a partir de fumantes de *cannabis*, em comparação aos não-fumantes através da análise por fluorescência das quebras de fitas simples de DNA, conforme descrito por Jevcak e Bimboim (1993)

2.1 Técnicas para Avaliação de dano de DNA

2.1.1 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, Erdtmann B, 2003).

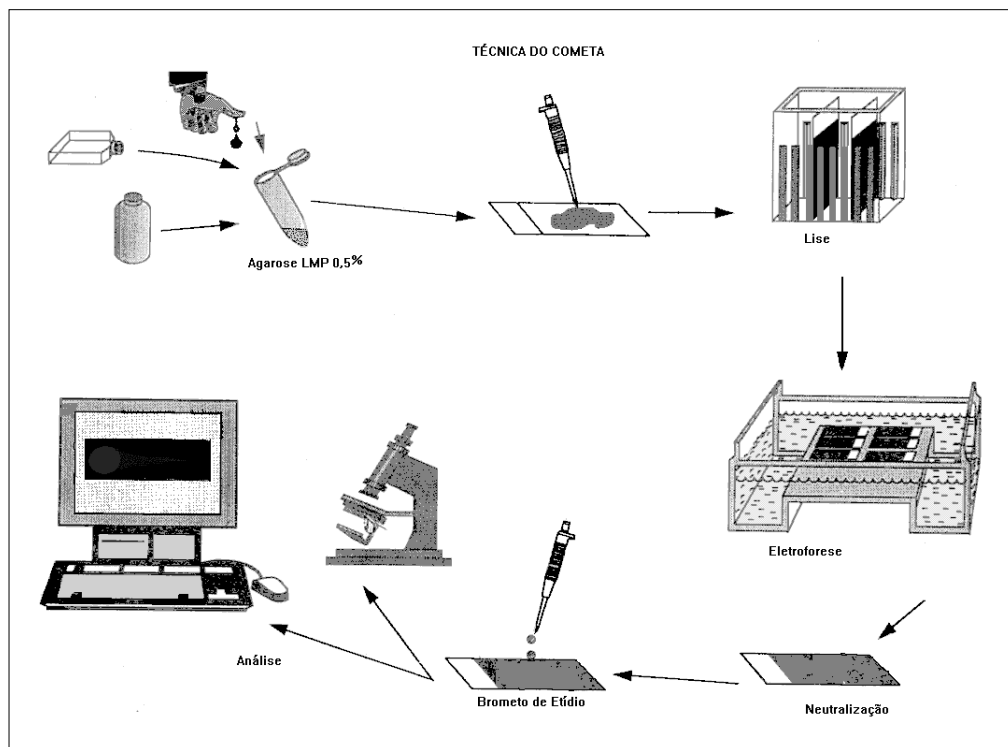


Figura 1: ilustração das etapas da técnica do cometa (adaptado de Speit, exposição oral, 1998 apud Palazzo, 2010).

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). 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).

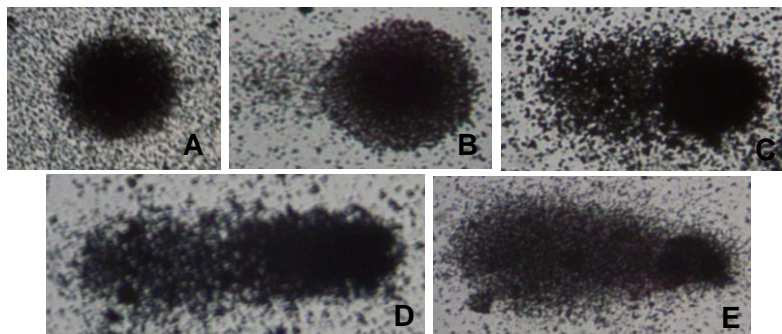


Figura 2: linfócitos processados pela técnica do cometa. (A) classe 0, (B) classe 1, (C) classe 2, (D) classe 3, (E) classe 4 (Palazzo, 2010).

2.1.2 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 Countryman 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 (Schmid 1975; Countryman and Heddle 1976).

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. 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 (NPB – *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 ampliações de DNA encontradas na periferia nuclear (Fenech and Crott 2002).

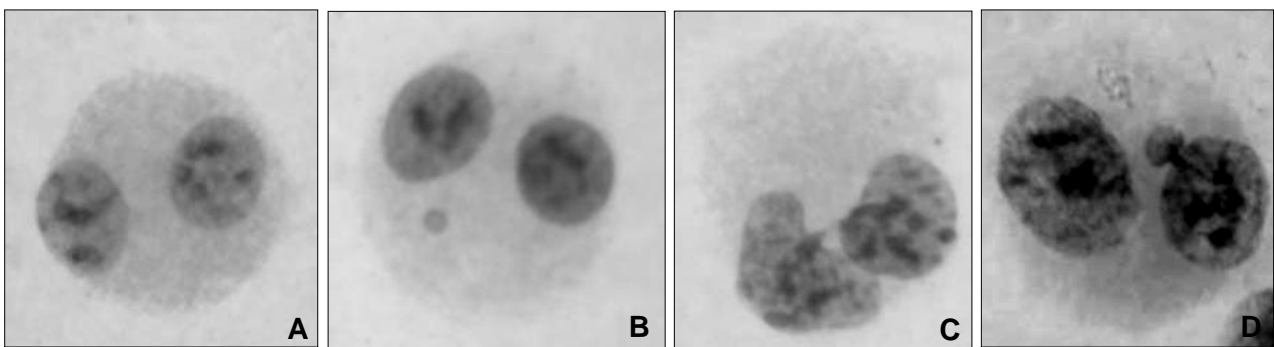


Figura 3: linfócitos processados pela técnica de micronúcleos. (A) linfócito binucleado normal, (B) linfócito binucleado com micronúcleo, (C) linfócito binucleado com ponte nucleoplasmática, (D) linfócito binucleado com BUD (Palazzo, 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Primário

Avaliar os índices de dano de DNA, através das Técnicas de Micronúcleos e do Ensaio Cometa em usuários ativos de crack em vários momentos a partir da internação em uma clínica de reabilitação e em um grupo controle.

4.2 Objetivos Secundários

1- Comparar a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e “buds” nucleares em usuários ativos de crack no momento da internação em uma clínica de reabilitação com um grupo controle.

2- Comparar os índices de dano de DNA, medidos através da Técnica do Cometa em usuários ativos de crack no momento da internação em uma clínica de reabilitação com um grupo controle.

3- Avaliar o efeito do programa de reabilitação através da análise dos índices de dano de DNA no momento da internação e no final do tratamento, utilizando-se as técnicas de Micronúcleos e Cometa, em usuários ativos de crack, recém internados em uma clínica para reabilitação.

