

**AVALIAÇÃO DAS SINTASES DE ÓXIDO NÍTRICO,
NITRATO E NITRITO E SUAS ASSOCIAÇÕES COM
ALTERAÇÕES MOLECULARES DE O⁶-
METHYLGUANINE-DNA-
METHYLTRANSFERASE(MGMT) NO CÂNCER
COLORRETAL**

LUCIENE ASSAF DE MATOS

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Renata de Almeida Coudry

Co-Orientador: Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Matos, Luciene Assaf de

Avaliação da sintase de óxido nítrico, nitrato e nitrito e suas associações com alterações moleculares de O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) no câncer colorretal / Luciene Assaf de Matos - São Paulo, 2010.

96p.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Renata de Almeida Coudry

Descritores: 1. CÂNCER COLORRETAL. 2. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE. 3. REPARO DO DNA. 4. NITRITOS. 5. NITRATOS. 6. COMPOSTOS NITROSOS. 7. METILAÇÃO.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, que esteve presente em todas as situações nestes anos, fazendo das minhas prioridades as suas. Exemplo de amor incondicional.

Ao nosso filho Gustavo que está quase chegando, mas já é a razão das nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus por nos revelar detalhes de sua criação à medida que cresce a nossa capacidade de entendimento.

À Dra. Renata de Almeida Coudry, minha orientadora, por toda orientação e tempo investido em mim.

Ao Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi, meu co-orientador, pelo apoio à minha profissão e pelas palavras de encorajamento que sempre me agregaram não somente ciência, mas também valores morais.

Ao Prof. Rui Luis Rodrigues que me ajuda a crescer na fé e na ciência ao mesmo tempo, sendo talvez a maior influência para que eu tenha chegado até aqui.

Aos meus pais, por todo investimento que fizeram em mim, por me apoiarem e sempre acreditarem no meu crescimento.

Aos meus irmãos, Silmara, Sandro, Sirlei e Lilian, que sempre estão na torcida para que eu conquiste os meus objetivos.

Às minhas amigas-irmãs, Daiane, Marta e Tati, pois souberam principalmente entender os meus momentos de ausência sem me abandonar.

Às minhas amigas de pós-graduação Ligia e Mila, que sempre estiveram presentes não só com palavras de incentivo, mas também colocando a mão no trabalho para me ajudar a terminar.

À minha supervisora Monica Macedo, que acreditou em mim e proporcionou todos os meios para que meu projeto se realizasse dentro do ambiente de trabalho. Sem isso eu jamais teria conseguido.

À todas as nutricionistas do meu departamento, que não só trabalharam no meu lugar, mas me apoiaram em todos os momentos. Tenho muito orgulho de vocês.

À Sra. Sueli Nonogaki, que trabalhou na elaboração das minhas lâminas de imunoistoquímica à tempo, mas além disso sempre foi muito carinhosa comigo.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, Rodrigo, Marina e Fernanda, que me ensinaram todo o abecedário do laboratório.

À doutoranda Luciane T. Kagohara, pelas orientações e análises que somaram ao resultado deste projeto.

À Ana Kuninari coordenadora da Pós Graduação e Suely, supervisora da biblioteca, que nos momentos finais foram tudo o que eu estava precisando.

À enfermeira Dra. Erika, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas e pelo tempo gasto me ensinando teorias.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

RESUMO

Matos LA. **Avaliação das sintases de óxido nítrico, nitrato e nitrito e suas associações com alterações moleculares de O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) no câncer colorretal.** São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

