

JOSÉ RICARDO SCALISE

RELAÇÃO DE CASUALIDADE ENTRE O DANO
OXIDATIVO AO DNA E A MUTAÇÃO DA p53 NO
ADENOMA E ADENOCARCINOMA COLORRETAIS

Bragança Paulista
2014

JOSÉ RICARDO SCALISE

RELAÇÃO DE CASUALIDADE ENTRE O DANO
OXIDATIVO AO DNA E A MUTAÇÃO DA p53 NO
ADENOMA E ADENOCARCINOMA COLORRETAIS

Orientadora
Professora Doutora DENISE GONÇALVES PRIOLLI

Dissertação de Mestrado apresentada no Curso
de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências
da Saúde da Universidade São Francisco para
obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde

Bragança Paulista
2014

WI 522
S293r

Scalise, José Ricardo.

Relação de casualidade entre o dano oxidativo ao DNA e a mutação da p53 no adenoma e adenocarcinoma colorretais / José Ricardo Scalise. -- Bragança Paulista, 2014.

48 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Denise Gonçalves Priolli.

1. Adenoma. 2. Adenocarcinoma. 3. Proteína supressora de tumor p53. 4. Imunoistoquímica. 5. Dano ao DNA. 6. Ensaio em cometa. 7. Processamento de imagem assistido por computador.

I. Priolli, Denise Gonçalves. II. Título.

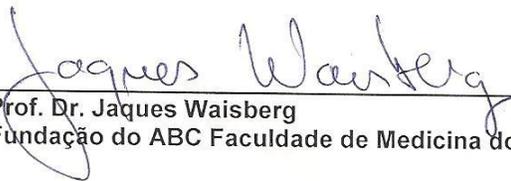
SCALISE,R., José, "Relação de casualidade entre o dano oxidativo ao DNA e a mutação da p53 no adenoma e adenocarcinoma colorretais". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de janeiro de 2014 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Denise Gonçalves Priolli
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Lucio Fabio Caldas Ferraz
Universidade Paulista



Prof. Dr. Jaques Waisberg
Fundação do ABC Faculdade de Medicina do ABC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus** e a toda minha família,
em especial a meus pais,

José Roberto Scalise e Rosaria Maria Marra Scalise,

a minha esposa e filho,

Tanara Vanessa Becker Scalise e Pedro Henrique Becker Scalise,

que são o real motivo do empenho neste projeto.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Denise pelo acolhimento materno no Laboratório de Pesquisa e pela incansável dedicação desprendida.

À Universidade São Francisco pela bolsa de estudos.

Aos grandes amigos da Saúde Coletiva pela colaboração que permitiu a elaboração deste trabalho.

Aos colegas da Pós Graduação e Iniciação Científica, em especial à Ms. Natália Martinez e ao acadêmico Julio Valdívia, pelo apoio e cooperação.

E a Edvaldo Capobiango Coelho pela colaboração conceitual estatística.

EPÍGRAFE

Filosofia do Sucesso

Napoleon Hill

Se você pensa que é um derrotado,
você será derrotado.
Se não pensar “quero a qualquer custo!”
Não conseguirá nada.
Mesmo que você queira vencer,
mas pensa que não vai conseguir,
a vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,
você será fracassado.
Nós descobrimos neste mundo
que o sucesso começa pela intenção da gente
e tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malogrado,
você se torna como tal.
Se almeja atingir uma posição mais elevada,
deve, antes de obter a vitória,
dotar-se da convicção de que
conseguirá infalivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa
aos fortes nem aos espertos.
Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória
é aquele que crê plenamente
Eu conseguirei!

RESUMO

Introdução: Ao se considerar os diferentes mecanismos de carcinogênese, bem como os diversos aspectos epidemiológicos envolvidos no câncer colorretal, ainda existem dúvidas quanto à maior ou menor frequência de mutações da proteína p53. A principal função da proteína p53 encontra-se relacionada à preservação da integridade do genoma de cada célula individual, mantendo a mesma sequência de nucleotídeos ao longo de todas as cadeias de DNA presentes em cada célula do organismo, sendo, por isto, conhecida como guardião do genoma. Um dos possíveis mecanismos para o surgimento de sua mutação seria o dano oxidativo ao DNA causado pelo desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e a defesa orgânica. **Objetivo:** Relacionar o dano oxidativo ao DNA com a mutação da p53 em lesões adenomatosas colorretais. **Método:** Cento e cinquenta e três sujeitos de pesquisa foram submetidos à colonoscopia, sendo obtidos espécimes tumorais e de tecido normal de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma, além de tecido normal de voluntários saudáveis. Estudo anatomopatológico convencional (HE) foi realizado com finalidade diagnóstica e, imunoistoquímico associado a processamento de imagem assistido por computador, para quantificar a p53. Medida de dano oxidativo ao DNA foi obtida por Ensaio Cometa. Análise estatística adotou significância de 5% para testar a hipótese de nulidade. Utilizaram-se análise descritiva, medidas de tendência central, teste de normalidade, análise de variância, testes de associação e correlação parcial. **Resultados:** Foram selecionados para o estudo sete voluntários saudáveis, 23 pacientes portadores de adenoma e 29 de adenocarcinoma. Entre o tecido normal de voluntários saudáveis e tecido normal de pacientes com tumor houve diferença ($p=0,01$) na expressão da p53, assim como no tecido normal adjacente ao tumoral e lesões adenomatosas ($p=0,00$). Houve associação entre p53 no tecido normal e no tumoral ($r_s=0,459$, $p=0,00$). Em relação ao dano oxidativo ao DNA, houve diferença ($p=0,00$) quando se comparou o tecido normal adjacente ao tecido tumoral com as lesões adenomatosas. Houve associação entre o dano ao DNA no tecido normal e no tumoral ($r_s=0,439$, $p=0,00$). A relação causal entre dano oxidativo ao DNA e a mutação da p53 pode ser demonstrada pela correlação parcial ($r=0,393$, $p=0,006$). **Conclusão:** O dano oxidativo ao DNA se relaciona à mutação da p53 apresentando-se como o fator controlador da mutação da p53 no adenoma e adenocarcinoma colorretal.

Palavras Chaves: Adenoma, Adenocarcinoma, Proteína Supressora de Tumor p53, Imunoistoquímica, Dano ao DNA, Ensaio Cometa, Processamento de imagem assistido por computador.

ABSTRACT

Introduction: Considering the different mechanisms of carcinogenesis, as well as several epidemiological studies in colorectal cancer, there are still doubts as to higher or lower frequency of mutations of the p53 protein. The main function of p53 is related to preserve the integrity of the genome of each individual cell, maintaining the same nucleotide sequence over all strands of DNA present in every cell of the organism and, thus, known as the guardian genome. A possible mechanism for the emergence of a mutation would be the oxidative damage to DNA caused by an imbalance between the production of reactive oxygen species and organic defense. **Objective:** Relate DNA damage and p53 mutation in colorectal adenomatous lesions. **Method:** One hundred and fifty-three specimens were obtained by colonoscopy. Adenomas, adenocarcinomas and normal tissue from adenoma and adenocarcinoma patients as well as normal tissue from healthy volunteers were obtained. Histological study (H/E) was carried out for diagnostic purposes. p53 immunohistochemistry expression, measure by computer-assisted image processing, was done to quantify mutant p53. DNA damage analysis was performed by Comet Assay. Descriptive analysis, measures of central tendency, normality test, analysis of variance, association and partial correlation tests were used adopting significance level of 5% to statistical analysis. **Results:** Seven healthy volunteers, 23 patients with adenoma and 29 adenocarcinoma patients were selected for the study. There was difference between p53 expression from healthy volunteers' normal tissue and from tumor patients' normal tissue ($p=0,01$), as well as between normal tissue adjacent to tumor and adenomatous lesions ($p=0,00$). There was association between p53 in normal and tumor tissues ($r_s=0,459$, $p=0,00$). In relation to oxidative DNA damage, there was difference ($p=0,00$) when compared normal tissue adjacent to tumor with adenomatous lesions. There was association between DNA damage between normal and tumor tissues ($r_s=0,439$, $p=0,00$). The causal relationship between oxidative DNA damage and p53 mutation can be demonstrated by partial correlation ($r=0,393$, $p=0,006$). **Conclusion:** Oxidative DNA damage is related to p53 mutation. Oxidative damage to DNA appears as the controlling factor of the p53 mutation in colorectal adenoma and adenocarcinoma.

Key Words: Adenoma, Adenocarcinoma, Tumor Suppressor Protein p53, Immunohistochemistry, DNA damage, Comet assay, Image processing computer assisted.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

°C – Grau Celsius, Grau Centígrado

µL - Microlitro

µm – Micrômetro

8-OHdG – 8-Hidroxi-guanina

CCR – Câncer Colorretal

CH₃ – Metil

CIN – do Inglês *Chromosomal Instability*, Instabilidade Cromossômica

cm – Centímetro

CONEP – Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DMSO – do Inglês *Dimethyl Sulfoxide*, Sulfóxido de Dimetilo

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – do Inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilenodiaminotetraacético

ELN – Espécies Livres de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HBSS – do Inglês *Hanks' Balanced Salt Solution*, Solução salina equilibrada de Hank

HE - Hematoxilina-Eosina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

kDa – QuiloDalton

M – Molar

mA – Miliampere

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MSI – do Inglês *Microsatellite Instability*, Instabilidade de Microssatélites

NaCl – Cloreto de Sódio

p – P-value, nível de significância

PBS – do Inglês *Phosphate-buffered Saline*, Solução Tampão Fosfato-salino
PCR – do Inglês *Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial Hidrogênio-iônico
r – Coeficiente da Correlação Parcial
RCUI – Reto Colite Ulcerativa Inespecífica
RGB – do Inglês *Red Green Blue*, Vermelho Verde Azul
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro
rs – Coeficiente da Correlação de Spearman
SDS - do Inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*, Dodecil sulfato de sódio
TM – do Inglês *Tail Moment*, Momento de Cauda
U/pixel – Unidades por pixel
UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia
USF – Universidade São Francisco
V – Volts

LISTA DE FIGURAS E TABELA

	Página
Figura 1: Casuística quanto ao sexo distribuída conforme diagnóstico	14
Figura 2: Casuística quanto ao diagnóstico distribuído conforme a faixa etária	15
Figura 3: Fotomicrografia. Tecido cólico normal. Ausência de atipia celular, conformação glandular normal. Hematoxilina-Eosina (HE): 400X	16
Figura 4: Fotomicrografia. Adenoma de cólon. Notar a atipia celular e perda da polaridade nuclear. Hematoxilina-Eosina (HE): 400X	16
Figura 5: Fotomicrografia. Adenocarcinoma de cólon. Notar a atipia celular pronunciada, perda da polarização celular, inversão da relação núcleo/citoplasma, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes e frequentes figuras de mitose. Hematoxilina-Eosina (HE). 200X	17
Figura 6: Fotomicrografia. Expressão de p53 em tecido cólico normal de voluntário saudável. Imunoistoquímica: 400X	17
Figura 7: Fotomicrografia. Expressão de p53 em tecido cólico normal adjacente ao adenoma. Imunoistoquímica: 400X	18
Figura 8: Fotomicrografia. Expressão de p53 em tecido cólico normal adjacente ao adenocarcinoma. Imunoistoquímica: 400X	18
Figura 9: Representação dos valores da expressão imunoistoquímica de p53 em tecido normal de voluntários saudáveis e no tecido não tumoral adjacente ao adenoma e adenocarcinoma. Nota-se ausência de diferença estatística entre tecido normal adjacente às lesões adenomatosas (b X b) ($p=0,68$), enquanto há diferença quando comparados tecido normal e normal em paciente com lesão (a X b) ($p=0,01$)	19

Figura 10:	Fotomicrografia. Expressão moderada de mutação de p53 em adenoma. Notar a imunocoloração nuclear acastanhada. Imunoistoquímica: 100X	20
Figura 11:	Fotomicrografia. Expressão intensa de mutação de p53 em adenocarcinoma. Notar a imunocoloração nuclear acastanhada em grande quantidade. Imunoistoquímica: 100X	20
Figura 12:	Representação dos valores da expressão imunoistoquímica de p53 em tecido normal adjacente ao tumoral e tecido tumoral (adenoma e adenocarcinoma)	21
Tabela 1:	Ocorrência de mutação da p53 em pacientes com adenoma e adenocarcinoma colorretais	22
Figura 13:	Representação gráfica da correlação entre a p53 no tecido normal e tecido tumoral. Nota-se aumento da expressão de p53 em tecido normal proporcional ao aumento de mutação da proteína no tecido tumoral do mesmo paciente	22
Figura 14:	Fotomicrografia. Dano oxidativo ao DNA em célula de cólon normal. Notar ausência de formação de cauda. Ensaio Cometa	23
Figura 15:	Representação dos valores de dano oxidativo ao DNA em tecido normal de voluntários saudáveis, no tecido normal adjacente ao adenoma e ao adenocarcinoma colorretal	24
Figura 16:	Fotomicrografia. Dano oxidativo ao DNA em célula de adenoma de cólon. Notar fragmentação nuclear moderada do DNA caracterizada pela formação de cauda (Tail Moment). Ensaio Cometa	25
Figura 17:	Fotomicrografia. Dano oxidativo ao DNA em célula de adenocarcinoma de cólon. Notar fragmentação nuclear intensa caracterizada pela formação da cauda (Tail Moment). Ensaio Cometa	25
Figura 18:	Representação dos valores do dano oxidativo ao DNA em tecido normal adjacente ao tecido tumoral e no tecido tumoral (adenoma e adenocarcinoma)	26

- Figura 19:** Representação gráfica da correlação entre o dano oxidativo ao DNA no tecido normal e tecido tumoral. Notar aumento do dano oxidativo ao DNA em tecido normal proporcional ao aumento de dano oxidativo ao DNA no tecido tumoral do mesmo paciente 27
- Figura 20:** Representação gráfica da Correlação Parcial demonstrando o fator causal do dano oxidativo sobre a p53 mutada 28

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	7
3. MÉTODO	8
3.1. AMOSTRA	8
3.2. CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	9
3.3. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	9
3.4. ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	9
3.4.1. IMUNOCOLORAÇÃO	9
3.4.2. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p53	11
3.5. ENSAIO COMETA	11
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
4. RESULTADOS	14
4.1. CASUÍSTICA	14
4.2. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	15
4.3. EXPRESSÃO DE p53	17
4.4. MEDIDA DO DANO OXIDATIVO AO DNA	23
4.5. RELAÇÃO ENTRE DANO AO DNA E EXPRESSÃO DA p53	27
5. DISCUSSÃO	29
5.1. QUANTO AO MÉTODO	29
5.1.1. QUANTO À CASUÍSTICA	29
5.1.2. QUANTO À ESCOLHA DA QUANTIFICAÇÃO DA p53 POR IMUNOISTOQUÍMICA	29
5.1.3. QUANTO AO ENSAIO COMETA	31
5.1.4. QUANTO A CORRELAÇÃO DE SPEARMAN	32
5.1.5. QUANTO AO TESTE DE CORRELAÇÃO PARCIAL	32
5.2. QUANTO AOS RESULTADOS	33
5.2.1. PROTEÍNA p53 NO TECIDO NORMAL, ADENOMA E ADENOCARCINOMA	33