4- Avaliar o efeito da ação do sistema de reparo de DNA, após a internação na clínica de reabilitação, através da análise dos índices de dano de DNA do Ensaio Cometa, no momento da internação, 48 horas depois de encerrar o uso da droga e no final do tratamento.

5- Correlacionar cada um dos marcadores de dano de DNA entre eles e com outros fatores, como idade, consumo de chimarrão, tabagismo, consumo de álcool, e de outras drogas ilícitas, assim como o tempo de consumo destas substâncias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benowitz NL (1992), How toxic is cocaine? In: Ciba Foundation. Cocaine: scientific and social dimensions. Chichester: John Wiley & Sons. *Ciba Found Symp.* 166:125-43; discussion 143-8.

Borini P, Guimarães RC and Borini SB (2003). Usuários de drogas ilícitas internados em hospital psiquiátrico: padrões de uso e aspectos demográficos e epidemiológicos. *J Bras Psiquiatr.* 52(3):171-9.

Carrano AV, Natarajan AT (1998). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens ICPEMC publication n. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research* 204(3):379-406.

Cauntryman, PJ.; heddle, JA (1976). The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research.* 67:321-332.

CEBRID (2009). Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas Departamento de Psicobiologia – UNIFESP. *Boletim Cebriid.* Número 61 Janeiro/Fevereiro/Março.

CEBRID (2007). II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo: *Cebriid* – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas e Unifesp – Universidade Federal de São Paulo.

Chesnais JC (1999). A violência no Brasil: causas e recomendações políticas para a sua prevenção. *Ciênc. Saúde Coletiva.* 4(1):53-69.

Das G (1993). Cocaine abuse in North America: a milestone in history. *J Clin Pharmacol.* 33:296-310.

Dunn J, Laranjeira R, Silveira DX, Formigoni MLOS and Ferri CP (1996). Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990-1993. *Subst Use Misuse.* 31(4): 519-27.

Fenech M, Morley AA (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research.* 147:29-36.

Fenech, M.; Crott, JW (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. *Mutation Research.* 504:131-136.

Ferreira Filho OF, Turchi MD, Laranjeira R and Castelo A (2003). Perfil sociodemográfico e padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados. *Rev. Saúde Pública.* 37(6):751-9.

Ferri CP, Laranjeira RR, Da Silveira DX, Dunn J and Formigoni MLOS (1997). Aumento da procura de tratamento por usuários de crack em dois ambulatórios na cidade de São Paulo, nos anos de 1990 a 1993. *Rev Ass Med Bras.* 43(1):25-8.

Garcia O, Mandina T, Lamadrid AL, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y et al (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res.* 556:25-34.

Guimaraes CF et al. (2008) . Perfil do usuário de crack e fatores relacionados à criminalidade em unidade de internação para desintoxicação no Hospital Psiquiátrico

São Pedro de Porto Alegre (RS). *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul*, Porto Alegre, v. 30, n. 2, ago.

Guindalini C. *et al.* (2006) Concurrent crack and powder cocaine users from São Paulo: do they represent a different group? *BMC Public Health*. 6:10.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V and Tice RR (2003). 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 18:45-51.

Hartnoll R, Daviaud E and Power R (1987). "Drug Use and Misuse: A Reader." Ed. by Heller T, Gott M e Jaffery C (1987). Wiley And Sons, Ltd.; *Chichester*, p. 13-18.

Heddle, JA (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*. 18: 187–190.

Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M and Pritsos CA (1998). Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 7:981–988.

Inciardi JA, Surratt HL, Pechansky F, Kessler F, Von Diemen L and Da Silva EM *et al* (2006). Changing patterns of cocaine use and HIV risks in the south of Brazil. *J. Psychoactive Drugs*. 38(3):305-10.

Jaffe JH (1990). "Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edn," New York, *Pergamon Press*. p. 539-545.

Jonnes J (1996). High on cocaine. In: Jonnes J. Hep-cats, narcs and pipe dreams – a history of America's romance with illegal drugs. New York: *Scribner*.

Kessler F and Pechansky F (2008). Uma visão psiquiátrica sobre o fenômeno do crack na atualidade. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul*, Porto Alegre, v. 30, n. 2, Ago..

Linszen DH, Dingemans PM and Lenior ME (1994). Cannabis abuse and the course of recent-onset schizophrenic disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 51: 273–279.

Lodovici M, Caldini S, Luceri C, Bambi F, Boddi V and Dolara P (2005). Active and passive smoking and lifestyle determinants of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human leukocyte DNA. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:2975–2977.

Maluf SW and Rdtmann B (2000). 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. *Mutation Research.* 471:21-27.

Maluf SW and Erdtmann B (2003). Biomonotorização do dano genético em humanos in: Silva J, Erdtmann B and Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. 1ed. Porto Alegre: *Alcance*.

Moller P, Knudsen LE, Loft S and Wallin H (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:1005-15.

Nadin SB, Vargas-Roig LM and Ciocca DRA (2001). The silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 49:1183-1186.

Nappo SA, Galduróz JC and Noto AR (1994). Uso do “crack” em São Paulo: fenômeno emergente? *Rev ABP-APAL.* 16 (2): 75-83.

Nassif Filho ACN, Bettega SG, Lunedo S, Maestri JE and Gortz F (1999).

Repercussões otorrinolaringológicas do abuso de cocaína e/ou crack em dependentes de drogas. *Rev Ass Med Brasil* 45(3): 237-41.

Oliveira LG and Nappo AS (2008). Crack na cidade de São Paulo: acessibilidade, estratégias de mercado e formas de uso. *Rev. Psiquiatr. Clín.*, São Paulo, v. 35, n.6.

Ou WD, Shen ML and Luo YD (1989). *Clinical Immunol. Immunopathol.* 52: 305—312.

Palazzo RP. Dano e reparo de dna em indivíduos com ataxia-telangiectasia e em seus pais heterozigotos. Dez. 2010. 60 fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre 2010.

Parry CDH, Plüddemann A and Myers BJ (2007). Cocaine treatment admissions at three sentinel sites in South Africa (1997-2006): findings and implications for policy, practice and research. *Subst. Abuse Treat Prev. Policy.* 2:37.

Pirozhkov SV, Watson RR and Chen GJ (1992). Ethanol enhances immunosuppression induced by cocaine. *Alcohol.* 9:489-494.

Ribeiro-Araújo M, Laranjeira R and Dunn J (1998). Cocaína: bases biológicas da administração, abstinência e tratamento. *J. Bras. Psiquiatria.* 47(10): 497-511.