INTRODUÇÃO – O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina por enzimas denominadas de sintase do óxido nítrico (NOS). Esta molécula tem um importante papel em vários processos biológicos e também em muitas doenças humanas, entre elas o câncer. O NO e espécies derivadas deste composto tem a capacidade de formar adutos no DNA e interferir em processos de reparo, tais como a atividade da enzima O⁶- Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT ou AGT). A inativação de MGMT também pode ocorrer devido á hipermetilação da região promotora deste gene. **OBJETIVOS** - Avaliar o status de metilação do gene *MGMT* e a expressão de sua proteína associando com a expressão das proteínas NOS1, NOS2, NOS3 e concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato em pacientes com câncer colorretal (CCR). **MÉTODOS** - Foram avaliadas as expressões de NOS1, NOS2, NOS3 e MGMT por imunoistoquímica. As concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito foram analisadas por meio de espectofotometria. O status de metilação da região promotora do gene *MGMT* foi analisado utilizando-se a técnica de pirosequenciamento. **RESULTADOS** – No presente estudo, foi observado 68,8% de metilação na região promotora do gene *MGMT* e 32,6% de perda da expressão protéica, sendo que destes, 93,9% encontravam-se metilados. Não houve associação significativa entre a metilação de *MGMT* e sua expressão proteica com a expressão das proteínas NOS ou com nitrato/nitrito. Houve associação significativa da expressão da proteína MGMT com o status de metilação do gene ($p < 0,001$). A expressão de NOS2 se mostrou positivamente associada com o comprometimento de linfonodos ($p = 0,046$) e tumores em estágio avançado ($p = 0,048$). A presença de nitrito plasmático nos pacientes com CCR também esteve associada com envolvimento de linfonodos ($p = 0,010$). **CONCLUSÃO** – A perda da expressão da proteína MGMT é frequentemente associada pela metilação da região promotora do gene. Tanto a expressão proteica quanto a metilação do gene *MGMT* não estão associadas com as enzimas NOS ou nitrato/nitrito. A expressão da enzima NOS2 e a concentração plasmática de nitrito podem servir como preditores de prognóstico em pacientes portadores de CCR.

SUMMARY

Matos L.A. [The association of nitric oxide synthase, nitrate and nitrite and correlations with molecular changes of O⁶ - methylguanine - DNA methyltransferase (*MGMT*) in colorectal cancer]. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

INTRODUCTION – Nitrogen oxide (NO) synthesized from L-arginine by nitric oxide synthases (NOS) plays a critical role in various biological processes and many disorders including cancer. NO or species derived from it are known to be able to form DNA adducts and inhibit some repair processes, such as O₆-Methylguanine - DNA-Methyltransferase (*MGMT* or AGT) activity. Inactivation of *MGMT* can also occur by promoter CpG island hypermethylation. **OBJECTIVES** – The aim of this study was to evaluate the association between NOS, plasma nitrate/nitrite with molecular changes of O₆- methylguanine-DNA methyltransferase, in colorectal cancer (CRC). **METHODS** – We investigated the expression of NOS1, NOS2, NOS3 and *MGMT* protein by immunohistochemistry. Plasma concentrations of nitrate/nitrite were analyzed by spectrophotometry. Methylation in the promoter region was investigated by pyrosequencing. **RESULTS** – Methylation of *MGMT* and loss of *MGMT* expression was detected in 68.8% and 32.6% of tumors, respectively. There was no significant association between *MGMT* methylation and protein expression with NOS1, NOS2 and NOS3 or nitrate/nitrite. Significant association was found between *MGMT* expression with methylation status ($p < 0.001$). NOS2 immunoreactivity was observed in the cytoplasm of the malignant cells (95.7 %) and positively associated lymph node involvement ($p = 0.046$) and advanced stage ($p = 0.048$). Nitrite also showed association with lymph node involvement ($p = 0.010$). **CONCLUSION** – Loss of expression of *MGMT* protein is frequently caused by promoter hypermethylation at the *MGMT* gene and both are not associated with NOS enzymes or nitrate/nitrite. NOS2 overexpression and plasma concentration of nitrite may serve as a predictor for the prognosis of patients with CRC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sequências de dinucleotídeos CpG adicionadas com o grupo metil.....	9
Figura 2	Status de metilação da região promotora e atividade transcricional.....	10
Figura 3	Fotomicrografia de variáveis anatomopatológicas de adenocarcinoma colorretal utilizadas neste estudo.....	19
Figura 4	Mucosa colônica normal. Expressão de <i>MGMT</i> com controle nuclear positivo (40X).....	22
Figura 5	Adenocarcinoma colorretal. Expressão de <i>MGMT</i> com positividade citoplasmática, encontrada nas amostras de tecido congelado (40X).....	22
Figura 6	Adenocarcinoma colorretal. Expressão de <i>MGMT</i> considerado inconclusivo.....	22
Figura 7	Gel representativo da PCR para teste da integridade do DNA antes do tratamento com bissulfito de sódio.....	25
Figura 8	Conversão do tratamento com bissulfito de sódio.....	26
Figura 9	Gel representativo da PCR para teste da integridade do DNA depois do tratamento com bissulfito de sódio.....	27
Figura 10	Gel representativo para teste da integridade do DNA após amplificação do gene <i>MGMT</i>	28