5.2.2. DANO OXIDATIVO NO TECIDO SAUDÁVEL, ADENOMA E ADENOCARCINOMA	34
5.2.3. QUANTO À RELAÇÃO ENTRE DANO OXIDATIVO AO DNA E A p53	36
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8. ANEXOS	46
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	46
ANEXO II – GRANGER CAUSALITY METHOD retirado de Fugita <i>et al.</i> , 2012	47
ANEXO III – TABELA COM OS DADOS INDIVIDUAIS	48

1. Introdução

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares. Em 2013 cerca de 1.660.290 norte-americanos foram diagnosticados com câncer, sem contar o câncer de pele do tipo não melanoma. Destes, em torno de 580.350 morrerão da doença, sendo quase 1.600 indivíduos por dia. Quanto à mortalidade, portanto, estima-se que 50.830 evoluam a óbito pela doença neste mesmo ano. (American Cancer Society, 2013) No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2012, as quais também são válidas para 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 385 mil casos novos de câncer, sem os casos de pele não melanoma. Incluindo este último, as estimativas apontam para um total de 518.510 novos casos. (Instituto Nacional do Câncer, 2011)

Entre os cânceres de maior incidência, o câncer colorretal (CCR) é o quarto mais comum na espécie humana, em ordem de incidência: próstata, mama, pulmão e CCR, (National Cancer Institute, 2010; American Cancer Society, 2013). Nos Estados Unidos foram esperados 142.820 novos casos de CCR em 2013. (American Cancer Society, 2013). Embora sua incidência varie de acordo com as regiões do mundo, há uma predileção por áreas de maior desenvolvimento, configura-se como o segundo mais frequente na região sudeste do Brasil, independente do sexo. (Instituto Nacional do Câncer, 2011)

Desde 1990 encontra-se bem estabelecido que o surgimento do CCR, a partir da mucosa cólica normal e sua evolução para pólipos, é mediado por uma sequência de mutações em genes controladores da proliferação, diferenciação, adesão e apoptose celulares. (Fearon e Vogelstein, 1990) A importância dos pólipos adenomatosos está, portanto, em sua correlação direta com o CCR. (Gold e Freedman, 1965; Fearon e Vogelstein, 1990; Kin *et al.*, 1994; Pool-Zobel e Leucht, 1997; Gedik *et al.*, 2002) Desta forma, a remoção dos adenomas pode prevenir o CCR, assim como o diagnóstico precoce pode reduzir a mortalidade.

Avanços na compreensão da biologia molecular dos tumores vêm demonstrando que o CCR se desenvolve a partir de duas vias principais de carcinogênese. Estas duas vias são conhecidas como instabilidade cromossômica (CIN) e instabilidade de microsátélites (MSI) e respondem por 85% e 15%, respectivamente, dos casos de câncer colorretal esporádico. (Kin *et al.*, 1994; Pool-Zobel e Leucht, 1997) Não obstante a presença destas duas vias distintas de carcinogênese do câncer colorretal esporádico, seu desenvolvimento surge à partir de mucosa cólica normal. A grande dúvida concentra-se nos fenômenos iniciais que levam a mucosa normal a transformar-se progressivamente em pólipos adenomatosos ou em áreas de displasia focal. Existem fortes evidências sugerindo que o evento inicial de agressão ao colonócito normal seja provocado por agentes genotóxicos existentes na luz intestinal. (Pinho e Rossi, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a) Os agentes genotóxicos são caracterizados por possuírem atividade biológica primária, própria ou de metabólitos, capazes de alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a exposição ao agente tóxico leva à alteração da estrutura ou do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade). (McGregor, 2000) A exposição contínua das células do epitélio cólico a diferentes agentes carcinogênicos representa a principal causa de dano ao DNA nuclear. (Pinho e Rossi, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a)

Dentre os agentes genotóxicos, as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante o metabolismo aeróbico das células da mucosa intestinal ou oriundas da dieta apresentam papel importante no desenvolvimento do estresse oxidativo. (Gedik *et al.*, 2002) É sabido que o dano oxidativo ao DNA celular, ocasionado pelas EROs e por outros radicais, tais como as espécies livres de nitrogênio (ELN) e grupo metil (CH₃), encontram-se relacionados ao processo de inflamação da mucosa cólica e, possivelmente, ao surgimento e desenvolvimento do câncer do aparelho digestório. (Ames *et al.*, 1993)

A mucosa de todo o trato digestório é continuamente exposta e particularmente vulnerável a radicais livres que determinam dano oxidativo ao DNA celular. Várias

doenças que cursam com inflamação crônica da mucosa do trato digestório já foram associadas ao estresse oxidativo. (Halliwell e Gutteridge, 1990; Ames *et al.*, 1993; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Ladeira *et al.*, 2008) Evidências relacionam a agressão crônica ao epitélio cólico por EROs, a exemplo do que ocorre em portadores de doença inflamatória intestinal (DII), como um fator predisponente ao CCR. Em doentes com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), o risco de desenvolvimento de câncer aumenta significativamente com o tempo de duração da agressão inflamatória, estimando-se em 0,5% a 1% ao ano. (Halliwell e Gutteridge, 1990; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007) O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo promove a agressão ao DNA das células da mucosa cólica ainda não é totalmente conhecido. O radical OH representa o agente oxidante mais comumente implicado no fenômeno de oxidação de bases do DNA celular. As EROs são eletrofílicas, com atividade altamente reativa, atacando substâncias com alta densidade de elétrons tais como as bases nitrogenadas que formam os ácidos nucléicos que compõe a molécula de DNA. (Battacharya e Barton, 2001)

Dentre os mecanismos mais bem estudados de dano oxidativo ao DNA encontra-se a hidroxilação da base nitrogenada guanina. Nesta reação existe a incorporação de um radical OH- no carbono 8 da molécula da guanina, formando a 8-hidroxi-guanina (8-OHdG). (Kasai e Nishimura, 1983) Durante o processo normal de duplicação do DNA, a guanina parecia-se com a citosina (G-C). Contudo, durante o processo de duplicação do DNA, caso ocorra a formação da 8-OHdG, a guanina hidroxilada parecia-se, de forma errônea, com a molécula de adenina, com isso é gerada uma mutação do tipo transversão (G>T). Na eventualidade de não haver correção, por meio das proteínas de reparo do DNA, no local onde ocorreu a inserção da 8-OHdG, poderá haver formação de proteína defeituosa. Caso esta proteína mutada se encontre relacionada aos mecanismos de controle do ciclo celular, a célula poderá ganhar autonomia proliferativa, formando um clone de células mutantes com características semelhantes. Este desequilíbrio do ciclo celular, com favorecimento da proliferação em detrimento a apoptose, poderia se constituir na explicação molecular para o início de formação dos pólipos. (Toyokuni *et al.* 1995) Assim podem surgir clones de células com acentuada capacidade de divisão celular e diferentes graus de diferenciação, determinando a

formação de displasia tecidual de graus progressivos e o surgimento do câncer. (Kasai e Nishimura, 1983)

A possibilidade de mensuração do dano oxidativo em determinado tecido, compreendendo este dano como sendo o resultado do desequilíbrio entre o estresse oxidativo e os fenômenos antioxidantes do organismo, poderia permitir estabelecer a relação entre dano de DNA e o acúmulo de mutações em células normais e pré-neoplásicas. Com o advento da técnica da eletroforese em gel de célula isolada, a possibilidade de quantificação de dano oxidativo do DNA de cada célula torna-se realidade. Singh et al. desenvolveram, em 1988, técnica simples, capaz de detectar os níveis de dano oxidativo ao DNA em uma célula isolada. (Singh *et al.*, 1988) Esta técnica foi inicialmente chamada de "*eletroforese em gel de célula única*" (Singh *et al.*, 1988) e é hoje popularmente conhecida como "*ensaio do cometa*". O desenvolvimento da técnica se deve aos trabalhos pioneiros de Östling e Johanson (Östling e Johanson, 1984), pela metodologia de eletroforese do DNA em microgel e de Singh e colaboradores, (Singh *et al.*, 1988) que lhe atribuíram maior sensibilidade por meio do uso de solução alcalina. O Ensaio Cometa, por permitir a quantificação do dano oxidativo tecidual em diferentes etapas do processo de carcinogênese, é ferramenta útil na melhor compreensão da importância do estresse oxidativo no câncer colorretal. (Seril *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a)

O estudo das bases moleculares e genéticas envolvidas no processo de carcinogênese encontra-se em expansão. Dentre todos os genes reconhecidamente envolvidos neste processo, destaca-se o TP53 situado no cromossomo 17 em 17p13.1. (Yamaguchi *et al.*, 1997) Este gene codifica a proteína supressora de tumor p53, assim denominada devido ao seu peso molecular de 53kDa. (Pinho, 2000; Martinez *et al.*, 2008) Esta proteína é responsável por verificar a ocorrência de mutações no genoma, impedindo que a célula mutada entre em processo de mitose e complete a divisão celular à partir de duas possíveis vias: correção da mutação por ativação de proteínas de reparo (p21 e pRb) ou indução da apoptose. (Lima *et al.*, 2006) Assim, ficou conhecida como "guardiã do genoma" e exerce papel chave na inibição do desenvolvimento de tumores, preservando a integridade do genoma em cada célula.

(Pinho, 2000) A ação da p53 resulta em parada do ciclo celular em G1, antes que ocorra a duplicação do DNA, permitindo que aconteça o reparo do DNA. Em caso de ausência de possibilidade de reparação do dano, a célula é induzida a apoptose. Quando o gene TP53 sofre mutações, a célula com mutações poderá iniciar um clone maligno. (Ribeiro e Safatle-Ribeiro, 2006)

A alteração da proteína p53 pôde ser determinada em tecido normal adjacente ao tumoral e no adenoma (Kaklamanis *et al.*, 1993; Brand *et al.*, 2013) e pode ser considerada como a alteração decisiva no processo de malignização, sendo encontrada em 60 a 80 % dos casos de CCR. (Felin *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008) Dessa forma, parece existir relação direta entre a mutação da proteína e a formação do adenocarcinoma colorretal. (Fearon e Vogelstein, 1990; Ribeiro e Safatle-Ribeiro, 2006) Além disto, a proteína é detectada em 30% dos adenomas e em 40% a 60% dos adenomas com displasia de alto grau. (Kin *et al.*, 1994; Itzkowitz e Yio, 2004) A literatura sugere que a mutação do gene TP53, que resulta da substituição de prolina por arginina no códon 72 desse gene, aumenta o risco de transformação maligna do adenoma para o adenocarcinoma. (Lima *et al.*, 2006)

Em 1992 foi apresentado em nosso meio método computadorizado que permite a avaliação quantitativa de estruturas microscópicas. (Novelli, 1992) Autores se beneficiaram, como era o objetivo inicial do idealizador do método, quanto à pesquisa mais rápida e objetiva. (Matos *et al.*, 1993; Novelli *et al.*, 1997; Imlay *et al.*, 1998; Priolli, 1999; Martinez *et al.*, 2002; Priolli *et al.*, 2003; Stheophani *et al.*, 2004; Rossingol *et al.*, 2004; Priolli *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2010; Priolli *et al.*, 2013a) Baseado na análise de imagem assistida por computador foram estudados a cicatrização das anastomoses intestinais, (Novelli *et al.*, 1997; Priolli, 1999; Priolli *et al.*, 2003; Stheophani *et al.*, 2004) a superfície isquêmica de mucosa gástrica em cães submetidos à vagotomia, (Martinez *et al.*, 2002) a utilização de anel biofragmentável em comparação a sutura manual em anastomose colo-cólica, (Matos *et al.*, 1993) expressão de proteínas teciduais, (Priolli *et al.*, 2010; Priolli *et al.*, 2013a) entre outras pesquisas. (Imlay *et al.*, 1998; Rossingol *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2009)

A análise de imagem assistida por computador permite quantificar de forma objetiva a expressão tecidual de diversas proteínas coradas por técnica de imunistoquímica e, desta forma, apresenta importância no diagnóstico e terapêutica de doentes com câncer, especialmente se estes marcadores puderem ser detectados em sua forma pré-maligna e com a maior sensibilidade possível. Programas de análise computadorizada foram desenvolvidos por empresas especializadas e atualmente estão disponíveis comercialmente, tal como o utilizado nesse estudo*, permitindo quantificar elementos citoquímicos, como a p53. Vantagem na utilização da imunistoquímica assistida por computador para determinar o conteúdo da p53 é o fato da p53 mutada, presente no tecido tumoral, de forma distinta ao que ocorre com a forma selvagem, apresentar-se estável no tecido cólico tumoral, tornando fácil e precisa sua imunoquantificação. (Vojtěšek *et al.*, 1992; Pinho, 2000)

Pesquisas vêm demonstrando que é possível detectar o dano oxidativo no tecido considerado histologicamente normal. (Kondo *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Balasubramanyam *et al.*, 2010; Redon *et al.*, 2010; Priolli *et al.*, 2013a) Contudo, poucos são os estudos que compararam o dano oxidativo existente no tecido normal e em tecido displásico ou neoplásico. (Oliva *et al.*, 1997; Pool-Zobel e Leuncht, 1997; Kondo *et al.*, 1999; Pool-Zobel *et al.*, 1999; Kawanishi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a) Do melhor de nosso conhecimento, apenas dois destes compararam tecido normal, adenoma e adenocarcinoma conjuntamente, (Kondo *et al.*, 1999; Priolli *et al.*, 2013a) e apenas Oliva *et al.*, avaliaram a mutação do TP53 relacionado ao dano oxidativo ao DNA. Entretanto não se tem notícia da determinação da relação causal entre o dano oxidativo e a mutação da proteína p53 nas lesões adenomatosas do cólon, como proposto neste estudo.

* NIS® for Windows

2. Objetivo

O objetivo deste estudo é verificar a relação causal entre o dano oxidativo ao DNA e a mutação da proteína p53 no adenoma e adenocarcinoma colorretal.

3. Método

Previamente à realização desse estudo prospectivo caso-controle, o projeto foi submetido ao **Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (USF)**, segundo resolução do **Conselho de Ética em Pesquisa da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde** (Resolução CNS 466/13), sendo aprovado sob o número 0219.0.142.000-10 (Anexo I).