Schifano F and Corkery J (2008). Cocaine/crack cocaine consumption, treatment demand, seizures, related offences, prices, average purity levels and deaths in the UK (1990 - 2004). *J Psychopharmacol.* 22(1):71-9.

Schmid, W. The micronucleus test. *Mutation Research.* 31:9-15, 1975. Scivoletto S (1998). Tratamento psiquiátrico ambulatorial de adolescentes usuários de drogas; *Rev. Psiq. Clin.* 25 (4): 191.

Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Simmons MS, Roth MD And Tashkin DP

(1997). Effects of smoking marijuana, tobacco or cocaine alone or in combination on DNA damage in human alveolar macrophages. *Life Sci.* 56: 2201–2207. Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM and Ignarro LJ (1993) *B&hem. Biophys. Res. Commun.* U: 1301-1308.

Singh NP, Mccoy MT, Tice RR and Schneider EL (1998). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 175:184-191.

Singh R (2009). Evaluation of the DNA Damaging Potential of Cannabis Cigarette Smoke by the Determination of Acetaldehyde Derived N2-Ethyl-2'-deoxyguanosine Adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 22:1181–1188.

Smart RG (1988). Crack cocaine use in Canada: A new perspective? *American Journal of Epidemiology* 127:1315-1317.

Stefanidou M, Chatziioannou A, Livaditou A, Rellaki A, Aleviopoulos G, Spiliopoulou H and Koutselinis A (2002). DNA Toxicity of Cocaine Hydrochloride and Cocaine Freebase by Means of DNA Image Analysis on *Tetrahymena pyriformis*. *Biol Pharm Bull.* Mar;25(3):332-4.

Strang J, Griffiths P and Gossop M (1990). Crack and cocaine use in south London drug addicts: 1987-1990. *British Journal of Addiction.* 85:193-196.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 35:206-221.

Tucker JD, preston RJ (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*. 365(1-3):147-519.

Umegaki K, fenech M (2000). Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosome damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15(3):261-269.

Washton AM, Gold MS and Pottash AC (1986). Crack: Early report on a new drug epidemic. *Postgrad Med*. 80: 52-58.

Wickelgren I (1997). Marijuana: Harder than thought. *Science*. 276:1967–1968.

8. MANUSCRITO 1 – VERSÃO PRELIMINAR

(será submetido ao periódico *Toxicological Sciences*)

DNA DAMAGE MARKERS IN MALE USERS OF CRACK COCAINE: IMPACT OF A REHABILITATION PROGRAM

Thiago Aley Brites de Freitas^{a,b}, Roberta Passos Palazzo^b, Fabiana Michelsen de Andrade^c, César Luis Reichert^c, Flávio Pechansky^{a,b}, Félix Kessler^b, Gisele Gomes de Andrade^b, Sandra Leistner-Segal^{a,b}, Sharbel Weidner Maluf^{b*}.

^a *Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Medical Genetics Service, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, CEP 90035-903, 2350 Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Health Science Institute, Feevale University, RS 239, CEP 93352-000, 2755 Novo Hamburgo, RS, Brazil*

Corresponding author:

Sandra Leistner-Segal

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Phone number: 51-33598011

Fax: 51-33598010

ABSTRACT

Crack is a by-product of cocaine that, among many effects, can cause hypertension, tachycardia, muscle twitching, convulsions and even coma and death. In this study, 31 active users of crack cocaine recently admitted for treatment at a drug rehabilitation centre and 40 control subjects were evaluated. DNA damage was measured in peripheral blood using the comet assay on three occasions: at admission, 48 hours later and at the end of treatment. For the micronucleus (MN) technique, tests were performed only at admission and at the end of treatment. Comparison between controls and crack cocaine users showed significant differences in the rates of DNA damage ($P = 0.037$), the frequency of MN ($p < 0.001$) and nuclear buds (NBUDs) ($p < 0.001$) but not in the frequency of nucleoplasmic bridges (NPBs) ($P = 0.089$). Rates of DNA damage quantified with the comet assay at all three time points revealed statistically significant values only after the end of treatment ($P < 0.001$), which may indicate both effective action of the repair system and, as far as possible, elimination of damaged cells. The frequency of MN and NPBs calculated during the first assay did not differ from frequencies obtained after treatment, indicating that the detoxification period was not long enough to decrease the frequency of already established mutations. The results of this study reveal the genotoxic and mutagenic effects of crack cocaine use and pave the way for further research to investigate cellular responses and the possible consequences of DNA damage, such as induction of irreversible neurological disease and neoplasms.

KEYWORDS: Crack cocaine, drug rehabilitation, DNA damage, comet assay, CBMN.

INTRODUCTION

Cocaine is a central nervous system stimulant extracted from the leaves of *Erythroxylum coca* (Ribeiro-Araújo et al., 1998 apud Duailibi et al., 2008). Crack cocaine, or simply crack, is a by-product resulting from the addition of sodium bicarbonate to cocaine base paste. Crack cocaine is sold in the form of small, porous rocks (Nassif Filho, et al., 1999), and its effects include euphoria, hyperactivity, insomnia, marked weight loss, fatigue, profound depression, irritability, violent behaviour, tremors, bizarre actions, paranoia, hallucinations, delirium and, with continued use, loss of sex drive. Further effects include blurred vision, precordial pain, hypertension, tachycardia, muscle twitching, rhabdomyolysis, convulsions, and even coma and death (Cebrid, 2009). The effects of crack are more intense and shorter in duration than those of cocaine (Hartnoll et al., 1987; Jaffe, 1980).

An experimental study on the potential toxic effects of cocaine hydrochloride and freebase cocaine (crack) on macronucleus DNA in the protozoan *Tetrahymena pyriformis* showed that both forms of cocaine have a significant effect on DNA content, with the action of crack being much more potent and rapid than that of cocaine hydrochloride (Stefanidou, 2001). Very few studies have assessed the potential effects of crack cocaine at the cellular level.

In the present study, we assessed genome instability by means of the comet assay and the cytokinesis-block micronucleus technique (CBMN) in crack cocaine users at the time of admission to a rehabilitation clinic and in healthy, non-user controls. This initial assessment was followed by evaluation during and at the end of treatment to investigate the mechanisms of action and potential consequences of crack cocaine use, as well as the frequency of several forms of DNA damage after cessation of crack use.

MATERIALS AND METHODS

Population

The study sample comprised 31 male active users of crack cocaine, between the ages of 18 and 45, recently admitted for treatment at the Centro de Reabilitação para Dependentes Químicos Marcelo Campos drug rehabilitation centre in São Leopoldo, state of Rio Grande do Sul, Brazil, and a control group of 49 participants matched by age, sex, and habits. Mean age was 26.12 ± 6.19 years in the test group and 29.91 ± 9.135 in the control group. Table 1 describes the sample profile. Six subjects (19%) were, simultaneously, users of cannabis, cocaine, and tobacco. Most tobacco users (81%) smoked 15–20 cigarettes per day.