Figura 11	Enzimas que catalisam a reação de pirosequenciamento.....	29
Figura 12	Ilustração da reação de PCR para o gene <i>MGMT</i> por pirosequenciamento.....	30
	..	
Figura 13	Procedimento para análise de metilação do DNA.....	31
Figura 14	Pirogramas de incorporação de nucleotídeos T nas ilhas CpGs de DNA tratado com bissulfito.....	33
Figura 15	Adenocarcinoma colorretal. Perda da expressão de <i>MGMT</i> (40X).	43
Figura 16	Adenocarcinoma colorretal. Expressão de <i>MGMT</i> com positividade nuclear e citoplasmática, encontradas nas amostras parafinadas (20X).....	43
Figura 17	Fotomicrografia demonstrando as expressões protéicas nos adenocarcinomas colorretais com os anticorpos contra NOS1, NOS2 e NOS3.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos, clones, origens e diluições utilizadas.....	21
Tabela 2	Escore para leitura imunoistoquímica de NOS1, NOS2 e NOS3.....	23
Tabela 3	Sequência de iniciadores para amplificação do gene β -ACTINA....	26
Tabela 4	Sequência de iniciadores para amplificação do gene β -ACTINA tratado com bissulfito de sódio.....	27
Tabela 5	Critérios de classificação do <i>status</i> de metilação do gene <i>MGMT</i> ...	33
Tabela 6	Variáveis anatomopatológicas.....	39
Tabela 7	Variáveis clínicas.....	41
Tabela 8	Perfil de metilação do gene <i>MGMT</i>	42
Tabela 9	Expressão da proteína <i>MGMT</i> de acordo com a presença ou perda da proteína.....	42
Tabela 10	Associação do perfil de metilação de <i>MGMT</i> com a expressão da proteína <i>MGMT</i>	44
Tabela 11	Expressões das enzimas NOS de acordo com a ausência ou presença.....	45
Tabela 12	Expressões das enzimas NOS de acordo com a localização da expressão.....	46

Tabela 13	Associação entre a expressão de MGMT com as expressões das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3.....	46
Tabela 14	Associação do perfil de metilação de <i>MGMT</i> com as expressões das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3.....	47
Tabela 15	Descrição da concentração de Nitrito e Nitrato entre casos e controles.....	48
Tabela 16	Associação entre as concentrações de Nitrito e Nitrato com as expressões das proteínas NOS1, NOS 2 e NOS3.....	48
Tabela 17	Associação entre a expressão da proteína MGMT com as concentrações de Nitrito e Nitrato.....	49
Tabela 18	Associação do perfil de metilação de <i>MGMT</i> com as concentrações de Nitrito e Nitrato.....	49
Tabela 19	Associação do perfil de metilação de <i>MGMT</i> com as variáveis clínicas.....	50
Tabela 20	Associação do perfil de metilação de <i>MGMT</i> com as variáveis anatomopatológicas.....	51
Tabela 21	Associação entre a expressão da proteína MGMT com variáveis clínicas.....	52
Tabela 22	Associação entre a expressão da proteína MGMT com variáveis anatomopatológicas.....	53
Tabela 23	Associação entre a expressão de NOS1 citoplasmática com variáveis clínicas.....	54

Tabela 24	Associação entre a expressão de NOS1 nuclear com variáveis clínicas.....	55
Tabela 25	Associação entre a expressão de NOS1 citoplasmática com variáveis anatomopatológicas.....	56
Tabela 26	Associação entre a expressão de NOS1 nuclear com variáveis anatomopatológicas.....	58
Tabela 27	Associação entre a expressão de NOS2 com variáveis clínicas.....	59
Tabela 28	Associação entre a expressão de NOS2 com variáveis anatomopatológicas.....	60
Tabela 29	Associação entre a expressão de NOS3 com variáveis clínicas.....	61
Tabela 30	Associação entre a expressão de NOS3 com variáveis anatomopatológicas.....	62
Tabela 31	Associação entre as concentrações de Nitrito e Nitrato com as variáveis clínicas.....	63
Tabela 32	Associação entre as concentração de Nitrito e Nitrato com as variáveis anatomopatológicas.....	64
Tabela 33	Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3...	65
Tabela 34	Combinação do <i>status</i> não metilado e expressão protéica de MGMT, associados com a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3.....	66