3.1. Amostra

Foram utilizadas biópsias de cólon de 59 sujeitos de pesquisa, tendo sido calculado o n amostral que se mostrou suficiente para este estudo. Destes, sete biópsias de tecido cólico oriundos de pacientes submetidos à colonoscopia com indicação de rastreio para neoplasia de cólon e que não apresentavam qualquer comorbidade, ora adiante entendidos como voluntários saudáveis e, 52 biópsias de lesões adenomatosas do cólon, respectivamente, 23 adenomas e 29 adenocarcinomas.

Foram excluídos pacientes com menos de 18 anos, portadores de doenças inflamatórias intestinais, pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante, que poderiam incrementar a produção dano oxidativo ao DNA, e/ou com história clínica sugestiva de doença polipoide intestinal, além de pólipos diagnosticados como hiperplásicos e/ou inflamatórios.

Os sujeitos da pesquisa foram submetidos ao preparo para colonoscopia segundo o protocolo da UNIFAG (Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia) onde foram realizadas as colonoscopias.

Nos voluntários saudáveis foi realizada biópsia aleatória no cólon. Quando se tratava de lesões, foram colhidas duas biópsias, sendo uma da própria lesão e uma segunda amostra em tecido macroscopicamente normal a cinco centímetros (cm) proximal à lesão. Nenhuma técnica de magnificação de imagem foi utilizada. Fragmentos da lesão e do tecido normal foram retirados, portanto, do mesmo segmento

do cólon e divididos em partes para as diferentes análises, a saber: diagnóstico anatomopatológico, quantificação da p53 e determinação do dano oxidativo.

3.2. Conservação das amostras

Imediatamente após a obtenção dos fragmentos, as biópsias da lesão e do tecido normal adjacente, destinadas ao Ensaio Cometa, foram preservadas em *RNAlater* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e mantidas a -80°C até o momento da análise, enquanto os espécimes destinados ao estudo anatomopatológico e imunoistoquímico foram fixados em formalina tamponada a 10%, para conservação dos espécimes.

3.3. Estudo Histopatológico

Para a realização do estudo histopatológico todos os espécimes previamente fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em blocos de parafina. Três cortes de quatro μm foram obtidos, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para diagnóstico.

O estudo histopatológico foi realizado por dois patologistas experientes, em consenso e que não tiveram acesso aos demais aspectos do estudo, determinando tratar-se de tecido cólico normal, adenoma ou adenocarcinoma.

3.4. Estudo Imunoistoquímico

3.4.1. Imunocoloração

Para a realização do estudo imunoistoquímico todos os espécimes previamente fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina foram submetidos a dois cortes adicionais de quatro μm e depositados em lâminas previamente silanizadas. Os cortes foram desparafinados por três banhos sucessivos de cinco minutos em xilol e três banhos em etanol absoluto. A seguir, as lâminas foram acondicionadas em recipiente próprio e submersas em solução tampão fosfato de sódio (*PBS*) 0,05 M e pH 7,2 por 10 minutos. Foi realizado bloqueio das peroxidases endógenas pelo gotejamento de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 3% em câmara úmida à temperatura ambiente

durante 10 minutos, seguido de mais uma lavagem com *PBS* por 10 minutos. Terminada esta etapa, realizou-se recuperação antigênica. As lâminas foram acondicionadas em cuba com solução de citrato 10 mM em pH 6,0, submetidas ao calor em banho-maria à temperatura de 35°C por período de 40 minutos e, ao final deste processo, deixadas esfriar por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo realizada lavagem com *PBS* por cinco minutos. O anticorpo primário monoclonal anti-p53 (Monoclonal Mouse Anti-human p53 protein. Clone DO-7. Dako Cytomation® Copenhagen) foi utilizado, por marcar especificamente a proteína mutada no tecido cólico neoplásico. (Vojtěšek *et al.*, 1992)

Para o controle negativo foi utilizada a amostra sem o anticorpo primário e para o controle positivo utilizou-se a tonsila humana, conforme manual do fabricante*.

Foi utilizado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC- Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) adaptado às condições laboratoriais. As lâminas foram incubadas com o anticorpo específico diluído em albumina bovina (Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA) na proporção de 1:800 durante 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas em tampão *PBS*, com três trocas de três a cinco minutos e incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IG - Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) diluído em albumina bovina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se as etapas: lavagem em tampão *PBS* com três trocas de cinco minutos cada; incubação com o complexo ABC diluído em tampão Tris, durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em tampão *PBS* com três trocas de três a cinco minutos cada; revelação com solução de diaminobenzidina 0,6% (DAB - Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,06%. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto, e novamente lavadas em água corrente e água destilada. O processo final de desidratação das lâminas obedeceu às seguintes passagens: etanol 80%, etanol 90%, etanol absoluto, xilol 1, xilol 2, xilol 3. Após o processo de imunocoloração as lâminas foram montadas com lamínula e resina.

* Disponível em http://www.dako.com/br/ar38/p105510/prod_products.htm

3.4.2. Quantificação da proteína p53

O estudo imunistoquímico de p53 tecidual avaliou o conteúdo da proteína por processamento de imagem auxiliado por computador.

O sistema de captação de imagem é composto por câmera Digital Color (Samsung[®] SCC 131), acoplada a microscópio (Nikon[®] α -photo-2-YSC), ligado a monitor (Dell[®], 17 polegadas), e ao computador (Dell-Dimension[®], processador Pentium 4, dual-core, 1.8 Mb, plataforma Windows XP[®]).

O processamento da imagem é formado por níveis de cores e tonalidades distintas permitindo a visualização de estruturas. A imagem gravada, observada na tela do monitor, é captada por programa de aquisição de imagem. Ao selecionar determinada estrutura tecidual, no caso a imunocoloração nuclear, apenas ela é observada de modo colorido. Somente a estrutura composta pelos números resultantes da combinação *RGB* (*Red, Green, Blue*) que o usuário selecionou aparece colorida na tela do monitor, deixando escuro todo o restante da tela.

As imagens foram analisadas em programa específico (NIS for Windows) que associa a tabela de cores aos valores numéricos dos pontos que compõem a imagem e permite ao usuário tomar conhecimento da quantidade de imunocoloração em todo o campo visibilizado. A mensuração foi executada com aumento de 400X em área representativa da neoplasia. A média de três medidas da mesma lâmina em campos distintos foi considerada a medida final do conteúdo de imunocoloração da p53.

3.5. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista.

Para a detecção de dano oxidativo ao DNA foram utilizadas os fragmentos previamente armazenados de:

- a. Tecido cólico normal de voluntários saudáveis;

- b. Tecido tumoral oriundo de pacientes portadores de adenomas e adenocarcinomas e;
- c. Tecido não tumoral, macro e microscopicamente, adjacente ao tumor, oriundos de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma.

Os espécimes foram incubados em 3 mL de solução de Hanks' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 5,5 mg de proteinase K (Sigma Chemical CO[®], St. Louis, MO) e 3 mg de colagenase IV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 45 minutos a 37°C para a liberação das células. Após, foram ressuspensas em 10 mL de HBSS (Life Technologies, USA) e centrifugadas, para o seu isolamento. Alíquotas foram retiradas e a viabilidade celular foi avaliada por meio do azul de Tripán. A análise das amostras obedeceu à viabilidade mínima superior a 75%.

Foram pipetadas 15 µL da suspensão celular viável em lâmina previamente coberta em agarose *low melting point* 0.5% (Sigma Chemical CO[®], St. Louis, MO), sendo coberta com lamínula. Estas foram imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C *overnight*. Subsequentemente, foram expostas a tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH~13,4) por 40 min a 4°C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4°C por 30 minutos a 25 V e 300 mA. As lâminas foram então neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com SYBR[®] Safe[™] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e analisadas com microscópio de fluorescência. Cem células de cada replica foram aleatoriamente selecionadas e analisadas.

Com auxílio do software Komet 5.5[®] (Kinetic Imaging, USA) obteve-se valor da extensão da cauda do cometa, Tail Moment (TM), sendo seus valores médios determinados. Segundo o manual do fabricante, o TM é definido como o produto do comprimento da cauda e da fração de DNA total contido nela. O tamanho da cauda reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA com dano oxidativo, e foi quantificado por métodos de intensificação de imagem.

3.6. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$), mediante os seguintes modelos: estatística descritiva, medidas de tendência central, teste de normalidade, análise de variância, testes de associação e correlação parcial. Para determinação da linha de corte da p53 mutada foi utilizado o valor máximo encontrado em tecido cólico de voluntários saudáveis, enquanto para determinação da linha de corte de dano oxidativo ao DNA, foi utilizado o limite superior do intervalo de confiança a 95%, por não se tratar de distribuição normal. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística SPSS[®] for Windows^{*}, versão 13.0.

* IBM

4. Resultados

4.1. Casuística

Foram utilizadas biópsias de 59 indivíduos, sendo sete voluntários saudáveis com tecido cólico considerado normal e em 52 pacientes com lesão diagnosticada como adenoma ou adenocarcinoma ao estudo histopatológico, sendo 32 mulheres e 27 homens (Figura 1).

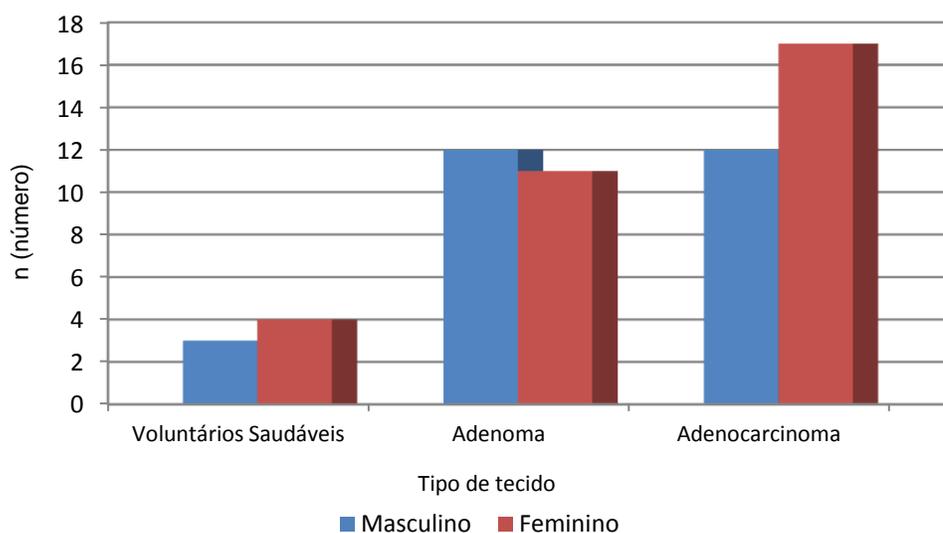


Figura 1: Casuística quanto ao sexo distribuída conforme diagnóstico

A média de idade dos voluntários saudáveis foi 59 anos, sendo quatro do sexo feminino e três do sexo masculino; nos pacientes portadores de adenoma colorretal a média de idade foi 57 anos, sendo 12 homens e 11 mulheres e nos pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal foi 58 anos, sendo 17 mulheres e 12 homens (Figura 2).

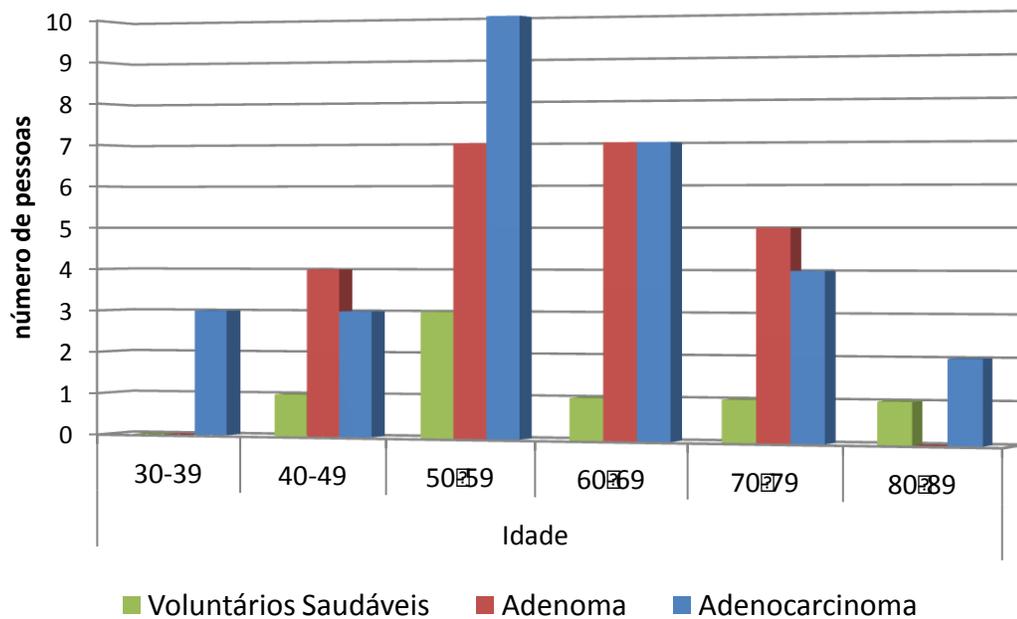


Figura 2: Casuística quanto ao diagnóstico distribuído conforme a faixa etária

4.2. Estudo histopatológico

Pelo diagnóstico histopatológico, sete pacientes voluntários apresentaram padrão de cólon sem alterações (Figura 3), 23 lesões foram classificadas como pólipos adenomatosos (Figura 4) e, 29 foram diagnosticadas como adenocarcinoma (Figura 5). Todos os tecidos adjacentes às lesões foram diagnosticados como tecido normal ao HE.