Table 1. Sample profile.

	Crack cocaine users	Controls
N*	31	49
Age	26.13 ± 6.190	29.91 ± 9.135
Cocaine use	10 (32.3%)	0 (0%)
Cannabis use	22 (71%)	0 (0%)
Tobacco use	21 (67.7%)	14 (28%)
Alcohol intake	19 (61.29 %)	22 (44.9%)
<i>Ilex paraguariensis</i> infusion	13 (41,94%)	31 (63,26)

*All subjects (test and control) were male as crack consumption is more prevalent amongst this gender.

Overall, 71% of subjects in the test group were cannabis users. Duration of cannabis use ranged from 2 to 20 years. Non-freebase cocaine was used by 32.3% of subjects. The longest history of cocaine use was 17 years.

Each participant underwent collection of 4 mL peripheral blood into heparinised tubes at three points in time: on admission, 48 hours after admission, and at the end of the treatment period (21 to 30 days after admission), for assessment of DNA damage by means of the comet and micronucleus assays. For the first collection, 31 subjects were allocated to the comet assay and 29 to the micronucleus assay. For the second collection, the number of subjects was 31 users, with no sampling losses, and for the third collection, the number of subjects was 23 for the comet assay and 21 for the micronucleus assay. Sampling loss occurred during the micronucleus assay at the first and third points of collection due to unsatisfactory growth of some cultures. Furthermore, by the third point of collection, some subjects in the user group had been released from rehabilitation early and others declined collection, which reduced the sample size for both techniques. Forty volunteers (students from the Federal University of Rio Grande do Sul) were used as the control group. Before collection, all subjects voluntarily provided written informed consent for participation and were given a copy of the consent form, signed by the principal investigator, which contained an overview of the study. Subjects were then administered a personal health questionnaire that contained items on drug use and exposure to other potentially genotoxic agents.

All subjects were approached with the aid of a multidisciplinary team of clinic staffers, and all underwent psychiatric assessment for evaluation of cognitive functions. Subjects who were deemed unfit to provide informed consent for study participation were excluded.

Micronucleus assay

Blood samples were cultured in 5 mL RPMI 1640 medium supplemented with 20% foetal bovine serum and 0.2% phytohaemagglutinin per 0.5 mL sample. Culture vials were incubated at 37°C for 44 h, followed by addition of 4.5 g/mL cytochalasin B (Cyt B, Sigma), using the method described by Fenech and Morley in 1985 and revised by Fenech and Crott in 2002.

The cell suspension was fixated in a 3:1 solution of methanol in acetic acid, after standing in hypotonic KCl, and pipetted onto clean slides, which were then stained by the Giemsa method. The frequency of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) was scored in 2000 binucleated lymphocytes per individual (Maluf et al., 2009).

Comet assay

The comet assay protocol was as described by Singh *et al.* (1998). The assay itself was carried out as described for *in vivo* samples (Tice et al., 2000, Hartmann et al., 2003). Blood samples are mixed with low-melting point agarose, spread onto agarose-precoated slides, gently covered with cover slips and placed in a cold tray. Once samples have solidified, cover slips are removed and the slides left to stand in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, to which 1% Triton X-100 and 10% DMSO are added) for 1 or 2 days, under refrigeration. Excess fluid is removed from each slide and all slides are placed in an electrophoresis tank, to which a basic solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) is added. Slides are left to stand in this solution for 20 min to enable unwinding of DNA and expression of alkali-labile sites and single-strand breaks. Electrophoresis is then run for 20 min at 25 V, 300 mA, and 0.9 V/cm. Slides are removed from the electrophoresis tank, washed three times in

neutralising solution (0.4 M Tris, pH 7.5), rinsed three times with distilled water and left to dry at room temperature. All procedures subsequent to blood collection are carried out so as to prevent interference from light. Slides are then fixated and silver-stained as per Nadin *et al.* (2001). For assessment of DNA damage, 100 cells per sample are examined under light microscopy (x200 magnification). Cells are scored on a scale of 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail intensity (dimensions and shape). Therefore, the total sum of damage scores for a sample of 100 cells (the damage index, or D) ranges from 0 (no migration in any cell) to 400 (maximal migration in all cells). Patient and control slides are processed and analysed together (Maluf et al, 2007; Bagatini et al 2008).

Statistical analysis

Data were analysed in SPSS 18.0.0, using the Generalized Estimating Equations (GEE) module for comparison between groups and experimental points. The GEE settings were distribution = binomial, link = probit, and working correlation matrix = unstructured for the micronucleus assay and distribution = gamma, link = log, and working correlation matrix = unstructured for the comet assay. Bonferroni correction was employed. The Mann–Whitney U test and Spearman rank correlation were used for comparison of simple parameters such as age and duration of substance use. The significance level was set at 5%.

RESULTS

Comparison of comet assay results in the control group and the test group at all three points of assessment showed a significant difference in DNA damage index scores ($P=0.037$). Individual comparisons between the control group and the test group at time points 1 and 2 also revealed significant differences ($p<0.001$, $p=0.020$), whereas comparison between controls and crack cocaine users at time point 3 showed no such differences ($p=0.185$). Subjects in the test group also had statistically higher frequencies of MN ($p<0.001$) and NBUDs ($p<0.001$), but not of NPBs, than the control group at time points 1 and 3 (Table 2).

Table 2: Frequency of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) and DNA damage scores (comet assay) in samples collected at admission (Time point 1), 48h later (Time point 2), and at the end of treatment (Time point 3).

	Controls	Time point 1	Time point 2	Time point 3
Comet	13.05 ± 11.79 (N=40)	29.81 ± 19.34 * $p<0.001$ (N=31)	22.29 ± 19.95 * $p=0.020$ (N=31)	10.39 ± 8.95 *** $p=0.004$ ** $p<0.001$ (N=23)
MN	2.62 ± 2.26 (N=29)	7.67 ± 4.92 * $P<0.001$ (N=29)	-	7.90 ± 3.32 * $p<0.001$ (N=21)
NPBs	0.76 ± 1.70 (N=29)	1.51 ± 1.52 (N=29)	-	1.95 ± 2.87 (N=21)
Buds	1.59 ± 1.88 (N=29)	6.27 ± 4.24 * $p<0.001$ (N=29)	-	16.86 ± 27.56 ** $p=0.009$ (N=21)

Statistically significant differences: *versus the control group; **versus time point 1;

***versus time point 2.

There were significant differences between DNA damage index scores obtained with the comet assay at each of the time points of assessment ($P < 0.001$). Individual comparisons revealed that the difference was attributable to values at time point 3, as there were no significant differences between values at time points 2 and 1 (Table 2, Figure 1).