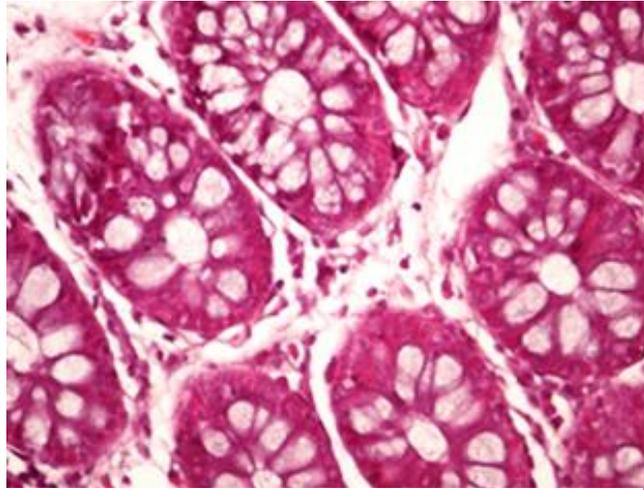


Figura 3: Fotomicrografia. Tecido cólico normal. Ausência de atipia celular, conformação glandular normal. Hematoxilina-Eosina (HE): 400X

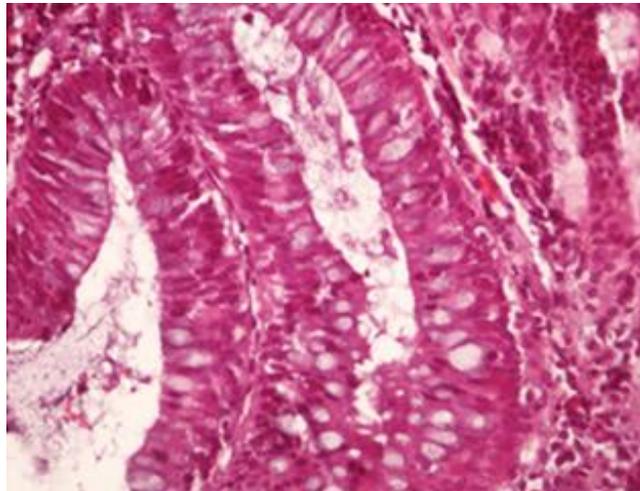


Figura 4: Fotomicrografia. Adenoma de cólon. Notar a atipia celular e perda da polaridade nuclear. Hematoxilina-Eosina (HE): 400X

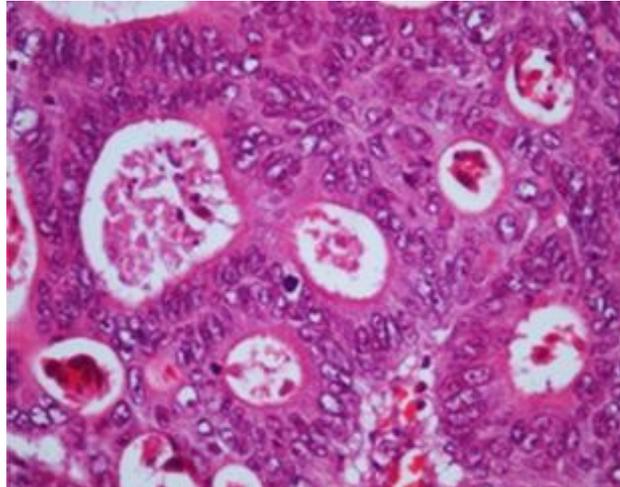


Figura 5: Fotomicrografia. Adenocarcinoma de cólon. Notar a atipia celular pronunciada, perda da polarização celular, inversão da relação núcleo/citoplasma, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes e frequentes figuras de mitose. Hematoxilina-Eosina (HE): 200X

4.3. Expressão de p53

A expressão da p53 no tecido normal dos voluntários saudáveis (Figura 6) variou de 0,00 a 0,08 U/pixel, com mediana de 0,00 U/pixel.

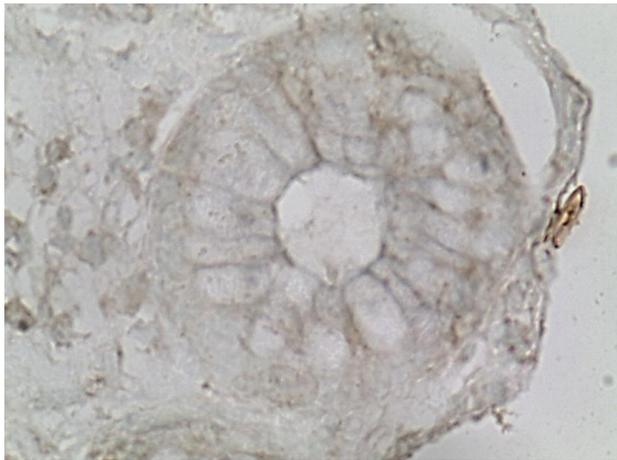


Figura 6: Fotomicrografia. Expressão de p53 em tecido cólico normal de voluntário saudável. Imunoistoquímica: 400X

Já no tecido cólico normal dos pacientes com adenoma (Figura 7) a expressão variou entre 0,00 U/pixel e 0,57 U/pixel, com mediana de 0,05 U/pixel.

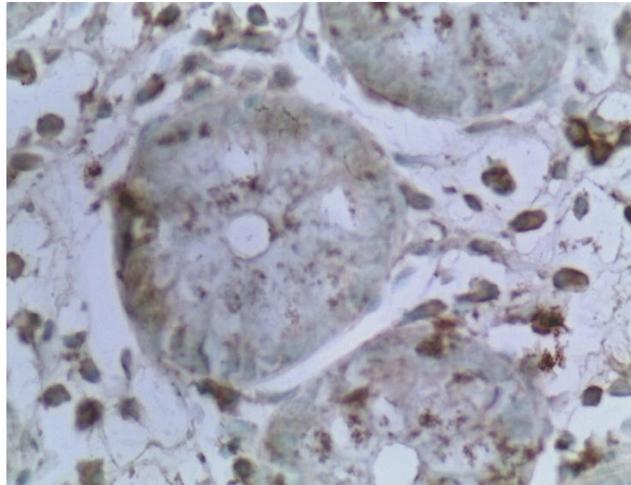


Figura 7: Fotomicrografia. Expressão de p53 em tecido cólico normal adjacente ao adenoma. Imunoistoquímica: 400X

No tecido cólico normal dos pacientes com adenocarcinoma (Figura 8) a expressão variou entre 0,00 U/pixel e 0,96 U/pixel, com mediana de 0,03 U/pixel, não havendo diferença entre o tecido normal dos pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma ($p=0,68$).

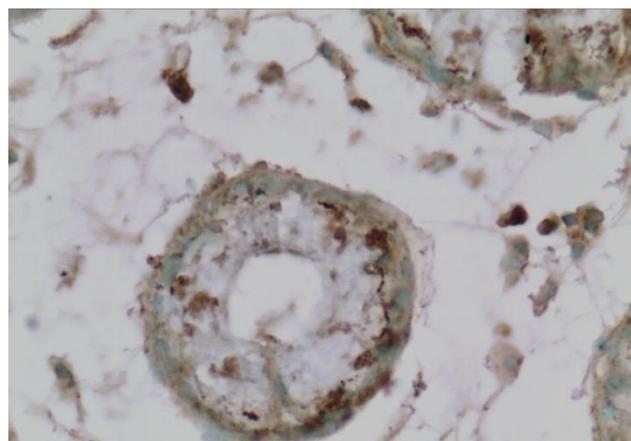
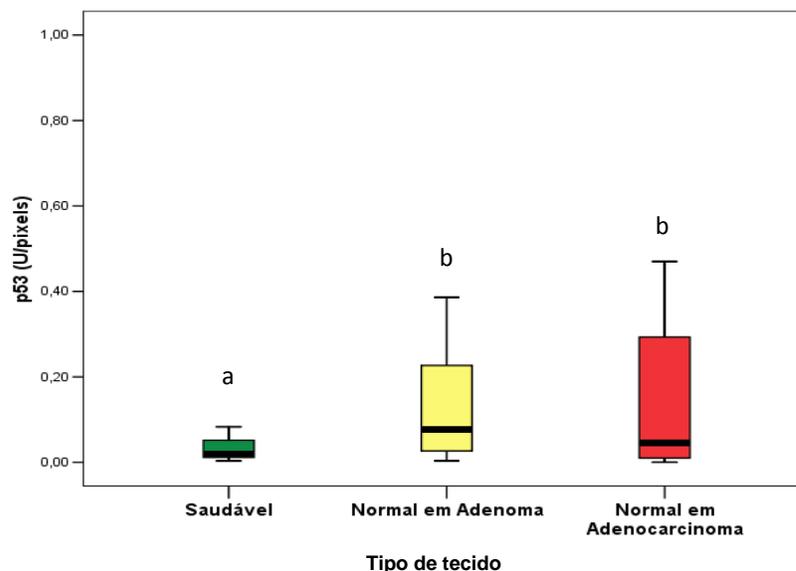


Figura 8: Fotomicrografia. Expressão de p53 em tecido cólico normal adjacente ao adenocarcinoma. Imunoistoquímica: 400X

Entre o tecido normal de voluntários saudáveis e tecido normal de pacientes com tumor, adenoma e adenocarcinoma, houve diferença significativa ($p=0,01$) maior na expressão da p53 no segundo grupo (Figura 9).



◇ Análise de variância
a tecido normal de voluntários saudáveis
b tecido não tumoral adjacente ao adenoma e adenocarcinoma

Figura 9: Representação dos valores da expressão imunohistoquímica de p53 em tecido normal de voluntários saudáveis e no tecido não tumoral adjacente ao adenoma e adenocarcinoma. Nota-se ausência de diferença estatística entre tecido normal adjacente às lesões adenomatosas (b X b) ($p=0,68$), enquanto há diferença quando comparados tecido normal e normal em paciente com lesão (a X b) ($p=0,01$)

A expressão da p53 no adenoma (Figura 10) variou de 0,12 U/pixel a 3,99 U/pixel, com mediana de 1,25 U/pixel. Já no adenocarcinoma (Figura 11) a mediana foi 2,08 U/pixel (0,00 U/pixel e 17,42 U/pixel), não havendo diferença estatística entre pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma ($p=0,3$).

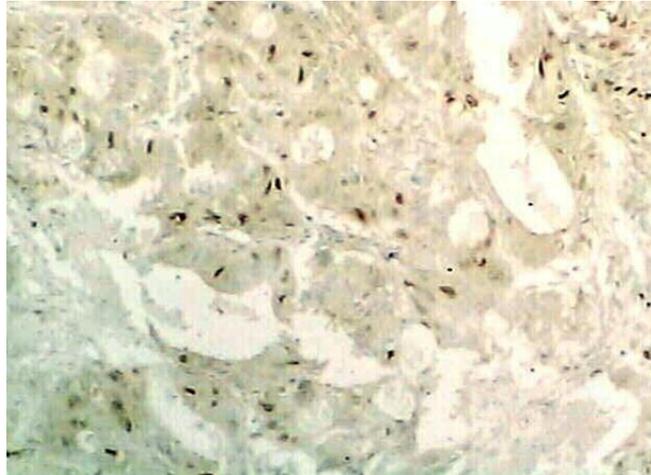


Figura 10: Fotomicrografia. Expressão moderada de mutação de p53 em adenoma. Notar a imunocoloração nuclear acastanhada. Imunoistoquímica: 100X

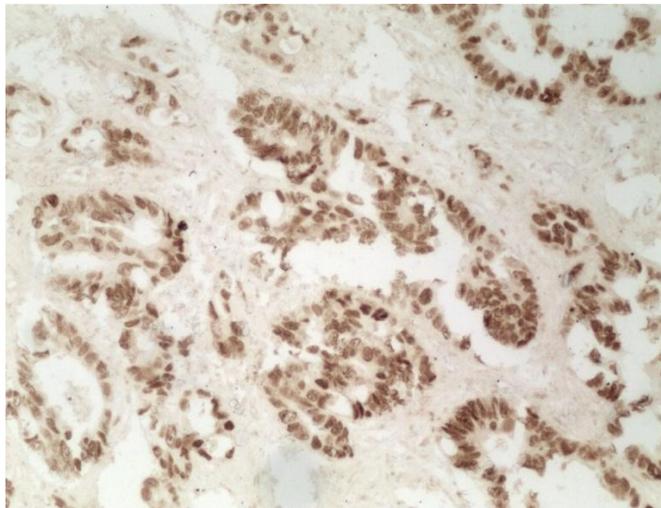
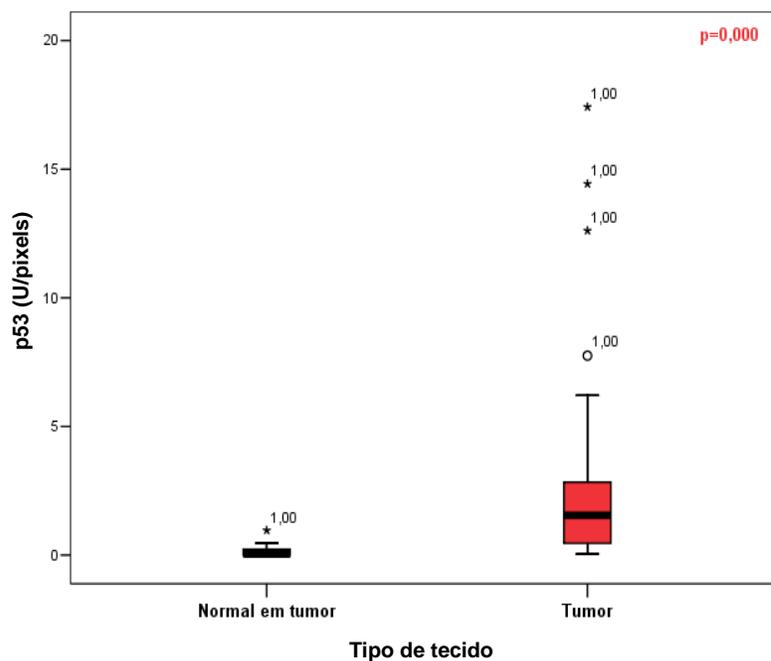


Figura 11: Fotomicrografia. Expressão intensa de mutação de p53 em adenocarcinoma. Notar a imunocoloração nuclear acastanhada em grande quantidade. Imunoistoquímica: 100X

A expressão da p53 no tecido normal adjacente ao tumoral variou de 0,00 U/pixel a 0,96 U/pixel com mediana de 0,04 U/pixel, e no tecido tumoral (adenoma e adenocarcinoma) variou de 0,00 U/pixel a 17,42 U/pixel, com mediana de 1,32 U/pixel, com diferença estatística $p=0,00$ (Figura 12).



◇ Análise de variância
 p =significância

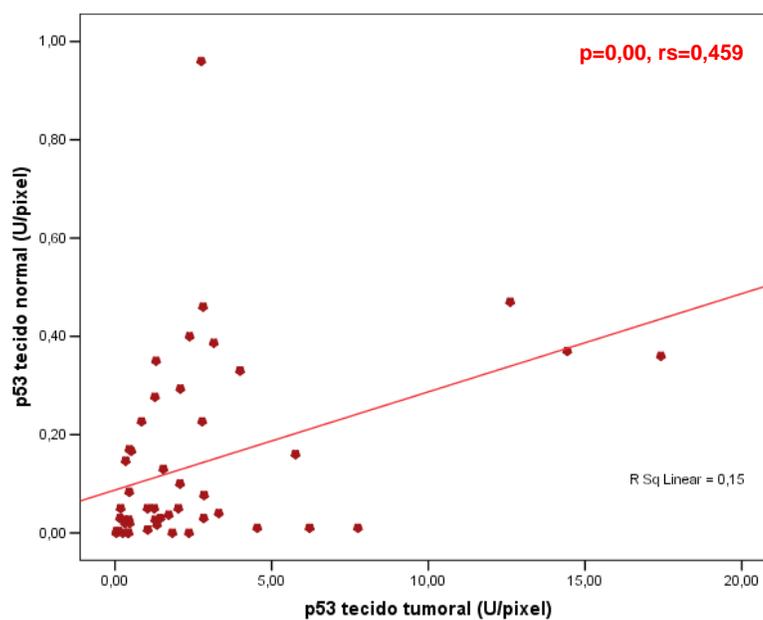
Figura 12: Representação dos valores da expressão imunoistoquímica de p53 em tecido normal adjacente ao tumoral e tecido tumoral (adenoma e adenocarcinoma)

A casuística demonstrou mutação de p53 em cerca de 85% dos casos de lesões adenomatosas. Cerca de 80% e 90% dos pacientes com adenoma e adenocarcinoma, respectivamente, apresentaram valores de p53 maiores que 0,08U/pixel, valor máximo encontrado em tecido cólico de voluntários saudáveis. No tecido considerado normal adjacente ao adenoma 43% dos pacientes demonstrou mutação da p53 e no tecido adjacente ao adenocarcinoma 34% dos pacientes demonstrou mutação da p53 (Tabela 1).

Tabela 1: Ocorrência de mutação da p53 em pacientes com adenoma e adenocarcinoma colorretal

Tecido		Ausência de mutação de p53 n/total (%)	Presença de mutação de p53 n/total (%)
Adenoma	Não Tumoral	13/23 (56,52)	10/23 (43,47)
	Tumoral	4/23 (17,40)	19/23 (82,60)
Adenocarcinoma	Não Tumoral	19/29 (65,51)	10/29 (34,48)
	Tumoral	3/29 (10,35)	26/29 (89,65)

A correlação de Spearman entre p53 no tecido normal e no tumor mostrou $rs=0,459$ com $p=0,00$ (Figura 13).



◇ Correlação de Spearman
 p =significância; rs =coeficiente de Spearman

Figura 13: Representação gráfica da correlação entre a p53 no tecido normal e tecido tumoral. Nota-se aumento da expressão de p53 mutada em tecido normal proporcional ao aumento da expressão da p53 mutada no tecido tumoral do mesmo paciente

4.4. Medida do dano oxidativo ao DNA

O dano oxidativo ao DNA no tecido normal (Figura 14) dos voluntários saudáveis variou de 0,53 TM a 2,79 TM, com mediana de 1,04 TM; no tecido cólico normal dos pacientes com adenoma a expressão mediana foi 0,56 TM (0,00 TM e 3,11 TM); no tecido cólico normal dos pacientes com adenocarcinoma a mediana foi 0,79 TM (0,45 TM e 3,09 TM) não havendo diferença estatística ($p=0,07$) entre os três grupos (Figura 15).

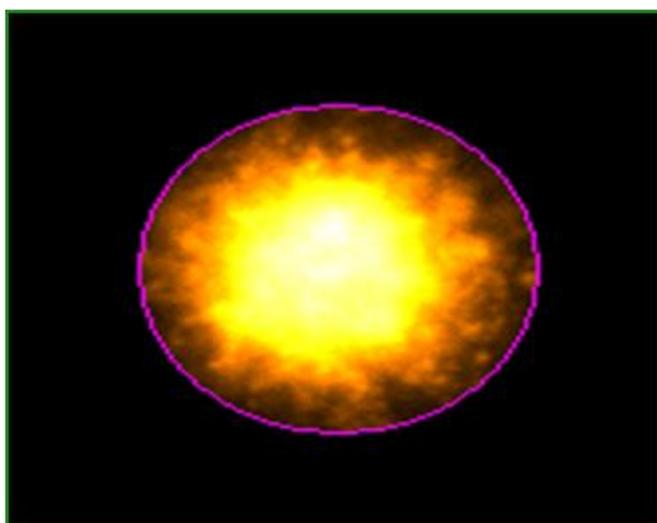
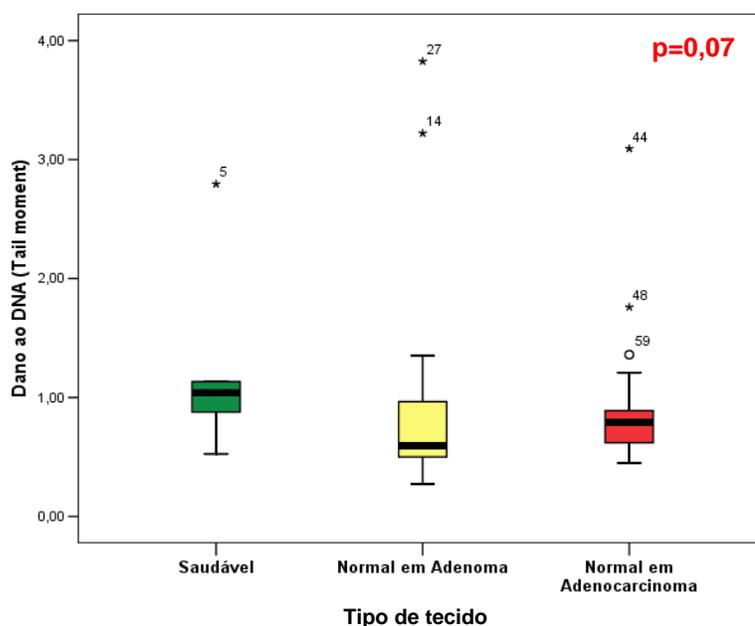


Figura 14: Fotomicrografia. Dano oxidativo ao DNA em célula de cólon normal. Notar ausência de formação de cauda. Ensaio Cometa



◇ Análise de variância
p=significância

Figura 15: Representação dos valores do dano oxidativo ao DNA em tecido normal de voluntários saudáveis, no tecido normal adjacente ao adenoma e ao adenocarcinoma colorretal

O dano oxidativo ao DNA no adenoma (Figura 16) variou de 0,40 a 11,13 TM, com mediana de 2,07 TM; no adenocarcinoma (Figura 17) a mediana foi 2,13 TM (0,72 TM e 4,65 TM) não havendo diferença estatística entre os pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma ($p=0,48$). Nota-se diferença significativa ($p=0,00$) maior do dano, quando se compara o tecido normal adjacente ao tecido tumoral com o tecido tumoral (adenoma e adenocarcinoma) (Figura 18).

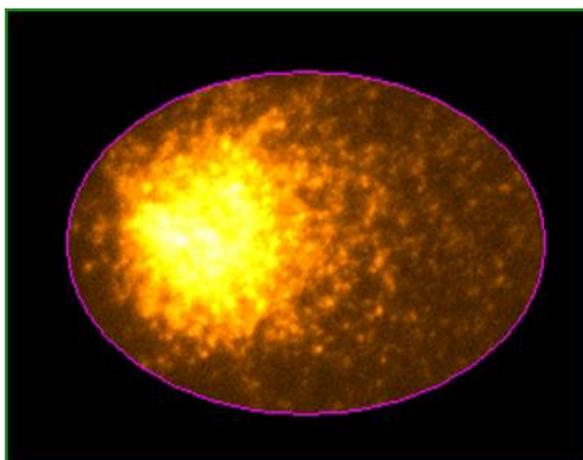


Figura 16: Fotomicrografia. Dano oxidativo ao DNA em célula de adenoma de cólon. Notar fragmentação nuclear moderada do DNA caracterizada pela formação de cauda (Tail Moment). Ensaio Cometa

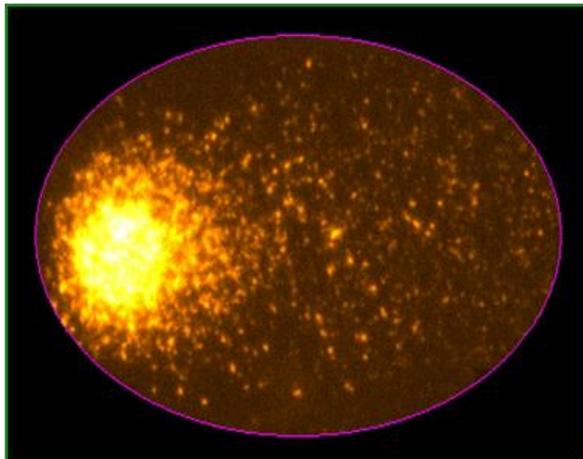
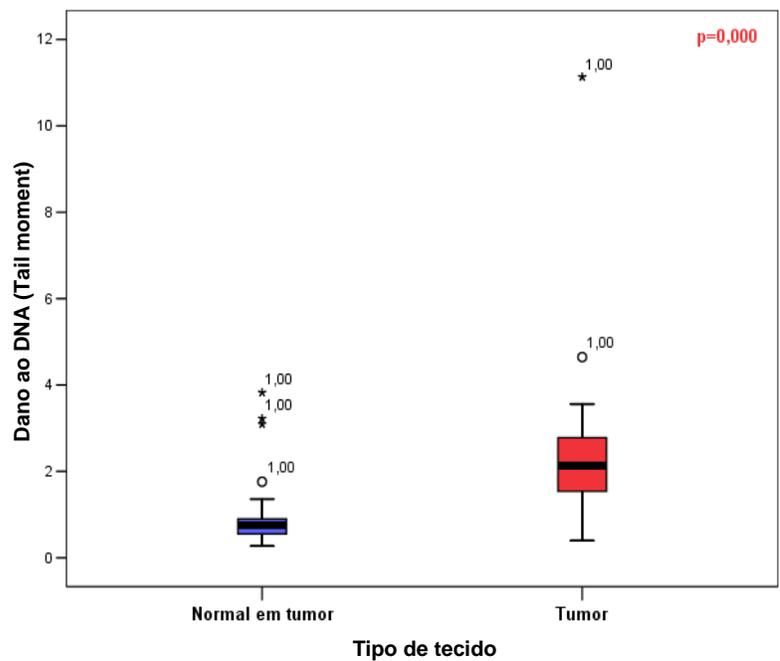


Figura 17: Fotomicrografia. Dano oxidativo ao DNA em célula de adenocarcinoma de cólon. Notar fragmentação nuclear intensa caracterizada pela formação da cauda (Tail Moment). Ensaio Cometa



◇ Análise variância
p=significância

Figura 18: Representação dos valores do dano oxidativo ao DNA em tecido normal adjacente ao tecido tumoral e no tecido tumoral (adenoma e adenocarcinoma)

A correlação de Spearman entre o dano oxidativo no tecido normal e no tumor demonstrou $r_s=0,439$ com $p=0,00$ (Figura 19).

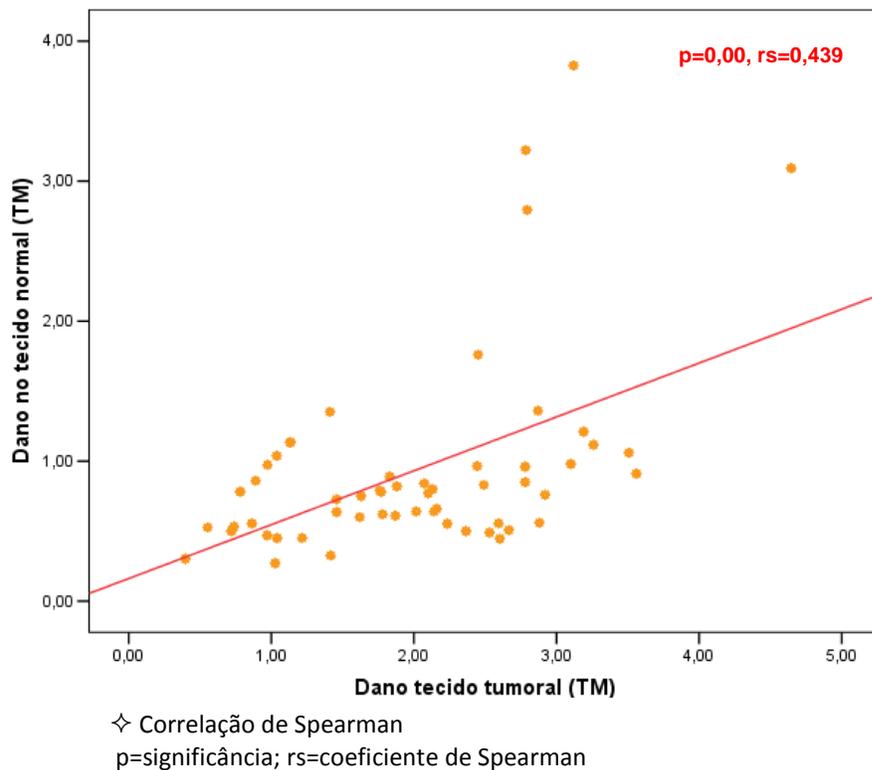
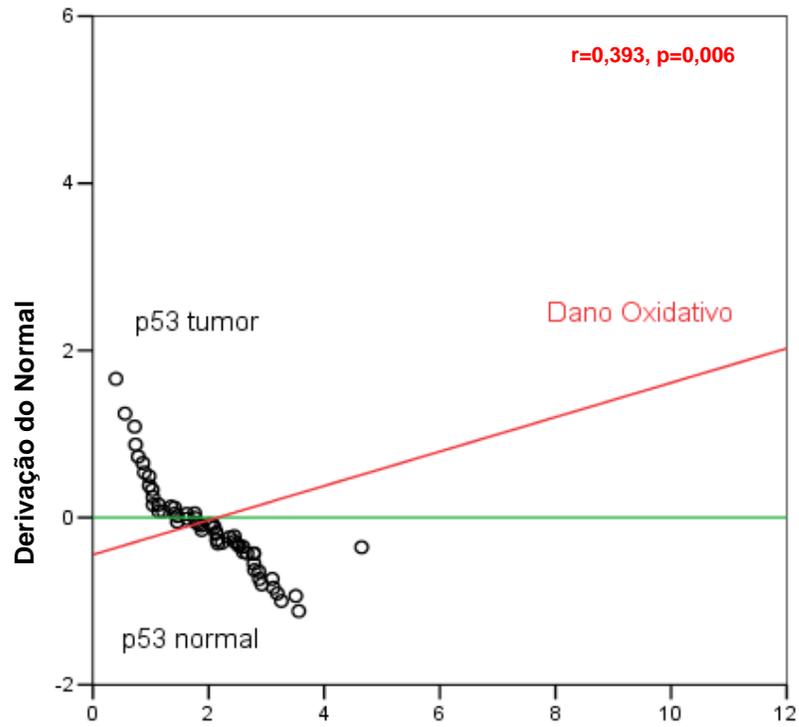


Figura 19: Representação gráfica da correlação entre o dano oxidativo ao DNA no tecido normal e tecido tumoral. Notar aumento do dano oxidativo ao DNA em tecido normal proporcional ao aumento de dano oxidativo ao DNA no tecido tumoral do mesmo paciente

4.5. Relação entre Dano oxidativo ao DNA e expressão da p53

Em 57% dos casos de adenoma observou-se intenso dano oxidativo, superior ao intervalo de confiança de 95%, relacionado à p53 mutante, enquanto nos adenocarcinomas, este valor foi de 66%.