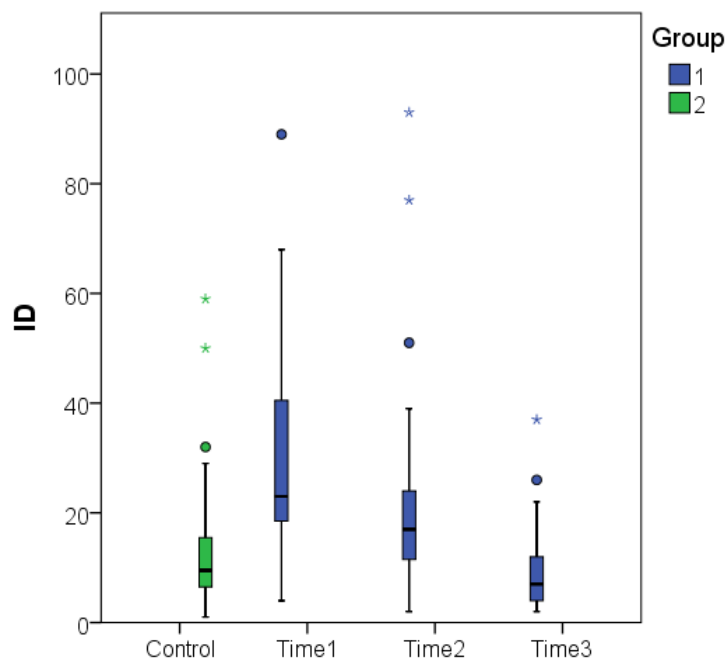


Figure 1. Damage index at each of the three time points of assessment and comparison with the control group.

The frequencies of MN and NPBs observed in samples collected at time point 1 (on admission) were not significantly different from those observed after treatment. A significant increase in the frequency of NBUDs was observed on comparison between these two experimental points (Table 2, Figure 2).

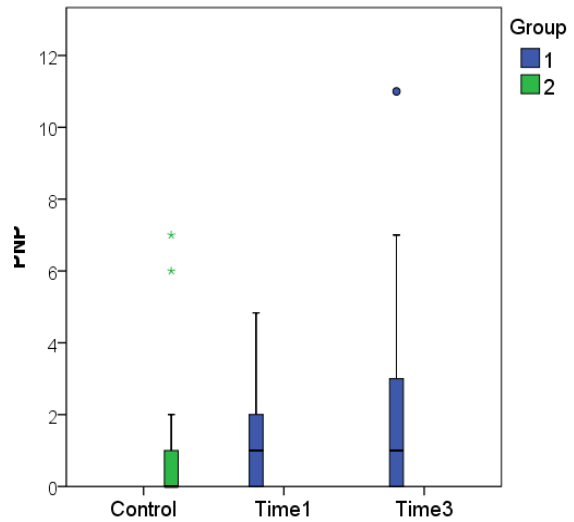
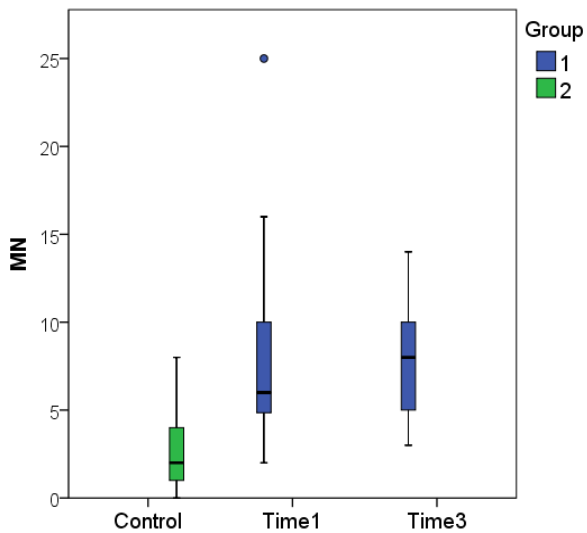


Figure 2 (B). Distribution of NPB values at time points 1 and 3 and comparison with the control group.

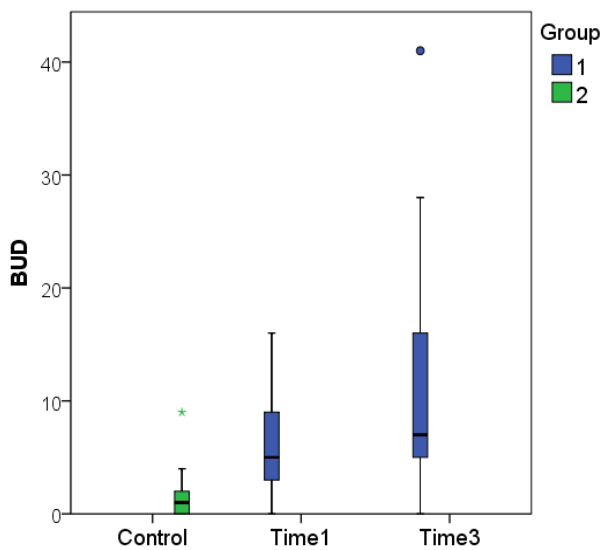


Figure 2 (C). Distribution of NBUD values at time points 1 and 3 and comparison with the control group

Legend
 * Extreme values – values that lie more than three times the length of the box from the end of the box.
 • Outliers – values that lie more than one and a half times the length of the box from the end of the box.

Comparative analysis of the different comet classes (markers of damage intensity) observed at the three experiment points revealed a statistically significant difference overall ($P < 0.001$). There were significant differences in the three most common classes of DNA damage between time points 1 and 3 (Figure 3).