A correlação parcial entre o dano oxidativo ao DNA e a p53 mutante mostrou $r=0,393$ com $p=0,006$. Não foi possível demonstrar correlação causal da p53 mutante sobre o dano oxidativo ao DNA ($r=0,248$ com $p=0,083$). (Figura 20)



◇ Correlação Parcial,
 p=significância; r=coeficiente de Correlação Parcial

Figura 20: Representação gráfica da Correlação Parcial demonstrando o fator causal do dano oxidativo sobre a p53 mutada

5. Discussão

5.1. Quanto ao Método

5.1.1. Quanto à Casuística

Nos últimos anos a incidência de CCR parece ter atingido uma plataforma nas áreas de alto risco e tem aumentado nas áreas antes consideradas de baixo risco. Supõe-se que isso se deva ao envelhecimento das populações, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e ao aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis, (American Cancer Society, 2013) o que torna o estudo desta entidade nosológica de extrema importância no Brasil, onde se demonstra processo de inversão da pirâmide populacional e mudanças de hábitos alimentares à semelhança de países desenvolvidos.

Compatível com a presente amostra, o risco para CCR é maior após os 50 anos de idade. Há coincidência quanto à faixa etária estudada na presente casuística e a população mundial, demonstrando maior incidência entre a 5ª e 6ª décadas de vida. (Instituto Nacional do Câncer, 2011; American Cancer Society, 2013)

A razão de incidência entre sexo masculino e feminino na literatura (M:F) para esse câncer varia na literatura entre 1,4:1 e 1:1, (Instituto Nacional do Câncer, 2011; American Cancer Society, 2013) semelhante aos resultados encontrados no presente estudo que demonstrou razão de 0,85:1. Demonstra-se, desta forma, que a presente amostra é representativa da população estudada.

5.1.2. Quanto à escolha da quantificação da p53 por imunistoquímica

A quantificação nas ciências biomédicas tem como meta promover a objetividade nas medidas para estabelecer o diagnóstico, tornar mais precisa a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos em pesquisas ou na rotina de laboratório, permitindo relacionar as diferentes estruturas anatômicas com suas funções. A aplicação de método quantitativo possibilita o aperfeiçoamento da

capacidade de se estabelecer diagnóstico, o prognóstico e estudar a apresentação de componentes celulares.

Atualmente, os métodos auxiliados por computador ganharam meio próprio de divulgação*, tendo sido publicados centenas de estudos com aplicações diversas, nas ciências da saúde.

Em nosso meio estão disponíveis vários programas destinados a este fim, com venda comercial (Image Pro[®], Image Pro-Plus^{®**}, NIS[®] for Windows^{®***}), ou de domínio público (ImageJ^{****}), ou ainda, para utilização interna na instituição onde foi desenvolvido (DIRACOM[®]). (Novelli, 1992)

Com a finalidade de cumprir os objetivos deste estudo, optou-se por imunistoquímica com leitura assistida por computador por ser método de fácil execução e com alta reprodutibilidade, além da extensa experiência demonstrada pelo grupo na execução deste tipo de análise. (Priolli, 1999; Priolli *et al.*, 2003; Priolli *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2010; Priolli *et al.*, 2013a; Priolli *et al.*, 2013b)

O clone D-O7 para imunomarcagem foi escolhido por marcar a proteína p53 mutada no adenocarcinoma de cólon, conforme manual do fabricante (Dako^{®*****}) distintamente do que ocorre em outros carcinomas, como no seroso ovariano, de células transicionais de bexiga e de células escamosas. Segundo relatos da literatura (Vojtěšek *et al.*, 1992; Pinho, 2000) a instabilidade da p53 selvagem, a qual permanece no tecido apenas por alguns segundos, impossibilita a sua marcação imunistoquímica tecidual, tornando o método bastante específico para a marcação da proteína p53 mutada nas lesões adenomatosas de cólon.

Métodos como o Western blotting e a PCR apresentam a limitação de visibilização fotográfica, o que acrescenta ao sistema assistido por computador, com

* Journal Computer Assisted Learning

** Media Cybernetics

*** Nikon

**** RSB

***** Disponível em http://www.dako.com/br/ar38/p105510/prod_products.htm

possibilidade de documentação fotográfica simples, vantagem adicional, conforme apresentado neste estudo.

5.1.3. Quanto ao Ensaio Cometa

A quantificação do estresse oxidativo em bases do DNA apresenta grande interesse, por permitir a melhor compreensão do seu papel nas diferentes etapas do processo de carcinogênese. (Pool-Zobel *et al.*, 1999) Durante os últimos anos diferentes métodos bioquímicos e analíticos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar a presença do estresse oxidativo nos tecidos humanos. Habitualmente, a quantificação do dano oxidativo envolve técnicas de extração do DNA dos tecidos e análise por cromatografia a gás ou técnicas imunoistoquímicas. Geralmente estas técnicas não podem ser aplicadas para pequenos fragmentos de tecidos obtidos por biópsia, em virtude dos limites relacionados à sua metodologia. Por esta razão, encontram-se poucos estudos que analisaram comparativamente a intensidade de estresse oxidativo em diversos tecidos presentes na evolução do processo de carcinogênese colorretal. (Oliva *et al.*, 1997; Pool-Zobel e Leuncht, 1997; Kondo *et al.*, 1999; Pool-Zobel *et al.*, 1999; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a)

A mensuração do dano oxidativo ao DNA é essencial para o melhor entendimento dos mecanismos etiopatogênicos do estresse oxidativo e seus efeitos moleculares. A possibilidade de mensurar o dano oxidativo ao DNA em pequenos fragmentos de tecido da mucosa cólica em diversos estágios da carcinogênese poderia contribuir para melhor compreensão do papel representado pelas EROs em todas as etapas do desenvolvimento do CCR.

A opção pelo Ensaio Cometa, ou eletroforese em gel de célula única, ocorreu por este ser um método de estudo genotóxicológico (clastogenicidade) sensível que avalia dano oxidativo ao DNA em célula individual e possibilita quantificar quebras da fita. Possui custo relativamente baixo, rapidez, precisão e reprodutibilidade. (Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a)

O Ensaio Cometa permite, de maneira simples e precisa, a quantificação dos níveis de dano oxidativo ao DNA de pequenas quantidades de tecido obtidos a partir de biópsias. (Pool-Zobel *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Ladeira *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a) Talvez uma de suas maiores vantagens seja possibilitar a quantificação do dano oxidativo ao DNA de uma única célula, o que permite a interpretação individualizada do estresse oxidativo à mucosa cólica nos diversos estágios da carcinogênese. Vantagem adicional é o fato de poder quantificar a lesão ao DNA resultante da agressão após a ação dos sistemas de reparo, ou seja, demonstrar o resultado final produzido pelo equilíbrio/desequilíbrio entre fenômenos oxidantes e antioxidantes no tecido.

5.1.4. Quanto à Correlação de Spearman

O procedimento de correlações bivariáveis, Spearman, afere como a variável ou a ordem das variáveis está relacionada. Após a determinação do coeficiente r_s , os *outliers* são excluídos e é traçada a relação linear. Duas variáveis relacionadas demonstram a associação entre elas de forma diretamente proporcional quando o coeficiente for + (positivo), ou inversamente proporcional quando tratar-se de coeficiente - (negativo). Desta forma permite obter a relação entre a p53 e o dano oxidativo nos tecido normal e adenomatoso correspondente. Isto permite identificar se há aumento na expressão da p53 mutada no tecido considerado histologicamente normal ao mesmo tempo em que ocorre aumento da expressão da p53 mutada no tecido adenomatoso da mesma forma que ocorre com o dano oxidativo ao DNA.

5.1.5. Quanto ao teste de Correlação Parcial

A correlação parcial descreve a relação linear entre duas variáveis, se controlada pelo efeito de uma ou mais variáveis adicionais. Este procedimento torna possível estabelecer uma relação causal, de acordo com indicações do manual do programa, e em acordo com o descrito por seu idealizador (Anexo II). Granger refere que “a *casualidade é definida de forma explícita e testável. Isto demonstra que quando duas variáveis podem ser discriminadas, o espectro cruzado entre elas pode ser considerado como a soma dos dois espectros estreitamente ligados com cada uma das causas.*”

(Granger, 1969) Desta forma, demonstra ser este o teste de escolha que atende ao objetivo de relacionar casualmente o efeito do dano oxidativo ao DNA à mutação da proteína p53, como proposto no presente estudo.

A correlação parcial demonstrou que a relação linear estabelecida pela mutação da p53 no tecido normal e adenomatoso, determinado pela correlação de Spearman, está sendo controlada pelo dano oxidativo ao DNA. O inverso, entretanto não é verdadeiro, já que não existiu significância quando se tentou estabelecer a correlação parcial entre o dano oxidativo ao DNA, no tecido normal e displásico encontrado na análise de Spearman, como controlado pela p53 mutante.

5.2. Quanto aos Resultados

5.2.1. Proteína p53 no tecido normal, adenoma e adenocarcinoma

A mutação da proteína p53, considerada como alteração decisiva no processo de malignização dos adenomas, é encontrada, segundo a literatura, em 60 a 80% dos casos de CCR. (Felin *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008) No presente estudo foi encontrado 90% de mutação da p53 quando adotado, como critério de corte, o valor máximo encontrado nos pacientes saudáveis, demonstrando-se, portanto, pouco superior aos índices encontrados na literatura. Em análises imunoistoquímicas, com adoção de medida semiquantitativa, adota-se o valor de até 10% de positividade da marcação da amostra como sendo negativo para mutação da p53, ou seja, como sendo de marcação de proteína selvagem. Justifica-se a linha de corte de 10%, baseando-se na instabilidade da p53 selvagem, a qual permite a imunomarcação em até cerca de 6 segundos. (Vojtěšek *et al.*, 1992; Pinho, 2000) A diferença encontrada no presente estudo parece demonstrar a maior sensibilidade para o método quantitativo, entretanto, seria necessário estudo comparativo, utilizando as técnicas semiquantitativa e quantitativa assistida por computador, na mesma amostra, para que esta hipótese pudesse ser confirmada.

A expressão da p53 mutada no tecido normal de pacientes com lesões adenomatosas foi maior que nos voluntários saudáveis, mostrando a presença de

alterações em pacientes portadores de adenomas e adenocarcinomas em tecido considerado normal pela análise por método convencional, macro e microscopicamente (HE). Este resultado sugere que métodos adicionais devam ser utilizados para determinação da margem cirúrgica livre de doença, tal como a imunohistoquímica (Priolli *et al.*, 2013b) e apontam para as alterações proteicas como sendo anteriores às modificações morfológicas no CCR. Felin e colaboradores demonstraram ausência de mutação da proteína p53 no tecido normal adjacente ao adenocarcinoma (Felin *et al.*, 2008) discordando dos resultados deste estudo que demonstrou 34% de mutação da p53 quando realizada a mesma comparação. Possivelmente a diferença se deva aos diferentes métodos utilizados para a quantificação da mutação da proteína. Enquanto no trabalho de Felin foi utilizado medida semiquantitativa, no presente estudo realizou-se quantificação assistida por computador, técnica que parece trazer maior sensibilidade à detecção desta alteração. Como discutido anteriormente, entretanto, trabalhos comparativos utilizando a mesma amostra deveriam ser feitos na busca da real sensibilidade e efetividade do método. Em acordo com nossos resultados, outros autores (Kaklamani *et al.*, 1993; Brand *et al.*, 2013) apontaram para a presença de mutação da p53 não apenas em tecido normal adjacente ao tumoral, assim como nos adenomas. Estes resultados sinalizam a presença de mutação da p53 nos processos iniciais da carcinogênese.

O resultado da correlação de Spearman demonstrou progressão linear e diretamente proporcional entre p53 no tecido normal e tumoral e permite assim a aplicação da hipótese de Granger quanto à determinação de um fator controlador para esta linearidade da p53, no caso, o dano oxidativo ao DNA.

5.2.2. Dano oxidativo no tecido saudável, adenoma e adenocarcinoma

O estresse oxidativo desencadeado pelas EROs induz instabilidade genômica em diferentes regiões cromossômicas, ocasionando mutações genéticas com consequente possibilidade de ganho proliferativo celular descontrolado. (Ames *et al.*, 1993) A relação entre estresse oxidativo, inflamação, pólipos adenomatosos e câncer torna-se evidente quando se demonstra níveis elevados de dano oxidativo ao DNA em células da mucosa cólica de doentes com retocolite ulcerativa inespecífica de longa

duração e que desenvolveram displasias de alto grau e CCR. (Halliwell e Gutteridge, 1990; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006) Resultados semelhantes foram encontrados por estudos que compararam os níveis de dano oxidativo ao DNA em portadores de gastrite e neoplasia gástrica associada ou não à presença da *Helicobacter pylori*. (Ladeira *et al.*, 2008)

A possibilidade de quantificar o dano oxidativo ao DNA nas células torna-se estratégia interessante para avaliar o equilíbrio entre agressão e resposta do organismo às EROs na carcinogênese. A avaliação dos níveis de dano oxidativo, nas diferentes etapas da carcinogênese colorretal, apresenta grande interesse por permitir a avaliação da eficácia de substâncias antioxidantes, que poderiam ser empregadas como medidas preventivas da agressão oxidativa inicial à mucosa cólica.

No presente estudo, observa-se aumento significativo de dano oxidativo ao DNA no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal adjacente e tecido normal de voluntários saudáveis. Na literatura, os resultados corroboram estes achados, tendo sido relatados níveis duas vezes mais elevados de 8-OHdG no tecido neoplásico de portadores de CCR quando comparado com tecido normal. (Oliva *et al.*, 1997) Vantagem do presente estudo, como dito anteriormente, é poder avaliar o resultado final produzido pelo desbalanço entre fenômenos oxidantes e antioxidantes no tecido quando se utiliza o Ensaio Cometa.

No presente estudo pode-se observar o comportamento linear e diretamente proporcional entre dano oxidativo ao DNA no tecido normal e tumoral, com aumento significativo nas lesões tumorais. Estes resultados se encontram em acordo com os achados da literatura, onde se demonstra, no tecido neoplásico, níveis de dano oxidativo ao DNA significativamente maiores quando comparados ao tecido normal. (Ames *et al.*, 1993; Ferreira e Matsubara, 1997; Oliva *et al.*, 1997; Pool-Zobel e Leucht, 1997; Kondo *et al.*, 1999; Pool-Zobel *et al.*, 1999; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Goodman *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a)

5.2.3 Quanto à relação entre dano oxidativo ao DNA e p53

A manutenção da estabilidade genética é de fundamental importância para qualquer forma de vida. Vários agentes ambientais e endógenos, como as EROs, podem modificar as propriedades estruturais das bases de DNA e, assim, danificar o DNA. Ao longo da última década, têm-se acumulado evidências na literatura indicando que lesões oxidativas do DNA desempenham papel importante no desenvolvimento do câncer, embora a investigação tenha demonstrado que é possível detectar danos oxidativos nos tecidos considerados normais. (Kondo *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2008; Balasubramanyam *et al.*, 2010; Redon *et al.*, 2010; Priolli *et al.*, 2013a)

Sob condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre a geração de EROs e os sistemas de defesa antioxidantes utilizados pelos organismos para inativar e proteger contra a toxicidade dos radicais livres. (Halliwell e Whiteman, 2004) O desequilíbrio oxidante e antioxidante cria uma condição conhecida como estresse oxidativo. Existem fortes evidências que sugerem que os produtos genotóxicos causam o evento inicial da lesão para as células do cólon. A exposição contínua das células a substâncias cancerígenas no lúmen do cólon é a maior causa de dano ao DNA nuclear. (Pool-Zobel e Leucht, 1997) Estudos epidemiológicos indicam que a carne vermelha, gordura e o consumo de álcool aumentam de forma significativa o risco de doença, enquanto a ingestão regular de vegetais e fibras parece diminuir o risco. (American Cancer Society, 2013) Aumento da formação de EROs no lúmen intestinal e exposição contínua da mucosa a estes radicais promovem as lesões oxidativas do DNA nas células epiteliais, desencadeando assim, o aparecimento de mutações genéticas. (Gedik *et al.*, 2002)

EROs têm sido implicadas como fatores patogênicos em uma variedade de doenças e no desenvolvimento do CCR. EROs podem atacar proteínas, lipídeos, açúcares e DNA. (Ames *et al.*, 1993) A estreita relação que existe entre as doenças crônicas inflamatórias intestinais e câncer colorretal, (Halliwell e Gutteridge, 1990; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006) e a relação entre o EROs e gastrite e câncer gástrico, (Ladeira *et al.*, 2004) reforçam a hipótese de que o processo inflamatório

crônico possa ser o evento inicial de carcinogênese. (Itzkowitz e Yio, 2004; Goodman *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2008) Autores mostraram associação inversa entre balanço oxidativo, que caracteriza exposições pró-oxidantes e antioxidantes, e adenoma colorretal. (Goodman *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a) Leung *et al.* ainda demonstraram que o estresse oxidativo aumenta durante a progressão do CCR ressecável para metástase hepática e não ressecável, como observado por esgotamento de vitaminas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica. (Leung *et al.*, 2008)

Os resultados do presente estudo demonstraram que há correlação entre o dano oxidativo ao DNA e a quantidade de p53 mutante. Em 66% dos casos de adenocarcinoma observou-se dano oxidativo intenso relacionado à mutação da p53, enquanto nos adenomas, este valor foi de 57%, corroborando os achados de Oliva *et al.* que, avaliando a expressão de vários genes relacionados à carcinogênese colorretal demonstrou que 71% dos doentes com altos níveis de estresse oxidativo apresentam elevados índices de mutação do TP53. (Oliva *et al.*, 1997) Destaca-se, desta forma, a importância da relação entre estresse oxidativo e mutações no gene TP53, que irá ser traduzido na produção da p53, elemento funcional celular. Desta forma, pode-se inferir que a ação das EROs sobre o TP53 determina mutações, provocando alterações no mecanismo de controle da apoptose celular programada, induzida pela p53 mutada.

Eventuais erros de pareamento provocados pela formação de 8-OHdG são reconhecidos pela proteína p53 normal e corrigidos por meio de proteínas de reparo, impedindo a perpetuação destas alterações no DNA. (Pool-Zobel *et al.*, 1999) Quando o dano oxidativo excede a capacidade de correção do DNA pelas proteínas de reparo, a proteína p53 normal reconhece o dano, induzindo a apoptose celular e impede a formação de clone de células mutantes. Já se demonstrou a importante relação existente entre deficiências no sistema de reparo e aumento nos níveis de dano oxidativo ao DNA em portadores de CCR. (Blasi *et al.*, 2006)

O radical OH é um dos agentes oxidantes mais frequentemente implicados no fenômeno de dano oxidativo. Supõe-se que a inflamação crônica da mucosa intestinal causada por EROs no lúmen cólico promova a hidroxilação no carbono 8 da base de

guanina para formar a 8-OhdG, com conseqüente transcriçãõ G>T, gerando uma proteíña defeituosa, a menos que haja uma correçãõ por meio de proteíñas de reparo. Quando estas mutações prejudicam os genes responsáveis pelo controle do ciclo celular ou do sistema de reparaçãõ do DNA, os clones de células com atividade proliferativa autônoma podem surgir, constituindo, assim, o mecanismo inicial para a carcinogênese colorretal. (Leung *et al.*, 2008; Pool-Zobel *et al.*, 1999; Obtulowicz *et al.*, 2010)

O Ensaio Cometa tornou possível determinar o dano oxidativo ao DNA resultante do processo de desbalanço oxidativo. Os resultados do presente estudo demonstram que o dano oxidativo ao DNA aumenta à medida que o tecido normal progride para a condiçãõ de adenoma e aumenta ainda mais na fase de progressãõ de adenoma para adenocarcinoma, do mesmo modo, pesquisas demonstram que os níveis de dano oxidativo ao DNA são significativamente mais elevados no tecido neoplásico do que em tecido normal. (Ferreira e Matsubara, 1997; Oliva *et al.*, 1997; Pool-Zobel e Leuncht, 1997; Kondo *et al.*, 1999; Pool-Zobel *et al.*, 1999; Seril *et al.*, 2003; Kawanishi *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Goodman *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013a)

Pelo presente estudo, por meio da correlaçãõ parcial, foi possível demonstrar relaçãõ de causalidade entre o dano oxidativo ao DNA e a mutaçãõ da p53 e não o inverso, ou seja, não há controle do dano oxidativo ao DNA pela p53. Desta forma seria razoável inferir, a partir deste resultado e associado aos achados da literatura, que quando não equilibrado, o dano oxidativo ao DNA resultará em mutaçãõ de genes, entre eles o TP53, e conseqüentemente de sua proteíña correspondente, p53, desencadeando proliferaçãõ descontrolada e impedimento da apoptose de células mutadas, iniciando assim o desenvolvimento de CCR.

6. Conclusão

Pode-se concluir, segundo o delineamento desta pesquisa, que o dano oxidativo ao DNA se relaciona à mutação da p53 apresentando-se como um fator causal da mutação da p53 no adenoma e adenocarcinoma colorretal.

7. Referências Bibliográficas

American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta, American Cancer Society, 2013.

Ames, B.; Shigenaga, M.; Hagen, T.. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90:7915–7922, 1993.

Balasubramanyam, M.; Adaikalakoteswari, A.; Sameermahmood, Z.; Mohan, V.. Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. **Methods Mol Biol**, 610:245–261, 2010.

Battacharya, P. K.; Barton, J. K.. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. **J Am Chem Soc**, 123:8649-56, 2001.

Blasi, M. F.; Ventura, I.; Aquilina, G.; Degan, P.; Bertario, L.; Bassi, C.; Radice, P.; Bignami, M.. A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. **Cancer Res**, Sep 15;66(18):9036-44, 2006.

Brand, L.; Munding, J.; Pox, C. P.; Ziebarth, W.; Reiser, M.; Hüppe, D.; Schmiegel, W.; Reinacher-Schick, A.; Tannapfel, A.. β -catenin, Cox-2 and p53 immunostaining in colorectal adenomas to predict recurrence after endoscopic polypectomy. **Int J Colorectal Dis**, 28:1091-1098, 2013.

Fearon, E. R.; Vogelstein, B.. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61:759-67, 1990.

Felin, C. R.; Rocha, A. B.; Felin I. P. D.; Regner, A.; Grivicich, I.. Expressão das proteínas p53 e Cox-2 em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente. **Rev Bras Coloproct**, 28(1):019-025, 2008.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Bras**, 43(1):61-8, 1997.

Fugita, A.; Severino, P.; Kojima, K.; Sato, J. R.; Patriota, A. G.; Miyano, S.. Functional clustering of time series gene expression data by Granger causality. **BMC Syst Biol**. 6: 137, 2012.

Gedik, C. M.; Boyle, S. P.; Wood, S. G.; Vaughan, N. J.; Collins, A. R.. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage, **Carcinogenesis**, 23(9):1441-1446, 2002.

Gold, P.; Freedman, S. O.. Demonstration of tumor-specific antigens in human carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. **J Exp Med**, 121:439-42, 1965.

Goodman, M.; Bostick, R. M.; Dash, C.; Terry, P.; Flanders, W. D.; Mandel, J.. A summary measure of pro- and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas. **Cancer Causes Control**, 19:1051–1064, 2008.

Granger, C. W. J.. Investigating causal relations by econometric models and cross-spectral methods. **Econometrica**, 37(3):424-438, 1969.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M.. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, 280(1):1-8, 1990.

Halliwell, B.; Whiteman, M.. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, 142(2):231–255, 2004.

Imlay, J.; Chin, S. M.; Linn, S.. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. **Science**, 240:640-2, 1998.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, INCA, 2011.

Itzkowitz, S. H.; Yio, X.. Inflammation and cancer. IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 287:G7-G17, 2004.

Kaklamani, L.; Gatter, K. C.; Mortensen, N.; Baigrie, R. J.; Heryet, A.; Lane, D. P.; Harris, A. L.. p53 expression in colorectal adenomas. **Am J Pathol**, Jan; 142(1): 87-93, 1993.

Kasai, H.; Nishimura, S.. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. **Nucleic Acids Symp Ser**, 12:165-7, 1983.

Kawanishi, S.; Hiraku, Y.; Pinlaor, S.; Ma, N.. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. **Biol Chem**, 387(4):365-72, 2006.

Kin, H.; Jen, J.; Vogelstein, B.; Hamilton, S. R.. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. **Am J Pathol**, 145:148-56, 1994.

Kondo, S.; Toyokuni, S.; Iwasa, Y.; Tanaka, T.; Onda, H.; Hiai, H.; Imamura, M.. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. **Free Radic Biol Med**, 27(3-4):401-10, 1999.

Ladeira, M. S. P.; Rodríguez, M. A. M.; Salvadori, D. M. F.; Queiroz, D. M. M.; Freire-Maia, D. V.. DNA Damage in Patients Infected by *Helicobacter pylori*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 13:631-7, 2004.

Ladeira, M. S.; Bueno, R. C.; Dos Santos, B. F.; Pinto, C. L.; Prado, R. P.; Silveira, M. G.; Rodrigues, M. A.; Bartchewsky, W. Jr.; Pedrazzoli, J. Jr.; Ribeiro, M. L.; Salvadori, D. M.. Relationship among Oxidative DNA Damage, Gastric Mucosal Density and the Relevance of cagA, vacA and iceA Genotypes of Helicobacter pylori. **Dig Dis Sci**, Jan;53(1):248-55, 2008.

Leung, E. Y.; Crozier, J. E.; Talwar, D.; O'Reilly, D. S.; McKee, R. F.; Horgan, P. G.; McMillan, D. C.. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. **Int J Cancer**, 123:2460–2464, 2008.

Lima, J. M.; Serafim, P. V. P.; Silva, I. D. C. G.; Forones, N. M.. Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer. **Arq Gastroenterol**, 43(1):8-13, 2006.

Martinez, C. A. R.; Waisberg, J.; Palma, T. R.; Silva, F. Z.; Cimerman, G.; Goffi, F. S.. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. **Acta Cir Bras**, 17(5):289-98, 2002.

Martinez, C. A. R.; Priolli, D. G.; Cardinalli, I. A.; Pereira, J. A.; Portes, A. V.; Margarido, N. F.. Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal: estudo de 100 casos. **Rev Col Bras Cir**, 35(4):235-243, 2008.

Martinez, C. A. R.; Cordeiro, A. T.; Priolli D. G.; Miranda, D. D. C.; Bartchewsky, Júnior W.; Margarido, N. F.; *et al.* Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dano oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. **Rev Bras Coloproct**, 29(3):303-313, 2009.

Matos, D.; Saad, S. S.; Franceschi Jr, O.; Barreto, E. P.; Novelli, M. D.. Estudo experimental comparativo entre anastomoses colônicas com sutura manual e com anel biofragmentável. **Rev Assoc Med Bras**, 39(4):201-6, 1993.

McGregor, D.. Carcinogenicidade and genotoxic carcinogens. In: Ballantyne, B.; T. Mars & T. Syversen, eds. **General and Applied Toxicology**. 2nd. edition. London, Macmillan Reference. P. 1099-1117, 2000.

National Cancer Institute. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2010**. Estados Unidos, 2010.

Novelli, M. D.. **Introdução de uma nova metodologia para análise morfológica através do processamento de imagens por computadores, com aplicação no ensino e na pesquisa**. Tese (Doutorado em Ciências da Computação) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, São Paulo, 1992.

Novelli, M. D.; Borra, R. C.; Matos, D.. Aplicação do processamento de imagens por computador na quantificação de variáveis histopatológicas na reparação tecidual de anastomoses colônicas em cães. **Rev Assoc Med Bras**, 43(4):277-282, 1997.

Obtulowicz, T.; Swoboda, M.; Speina, E.; Gackowski, D.; Rozalski, R.; Siomek, A.; Janik, J.; Janowska, B.; Ciesla, J. M.; Jawien, A.; Banaszkiwicz, Z.; Guz, J.; Dziaman, T.; Szpila, A.; Olinski, R.; Tudek, B.. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. **Mutagenesis**, 25(5):463–471, 2010.

Oliva, M. R.; Ripoll, F.; Muniz, P.; Iradi, A.; Trullenque, R.; Valls, V.; Drehmer, E.; Sáez, G. T.. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. **Mol Carcinog**, 18:232-43, 1997.

Östling, O.; Johanson, K. J.. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys. Res Commun*, 123(1):291-298, 1984.

Pinho, M. S. L.; Rossi, B. M.. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. **Rev Bras Coloproct**, 19(1) 57-60, 1999.

Pinho, M. S. L.. Proteína p53: Algum Valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da Literatura. **Rev Bras Coloproct**, 20(4):258-60, 2000.

Pool-Zobel, B.L.; Leucht, U.. Induction of DNA damage by risk factors or colon cancer in human colon cells derived from biopsies. **Mutat Res**, 375(2):105-15, 1997.

Pool-Zobel, B.L.; Abrahamse, S. L.; Collins, A. R.; Kark, W.; Gugler, R.; Oberreuther, D.; Siegel, E. G.; Treptow-van Lishaut, S.; Rechkemmer, G.. Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 8:609-614, 1999.