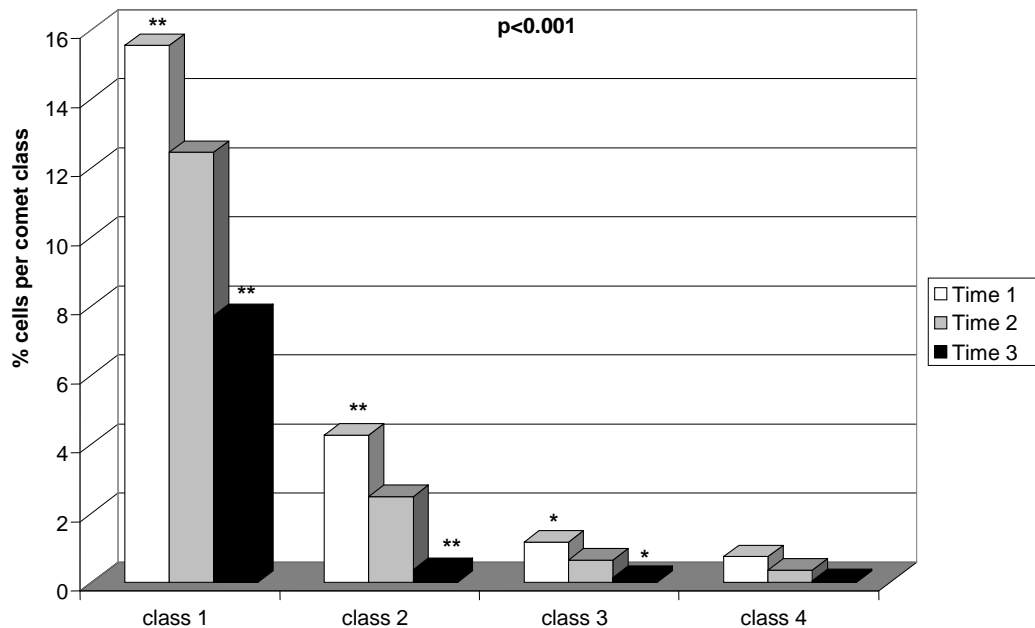


Figure 3: Comparison of the frequency of damaged cells of each comet class between time points 1, 2, and 3 (residual analysis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Tests were conducted to assess the correlation between DNA damage markers and age, duration of crack cocaine use, time elapsed between last use of crack cocaine and first blood collection, and duration of tobacco use. Furthermore, comparisons were made between subjects in the test group who drank and did not drink alcoholic beverages, those who used other illicit drugs and those who did not, those who used certain medications and those who did not, and those who drank a popular local beverage (*Ilex paraguariensis* infusion) and those who did not. The following medications were used during treatment by some patients: Carbamazepine(61,29%), Clonazepan (benzodiazepines) (9,68%), Paracetamol (acetaminophen) (3,23%), Fluoxetine (16,13%), clorpromazina (41,94%), Diazepam (benzodiazepines) (16,13%), Gardenal® (phenobarbital) (3,23%)e lithium carbonate (9,68%). Positive findings are shown in Table 3.

Table 3. Statistically significant correlations between nuclear changes and other factors that might have an impact on DNA damage markers.

Correlation	P	N
<i>Ilex paraguariensis</i> infusion x MN (time point 1)	P=0.045	13
Duration of tobacco use (years) x D (time point 2)	P=0.043	19
Duration of tobacco use (years) x MN (time point 1)	P=0.017	17
Duration of tobacco use (years) x NPBs (time point 3)	P=0.023	13
Duration of cocaine use x MN (time point 3)	P=0.028	9

Analyses were also carried out to test for correlation between DNA damage detected with the comet assay and damage assessed with the micronucleus assay, taking into account the case and control samples as a whole. Results are shown in Table 4.

Table 4. Correlation between damage markers.

	D1	D2	D3	MN1	NPB1	BUD1	MN3	NPB3	BUD3
D1		0.000	0.001	0.628	0.906	0.424	0.245	0.766	0.004
D2	0.672		0.000	0.783	0.478	0.610	0.862	0.135	0.854
	71								
D3	0.413	0.492		0.108	0.737	0.279	0.025	0.117	0.005
	63	63							
MN1	0.071	0.040	-0.255		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	49	49	41						
NPB1	0.017	-0.104	0.054	0.590		0.003	0.000	0.000	0.015
	49	49	41	58					
BUD1	0.117	-0.075	-0.173	0.546	0.379		0.000	0.077	0.000
	49	49	41	58	58				
MN3	0.186	0.028	-0.351	0.851	0.585	0.588		0.000	0.000
	41	41	41	49	49	49			
NPB3	0.048	-0.238	-0.249	0.597	0.506	0.255	0.485		0.000
	41	41	41	49	49	49	50		
BUD3	0.436	0.030	-0.433	0.684	0.345	0.746	0.681	0.508	
	41	41	41	49	49	49	50	50	

Legend: The uppermost (yellow) triangle represents p values, and the bottom (blue) triangle, correlation and N . D is the damage rate calculated with the comet assay, followed by the point in time at which samples were collected (time point 1, 2, or 3). MN, NPB, and BUD are changes observed during the micronucleus assay, also followed by the point in time at which samples were collected (time point 1 or 3).

DISCUSSION

Most patients admitted to the clinic where this study was carried out lived in the metropolitan region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Rehabilitation was court-ordered in the majority of cases, and the expected duration of treatment ranged from 21

to 30 days. Concomitant use of other psychoactive substances, particularly cannabis and tobacco, was common among our subjects.

The comet assay technique proved quite sensitive for detection of DNA damage among crack cocaine users, as shown by the substantial differences between the case (user) and control groups at all three time points of assessment. If analysis is restricted to the initial assessment alone (pre-rehabilitation), the difference is even greater, which highlights the genotoxic environment in which these individuals were immersed at the time of admission to the rehabilitation clinic. Comparison between controls and cases at the third time point of assessment showed no significant difference in DNA damage as assessed by the comet assay, which shows the impact of rehabilitation treatment.

The MN technique revealed that, at the time of admission, subjects in the crack cocaine group had higher frequencies of MN and NBUDs than controls, but no significant difference in the frequency of NPBs. These findings evince the mutagenic nature of crack cocaine exposure, as an increased frequency of micronuclei is indicative of genome instability caused by established mutations beyond any possibility of repair (Kirsch-Volders e Fenech, 2001). The frequency of nucleoplasmic bridges was relatively very low in view of the total number of analysed cells. This finding may be related to the mechanism of NPB formation, which does not include aneuploidy, only clastogenesis (Fenech, 2000). Another key factor was the low frequency of these anomalies as compared with the MN frequencies found, which is usually observed in studies that employ these two markers. Perhaps analysis of 1000 binucleated cells is not enough for assessment of the frequency of nucleoplasmic bridges in chronic exposure studies.

The findings of the comet assay revealed a reduction in reparable damage during treatment, but 48 hours was not a sufficiently long period between assessments

for detection of significant differences. A significant difference was, however, detected between samples collected during initial (pre-treatment) assessment and those collected at final (post-treatment) assessment. Once again, this revealed an effect of rehabilitation treatment, which reduced the rates of DNA damage as measured by the comet assay. Considering that this assay evaluates reparable DNA damage (Collins, 2004), these findings show that, with the passage of time, crack cocaine users who did not have access to the drug experienced a gradual action of their DNA repair systems, to the point that users and controls were statistically indistinguishable in terms of comet assay-evaluated DNA damage at the end of the rehabilitation period. Another potential hypothesis for this decrease in DNA damage levels is apoptotic elimination of cells damaged extremely during increased exposure.

Analysis of the distribution of DNA damage classes (damage intensity) at the three time points of assessment revealed a uniform decline in DNA damage indices during rehabilitation of crack cocaine users, as there was a reduction in all damage classes, with cells exhibiting class 1 and class 2 damage (minor damage) accounting for most DNA damage observed in this sample.

The frequency of micronuclei and nucleoplasmic bridges did not decrease after treatment, and the number of nuclear buds increased substantially. These findings suggest that the length of treatment of these crack cocaine users was not enough to effect a detectable reduction in markers of mutagenicity. Furthermore, we cannot rule out an influence of the pharmacological treatment to which subjects were exposed at the clinic on nuclear bud formation, as this marker is associated with gene amplification triggered by cellular toxicity (Fenech, 2002; Fenech et. al., 2011).

Regarding factors other than crack cocaine use, duration of tobacco use was significantly correlated with MN and NPB values and the damage index at different points of assessment. This finding highlights the impact of tobacco use as a potentiator of DNA damage, particularly when other genotoxic exposures are present, as a correlation was detected even though our sample did not include any heavy smokers; mean cigarette intake was relatively low. Toxic compounds are absorbed from cigarettes in the same manner as from crack cocaine (El-Zein et. al, 2008).

In our study, the frequency of MN was highest among crack cocaine users who also drank mate a beverage made from the leaves of *Ilex paraguariensis* and widely consumed by the general population of the region where samples were collected on a daily basis. Alves et al. (2008) found no increase in MN levels in peripheral blood lymphocytes after in vitro exposure of cell cultures to mate extract. However, the presence of organophosphates such as phosphamidon in these extracts may have exerted an additive effect that compounded the mutagenic damage associated with crack cocaine use. Phosphamidon caused considerable genetic damage in human lymphocytes from peripheral blood, *in vitro*, and in mice bone marrow, *in vivo* (Patankar and Vaidya, 1980).

CONCLUSION

The results of this study reveal the genotoxic and mutagenic effects of crack cocaine use and pave the way for further research on cellular responses and the possible consequences of DNA damage, such as induction of irreversible neurological disease and neoplasms.

FUNDING

This study was funded by the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), the Rio Grande do Sul Research Foundation (FAPERGS) and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE/HCPA).

REFERENCES

1. Alves R J V, Jotz G P, Amaral V S do, Montes T M H, Sampaio H, Andrade H H de (2008). The evaluation of mate´ (Ilex paraguariensis) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. *Toxicology in Vitro* 22: 695–698.
2. Bagatini P, Palazzo R, Rodrigues M, Costa C, Maluf S W (2008). Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *Mutation Research*, 111 - 115.
3. CEBRID (2009). Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas Departamento de Psicobiologia – UNIFESP. *Boletim Cebrid*. Número 61 Janeiro/Fevereiro/Março.
4. Collins, A R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations *Mol Biotechnol*. 2004 Mar; 26(3):249-61.
5. Duailibi LB, Ribeiro M, Laranjeira R (2008). Profile of cocaine and crack users in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 24(Suppl. 4), s545-s557.
6. El-Zein R A, Fenech M, Lopez M S, Spitz M R. and Etzel C J (2008). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. May; 17(5): 1111–1119.

7. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan A T, Surralles J, Crott J W, Parry J, Norppa H, Eastmond D A, Tucker J D and Thomas P (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* vol. 26 no. 1 pp. 125–132.
8. Fenech, M.; Crott, J. W (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. *Mutation Research* 504:131-136.
9. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology (2002). *Toxicology*. 181 – 2:411–6.
10. Fenech, M . The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* (2000). 455 81–95.
11. Fenech, M, Morley, A. A (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*. 147:29-36.
12. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V and Tice RR (2003). 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 18:45-51.
13. Hartnoll R, Daviaud E and Power R (1987). “Drug Use and Misuse: A Reader.” Ed. by Heller T, Gott M e Jaffery C (1987). Wiley And Sons, Ltd.; *Chichester*, P. 13-18.
14. Jaffe JH (1990). “Goodman and Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edn,” New York, *Pergamon Press*. p. 539-545.
15. Kirsch-Volders M, Fenech M (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive

cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes; *Mutagenesis*, 16(1):51-58.

16. Maluf S W, Mergener M, Dalcanale L, Costa C. C, Polo T, Kayser M, Silva L B Da, Prá D, Teixeira P (2007). DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutation Research*, 626, 180 - 184.
17. Maluf S, Pra D, Friedrisch J, Bittar C, Da Silva M, Henriques J, Silla L (2009). Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27, p.26 - 29.
18. Nadin SB, Vargas-Roig LM and Ciocca DRA (2001). The silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 49:1183-1186.
19. Nassif Filho ACN, Bettega SG, Lunedo S, Maestri JE and Gortz F (1999). Repercussões otorrinolaringológicas do abuso de cocaína e/ou crack em dependentes de drogas. *Rev Ass Med Brasil* 45(3): 237-41.
20. Patankar N, Vaidya VG (1980). Evaluation of genetic toxicity of insecticide phosphamidon using in vitro & in vivo mammalian test systems. *Indian J Exp Biol*. Oct;18(10):1145-7.
21. Ribeiro-Araújo M, Laranjeira R and Dunn J (1998). Cocaína: bases biológicas da administração, abstinência e tratamento. *J. Bras. Psiquiatria*. 47(10): 497-511.
22. Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1998). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-191.
23. Stefanidou M, Chatziioannou A, Livaditou A, Rellaki A, Alevisopoulos G, Spiliopoulou H and Koutselinis A (2001). DNA Toxicity of Cocaine Hydrochloride and Cocaine Freebase by Means of DNA Image Analysis on *Tetrahymena pyriformis*. *Biol Pharm*

Bull. 2002 Mar;25(3):332-4.

24. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000)_Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A maioria dos pacientes da clínica eram moradores da região metropolitana de Porto Alegre, sendo internados, em sua maioria, por ordem judicial; por esta determinação, o tempo previsto para tratamento era de 21 a 30 dias. Assim, aqueles que buscaram auxílio de forma voluntária foram minoria, apesar dos graves impactos pessoais e sociais impostos pelo crack.

Durante as entrevistas, alguns usuários relataram fazer o uso do “pitico”, que de acordo com o relatado, seria o cigarro de maconha, com fragmentos da “pedra” do crack. Esta é uma forma de iniciação ao crack. Há, também, uma crença de que os efeitos tranqüilizadores da maconha equilibrariam os efeitos excitatórios do crack, de forma que esta combinação de substâncias está se popularizando. Alguns indivíduos relataram ter maior utilização da droga após a ingestão de bebida alcoólica.