Priolli, D. G.. **Cicatrização da anastomose cólica. Avaliação através da associação de métodos convencionais com análise de imagem auxiliada por computador. Estudo experimental em ratos.** Tese (Mestrado em Gastroenterologia Cirúrgica) – Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira”, São Paulo, 1999.

Priolli, D. G.; Margarido, N. F.; Martinez, C. A. R.; Rotta, C. M.; Stephani, S. M.. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. **Acta Cir Bras**, 18:398-406, 2003.

Priolli, D. G.; Cardinalli, I. A.; Piovesan, H.; Margarido, N. F.; Martinez, C. A. R.. Proposta para Estadiamento do Câncer Colorretal Baseada em Critérios Morfofuncionais. Correlação com Níveis Séricos do Antígeno Carcinoembrionário. **Rev Bras Coloproct**, 27:374-383, 2007.

Priolli, D. G.; Martinez, C. A. R.; Cardinalli, H.; Margarido, N. F.; Waisberg, N. F. Morphofunctional staging is a valuable prognostic factor for colorectal cancer and it correlates with plasma CEA levels. **Arq Gastroenterol**, 47(3):225-32, 2010.

Priolli, D. G.; Canello, T. P.; Lopes, C. O.; Valdívia, J. C.; Martinez, N. P.; Açari, D. P.; Cardinalli, I. A.; Ribeiro, M. L.. Oxidative DNA damage and β -catenin expression in colorectal cancer evolution. **Int J Colorectal Dis**, 28(5):713-22, 2013a.

Priolli, D. G.; Pereira, J. A.; Scalise, J. R.; Silva, D. C.; Martinez, N. P.; Lopes, C. O.; Valdivia, J. C.; Cardinalli, I. A.. **Ressecção a R0 determinada por anatomopatologia convencional em adenocarcinoma de cólon - presente e futuro**. In: 62º Congresso Brasileiro de Coloproctologia [on line]; São Paulo. Anais eletrônicos. Sociedade Brasileira de Coloproctologia. Disponível em URL: <http://coloprocto2013.com.br/>. 2013b.

Redon, C. E.; Dickey, J. S.; Nakamura, A. J.; Kareva, I. G.; Naf, D.; Nowsheen, S.; Kryston, T. B.; Bonner, W. M.; Georgakilas, A. G.; Sedelnikova, O. A.. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107(42):17992–17997, 2010.

Ribeiro, Jr. U.; Safatle-Ribeiro, A. V.. p53 in clinical contexts: yes or not? **Arq Gastroenterol**, 43(1):6-7, 2006.

Ribeiro, M. L.; Priolli D. G.; Miranda, D. D. C.; Paiva, D. A.; Pedrazoli Jr. J.; Martinez, C. A. R.. Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólica de Doentes com Câncer Colorretal. **Rev Bras Coloproct**, 27(4):391-402, 2007.

Ribeiro, M. L.; Priolli, D. G.; Miranda, D. D. C.; Açari, D. P.; Pedrazoli, Jr. J.; Martinez, C. A. R.. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, 7(4):267-72, 2008.

Rossingol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S. J.; Capaldi, R. A.. Energy substrate mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Research**, 64:985-993, 2004.

Seril, D. N.; Liao, J.; Yang, G. Y.; Yang, C. S.. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. **Carcinogenesis**, 24:353-62, 2003.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Shneider, E. L.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, 175:184-191, 1988.

Souza, M. V.; Priolli, D. G.; Portes, A. V.; Cardinalli, I. A.; Pereira, J. A.; Martinez, C. A. R.. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. **Acta Cir Bras**, 23(5):417-424, 2008.

Sthephani, S. M.; Novelli, M. D., Leite, M. S. B.; Bromberg, S. H.; Andretto, R.; Pinto Jr., P. E.; Zanotto, A.; Farhoud, S.; Priolli, D. G.. Processamento de imagens auxiliado pelo computador na avaliação da cicatrização da anastomose do colo esquerdo obstruído em ratos. **Estudos Vida e Saúde**, 31:1181-96, 2004.

Toyokuni, S.; Okamoto, K.; Yodoi, J.; Hiai, H.. Persistent oxidative stress in cancer, **FEBS Lett.** 358:1-3, 1995.

Vojtěšek, B.; Bártek, J.; Midgley, C. A.; Lane, D. P.. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. **J Immunol Methods**, 151:237-44, 1992.

Yamaguchi, K.; Sugano, K.; Fukayama, N.; Nakashima, Y.; Saotome, K.; Yokoyama, T.; Yokota, T.; Ohkura, H.. Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. **Am J Gastroenterol**, 92:307-312, 1997.

8. Anexos

Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa


**UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO**

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 23 de Junho de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Influência do estresse oxidativo ao DNA na expressão proteômica da p53 e do CEA em tecido colônico normal, pólipos hiperplásticos, adenomas e adenocarcinomas colorretal.

Curso: Medicina

Grupo: III

Autor (es): Profa. Denise Gonçalves Priolli; Mayara Gonçalves Marques; Camila Oliveira Lopes; Júlio Cesar Martins Valdivia.

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo CAAE: 0219.0.142.000-10 (Citar este número nas correspondências referentes a este projeto)

Prezado (a) (s) Pesquisador (a) (s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária no dia **23/06/2010** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

- Observação: Esclarecer na metodologia, o procedimento que será utilizado para a coleta de dados, a abordagem do voluntário e o local onde será realizado o estudo.

Atenciosamente,


Marcelo Lima Ribeiro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF
Universidade São Francisco

Ao término do desenvolvimento do estudo o (a) pesquisador (a) responsável deverá enviar ao CEP-USF o relatório consolidado de conclusão do mesmo.

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA	Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS	Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA	Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO	Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

Anexo II – Granger Causality Method retirado de Fugita *et al.*, 2012

Granger causality for sets of time series: Suppose that \mathcal{I}_t is a set containing all relevant information available up to and including time-point t . Let X_t , (X_t^i) and (X_t^j) be sets of time series containing p , m and n time series, respectively, where (X_t^i) and (X_t^j) are disjoint subsets of X_t , i.e., each time series only belongs to one set, and thus, $p \geq m + n$. Let $X_t(h|\mathcal{I}_t)$ be the optimal (i.e., the one which produces the minimum mean squared error (MSE) prediction) h -step predictor of the set of time series (X_t^i) from the time point t , based on the information in \mathcal{I}_t . The forecast MSE of the linear combination of (X_t^i) will be denoted by $\Omega_x(h|\mathcal{I}_t)$. The set of time series (X_t^j) is said to Granger-cause the set of time series (X_t^i) if

$$\Omega_x(h|\mathcal{I}_t) < \Omega_x(h|\mathcal{I}_t \setminus \{X_s^j | s \leq t\}) \text{ for at least one } h=1,2,\dots$$

where $(\mathcal{I}_t \setminus \{X_s^j | s \leq t\})$ is the set containing all relevant information except for the information in the past and present of (X_t^j) . In other words, if (X_t^i) can be predicted more accurately when the information in (X_t^j) is taken into account, then (X_t^j) is said to be Granger-causal for (X_t^i) .

For the linear case, (X_t^j) is Granger non-causal for (X_t^i) if the following condition holds:

$$CCA(X_t^i, X_{t-1}^i | X_t \setminus \{X_{t-1}^i\}) = \rho = 0,$$

where ρ is the largest correlation calculated by Canonical Correlation Analysis (CCA).

In order to simplify both notation and concepts, only the identification of Granger causality for sets of time series in an Autoregressive process of order one is presented. Generalizations for higher orders are straightforward.

Anexo III – Tabela com os dados individuais

Pacientes	Idade	Sexo	Tipo Histológico	Imunoistoquímica p53								Ensaio Cometa	
				Tecido Normal				Tecido Tumoral				Tecido Normal	Tumor
				I1	I2	I3	Média	I1	I2	I3	Média		
1	84	F	Adenocarcinoma	0	0	0	0	16,63	17,64	15,55	16,61	0,5	0,72
2	59	M	Adenocarcinoma	2,746666667	0,07	0,05	0,96	3,04	2,7	2,5	2,75	1,76	2,45
3	37	F	Adenocarcinoma	0,06	0,0007	0,02	0,03	3,57	2,54	2,38	2,83	0,56	2,88
4	36	F	Adenocarcinoma	0,04	0,01	0,03	0,03	0,14	0,08	0,26	0,16	0,98	3,1
5	60	F	Adenocarcinoma	0,003	0,38	0,00008	0,13	1,73	1,11	1,79	1,54	0,64	2,14
6	43	F	Adenocarcinoma	0,00008	0,003	0,0002	0	0,34	0,48	0,42	0,41	1,21	3,19
7	66	F	Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0,85	2,78
8	56	M	Adenocarcinoma	0,33	0,36	0,52	0,4	2,03	2,69	2,41	2,38	1,36	2,87
9	68	M	Adenocarcinoma	0,06	0,06	0,04	0,05	1,84	2,05	2,17	2,02	0,49	2,53
10	52	F	Adenocarcinoma	0	0	0	0	0,03	0,06	0,03	0,04	0,76	2,92
11	57	F	Adenocarcinoma	0,04	0,06	0,05	0,05	0,92	1	1,19	1,04	0,91	3,56
12	57	M	Adenocarcinoma	0,003	0,01	0,004	0,01	7,69	5,05	5,88	6,21	0,45	1,04
13	68	F	Adenocarcinoma	0,009	0,004	0,004	0,01	7,25	8,55	7,45	7,75	0,47	0,97
14	84	F	Adenocarcinoma	0	0	0	0	0,01	0,004	0,02	0,01	0,86	0,89
15	40	F	Adenocarcinoma	0,009	0,0007	0,0026	0	1,45	1,27	2,78	1,83	0,83	2,49
16	75	F	Adenocarcinoma	0,0007	0,07	0,002	0,02	0,41	0,22	0,32	0,32	0,96	2,78
17	63	M	Adenocarcinoma	0,21	0,44	0,42	0,36	19,52	15,27	17,48	17,42	0,62	1,78
18	53	F	Adenocarcinoma	0,04	0,04	0,03	0,04	3,15	3	3,78	3,31	0,61	1,87
19	71	F	Adenocarcinoma	0,00008	0,03	0,0007	0,01	6,09	3,14	4,39	4,54	0,799	2,13
20	54	M	Adenocarcinoma	0,08	0,006	0,05	0,05	0,15	0,21	0,18	0,18	0,6	1,62
21	79	F	Adenocarcinoma	0,19	0,21	0,12	0,17	0,71	0,33	0,33	0,46	0,77	2,1
22	61	M	Adenocarcinoma	0,15	0,18	0,14	0,16	4,17	6,57	6,54	5,76	0,82	1,88
23	31	M	Adenocarcinoma	0,45	0,36	0,61	0,47	11,38	11,5	14,96	12,61	0,75	1,63
24	65	M	Adenocarcinoma	0	0,001	0,002	0	0,59	0,56	0,14	0,43	0,66	2,16
25	44	M	Adenocarcinoma	0,0002	0,0001	0,0002	0	2,15	2,16	2,78	2,36	0,78	1,77
26	70	M	Adenocarcinoma	0,26	0,37	0,48	0,37	9,9	17,04	16,36	14,43	0,89	1,83
27	58	M	Adenocarcinoma	0,001	0,002	0,001	0	0,2	0,25	0,29	0,25	0,79	1,76
28	58	F	Adenocarcinoma	0,59	0,46	0,32	0,46	3,55	2,74	2,13	2,81	0,799	2,13
29	53	F	Adenocarcinoma	0,21	0,27	0,4	0,293333333	2,45	1,98	1,82	2,083333333	3,0921	4,6465
30	51	F	Adenoma	0,2	0,14	0,49	0,276666667	2,08	1,2	0,54	1,273333333	0,7736	11,1317
31	76	F	Adenoma	0,72	0,79	0,21	0,573333333	0	0	0	0	0,451	1,2161
32	74	F	Adenoma	0,08	0,09	0,06	0,076666667	4,11	2,57	1,84	2,84	1,1168	3,2593
33	63	M	Adenoma	0,12	0,08	0,3	0,166666667	0,87	0,51	0,18	0,52	0,3259	1,4163
34	72	M	Adenoma	0,4	0,21	0,38	0,33	3,86	5,12	2,99	3,99	0,4458	2,6023
35	72	M	Adenoma	0,11	0,46	0,59	0,386666667	5,41	2,14	1,91	3,153333333	0,3023	0,3967
36	72	M	Adenoma	0,06	0,09	0,15	0,1	2,09	3,81	0,32	2,073333333	0,271	1,027
37	64	F	Adenoma	0,08	0,15	0,21	0,146666667	0,42	0,38	0,22	0,34	0,7275	1,4572
38	55	M	Adenoma	0,23	0,3	0,15	0,226666667	1,16	0,8	0,58	0,846666667	0,5001	2,3648
39	55	M	Adenoma	0,23	0,3	0,15	0,226666667	3,49	2,52	2,33	2,78	0,9647	2,4431
40	59	F	Adenoma	0,2	0,32	0,53	0,35	1,96	1,23	0,74	1,31	0,5542	0,864
41	42	M	Adenoma	0,03	0,01	0,04	0,026666667	0,27	0,34	0,3	0,303333333	0,5075	2,6659
42	42	M	Adenoma	0,03	0,01	0,04	0,026666667	0,72	0,42	0,18	0,44	0,5329	0,7378
43	68	M	Adenoma	0,05	0,02	0,01	0,026666667	2,03	1,53	1,03	1,28	3,1191	3,8256
44	47	M	Adenoma	0,06	0,02	0,01	0,03	1,37	2,19	0,78	1,446666667	1,3519	1,4114
45	66	M	Adenoma	0,02	0,06	0,03	0,036666667	2,26	1,32	1,56	1,713333333	1,0596	3,5076
46	52	F	Adenoma	0,03	0,1	0,02	0,05	1,78	0,93	1,04	1,25	0,5554	2,5938
47	66	F	Adenoma	0	0,01	0,04	0,016666667	2,01	1,03	0,97	1,336666667	2,784	3,2213
48	66	F	Adenoma	0	0,02	0	0,006666667	1,06	0,82	1,25	1,043333333	0,553	2,234
49	54	F	Adenoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6359	1,4582
50	53	M	Adenoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,3489
51	44	F	Adenoma	0	0	0	0	0,06	0	0,1	0,053333	0,6404	2,0157
52	62	F	Adenoma	0,01	0	0	0,003333	0,09	0,28	0	0,123333	0,8405	2,0721
53	52	F	normal	0,08	0,06	0,11	0,083333333					0,5265	
54	82	M	normal	0,05	0,01	0	0,02					2,7942	
55	43	F	normal	0	0	0	0					1,0379	
56	65	M	normal	0	0	0	0					0,7818	
57	52	F	normal	0	0	0	0					0,9732	
58	72	F	normal	0	0	0	0					1,1318	
59	51	M	normal	0,01	0	0	0,003333					1,1357	