O uso concomitante de outras substâncias mostrou-se comum, especialmente maconha e tabaco.

Entre os vários ensaios para medir danos ao DNA, a eletroforese alcalina em gel de célula única (ensaio cometa) é um método sensível e poderoso para determinação de quebras na fita do DNA. Com a realização do nosso estudo, primeiramente, conseguimos verificar com o ensaio CBMN, que MNs são parâmetros úteis na diferenciação de usuários e controles quanto a avaliação de dano celular,

Os dados apresentados através do ensaio cometa evidenciam uma redução gradativa do dano reparável à medida que os usuários ficavam sem utilizar a droga.

Na terceira coleta obteve-se um (n) menor que as anteriores, em razão da não aderência de alguns usuários ao tratamento.

O impacto da cocaína, na forma de crack, é, ainda, imprevisível em nossa sociedade. O consumo tem aumentado, apesar de esforços públicos e de organizações privadas, para conter o avanço desta droga. Estudos que busquem evidenciar possíveis danos ao DNA de usuários são, ainda, escassos. Através deste estudo pretendemos alertar quanto ao potencial danoso do crack. Este estudo está sendo ampliado e terá um segmento com um (n) maior abrangendo o projeto Ações Integradas – SENAD (Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas- Ministério da Justiça – Brasil), onde será possível realizar uma grande correlação de variáveis com outros estudos em andamento na mesma população estudada.

8. ANEXOS

8.1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (grupo caso)

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, por favor, assine ao final deste documento. Em caso de recusa você não será prejudicado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você poderá solicitar o auxílio dos pesquisadores para maiores informações.

A pesquisa em questão inclui usuários de crack e voluntários não usuários. No caso de voluntários com idade inferior a 18 anos, o termo também poderá ser assinado pelo seu respectivo(a) responsável.

Projeto: Avaliação dos índices de DNA danificado em usuários de crack

I - Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo consiste em uma avaliação das alterações no material genético (danos no 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:

Serão feitas três coletas de 8 ml de sangue: a primeira no início do tratamento, a segunda dois dias depois e a terceira no final do tratamento, com o propósito de avaliar a frequência de mutações através da técnica de micronúcleos (que avalia quebras maiores) e da técnica do cometa (que acusa alterações menores no DNA). Além disso, os participantes serão submetidos a um questionário de saúde pessoal (que envolve questões de alimentação, histórico ocupacional e uso de medicamentos, entre outros). Após a realização do estudo, todas as amostras coletadas serão descartadas.

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 participantes tem mais alterações do que a média da população, podendo servir estes resultados como base para a prevenção de efeitos danosos sobre a saúde.

IV – Riscos:

A realização do estudo não causará nenhum risco de vida aos participantes. Os riscos serão apenas aqueles existentes em uma coleta de sangue comum (hematoma e dor no local da punção).

Pelo presente Consentimento Pós-Informação, 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: 33598011).

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre - RS

Data: ___/___/___.

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário:

Nome e assinatura do Responsável Legal, no caso de participantes com menos de 18 anos:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Comitê de Ética em Pesquisa – HCPA

Telefone para contato: 33598304

8.2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (grupo controle)

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, por favor, assine ao final deste documento. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você poderá solicitar o auxílio dos pesquisadores para maiores informações.

A pesquisa em questão inclui usuários de crack e voluntários não usuários, que serão os controles para comparação. No caso de voluntários com idade inferior a 18 anos, o termo também poderá ser assinado pelo seu respectivo(a) responsável.

Projeto: Avaliação dos índices de DNA danificado em usuários de crack

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 5 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 alterações menores no DNA). Além disso, os participantes serão submetidos a um questionário de saúde pessoal (que envolve questões de alimentação, histórico ocupacional e uso de medicamentos, entre outros). Após a realização do estudo, todas as amostras coletadas serão descartadas.

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 participantes tem mais alterações do que a média da população, podendo servir estes resultados como base para a prevenção de efeitos danosos sobre a saúde.

IV – Riscos:

A realização do estudo não causará nenhum risco de vida aos participantes. Os riscos serão apenas aqueles existentes em uma coleta de sangue comum (hematoma e dor no local da punção).

Pelo presente Consentimento Pós-Infirmação, 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: 33598011).

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre - RS

Data: ___/___/___.

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário:

Nome e assinatura do Responsável Legal, no caso de participantes com menos de 18 anos:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Comitê de Ética em Pesquisa – HCPA

Telefone para contato: 33598304

8.3 – 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), adaptado para o estudo.

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. Este estudo poderá servir como sinal de alerta para prevenir e melhorar a qualidade de vida dos participantes.

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 nº: _____

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 nº: _____

- Data de hoje: _____
- Qual a sua idade? (em anos) _____
- Sexo: () Masculino () Feminino
- Descrever a rotina diária com possibilidade de exposições a agentes mutagênicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos, radiação, etc). Qual foi a frequência? Qual foi o período?

HISTÓRIA DE FUMO

Alguma vez você fumou? () Sim () Não

Se **não**, passe para a questão 6. Se **sim**, continue:

Quanto tempo você fumou? (em anos) _____

Você fuma atualmente? () Sim () Não

Quando parou de fumar? (mês e ano) _____

O que você fumava? _____

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? _____

Você fuma charutos? Quantos por dia? _____

Você fuma cachimbos? Quantos por dia? _____

Código nº: _____

MEDICAMENTOS E DOENÇAS (pode ser pesquisado no prontuário, se for o caso)

- 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)
---------------------	------	--------------------	--------------	---------------

- 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)
---------------------	------	--------------------	--------------	---------------

Você teve ou tem alguma dessas doenças?

() Câncer

() Doença cardiovascular

() Hepatite

() Diabete

() Outras doenças importantes

Se sim, indique:

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

Código nº: _____

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

- Você já se submeteu a uma cirurgia? Qual? Quando?

DIETAS (deve refletir apenas os hábitos freqüentes)

17. Você come apenas vegetais? () Sim () Não

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

19. Você ingere alguma dessas bebidas? Qual a freqüência?

() café _____

() chá _____

() chimarrão _____

20. Você bebe cerveja? () Sim () Não

() 1 – 6 garrafas por semana ou menos

() 7 – 12 garrafas por semana

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

21. 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? _____

22. 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? _____

DROGAS ILÍCITAS

23. Você fuma maconha?

() Sim () Não

Se sim, qual a frequência? _____

24. Você cheira cocaína?

() Sim () Não

Se sim, qual a frequência? _____

25. Qual é a sua frequência de uso do crack?

() 1 – 5 pedras por dia

() 5 – 10 pedras por dia

() 10 – 20 pedras por dia

() 20 ou mais pedras por dia