Tabela 35	Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as concentrações de nitrito e nitrato.....	66
Tabela 36	Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis clínicas.....	67
Tabela 37	Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis anatomopatológicas.....	69
Tabela 38	Combinação do <i>status</i> não metilado e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis clínicas.....	70
Tabela 39	Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis anatomopatológicas.....	71

LISTA DE ABREVISTURAS

AGT	Alkylguanine DNA alkyltransferase
CCR	Câncer colorretal
COBRA	combined bisulfite restriction analysis
CpG	Dinucleotídeo CG
DNA	Ácido dexoxirribonucléico
DNMT	DNA - metiltransferases
DNMT	DNA metiltransferase
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
FAP	Polipose adenomatosa familiar
HCA	Aminas heterocíclicas
HE	Hematoxilina-eosina
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCM	Microdissecção por captura a laser
MBD	methil Cpg-binding domain proteins
µg	Micrograma
mg	Miligrama
MGMT	O ⁶ -methylguanine DNA methyltransferase
µL	Microlitro
MSI	Instabilidade de microssatélites
MSP-PCR	methylation-sensitive polymerase chain reaction
NF-kB	fator nuclear kB
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPi	Fosfato inorgânico
RNOS	Espécies reativas de nitrogênio
RT-PCR	reverse transcription-PCR
U	Unidade

INDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aspectos Gerais.....	1
1.2	Aminas Heterocíclicas	2
1.3	Compostos N-nitrosos.....	4
1.3.1	Óxido nítrico	4
1.3.2	Nitrato e nitrito.....	5
1.4	O ⁶ Methylguanine DNA Methyltransferase.....	7
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS.....	14
3.1	Objetivo Geral.....	14
3.2	Objetivos Específicos.....	14
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
4.1	Aspectos Éticos	15
4.2	Levantamento dos Casos e Coleta das Amostras.....	15
4.2.1	Critérios de Inclusão	15
4.2.2	Critérios de Exclusão	16
4.3	Revisão dos Casos.....	16
4.4	Análise Imunoistoquímica	20
4.4.1	Critério de Análise Imunoistoquímica	23
4.5	Microdissecção das Amostras e Extração de DNA	24
4.6	Tratamento com Bissulfito de Sódio.....	26
4.7	Extração, Metilação <i>in vitro</i> e Tratamento com Bissulfito de Sódio de DNA de Linfócitos.....	28
4.8	Avaliação do Status de Hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i> por meio da Técnica de Pirosequenciamento	28
4.8.1	Critérios de Análise do Perfil de Metilação	31
4.9	Análise do nível de Nitrato e Nitrito no Sangue	34
4.9.1	Nitrato	34
4.9.2	Nitrito	34

5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Descrição da Amostra	37
6.1.1	Descrição Anatomopatológica	37
6.1.2	Descrição de dados clínicos	40
6.2	Análise da Metilação de <i>MGMT</i>	41
6.3	Expressão Imunoistoquímica	42
6.3.1	<i>MGMT</i>	42
6.3.2	<i>NOS1</i> , <i>NOS2</i> e <i>NOS3</i>	44
6.4	Concentração Plasmática de Nitrato e Nitrito.....	47
6.5	Associação com dados Anatomo-Clínicos.....	49
6.6	O papel da combinação do <i>status</i> de metilação de <i>MGMT</i> com sua expressão proteica, associados com as <i>NOS</i> , nitrito e nitrato e com as variáveis clínicas e anatomopatológicas	65
7	DISCUSSÃO.....	72
8	CONCLUSÕES	83
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ANEXOS

- Anexo 1** Ficha de Coleta de Dados - CCR
- Anexo 2** Protocolo de Imunoistoquímica
- Anexo 3** Protocolo de Extração do DNA
- Anexo 4** Protocolo de Tratamento de Bissulfito
- Anexo 5** Extração e Metilação de Linfócitos para Controle das Reações
- Anexo 6** Nitrato – Estudo das amostras de plasma
- Anexo 7** Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais incidente no mundo (NEVES et al. 2005). No Brasil, a estimativa de incidência do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2010 é de 28.110 novos casos, sendo 13.310 em homens e 14.800 em mulheres. Esses valores correspondem a 14 novos casos para 100 mil homens e 15 novos casos para 100 mil mulheres. Na região Sudeste é o 3º tipo de câncer mais freqüente (19/100.000). A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas a possibilidade de desenvolvimento de CCR aumenta a partir dos 40 anos. As regiões sul e sudeste apresentam incidência similar a dos países industrializados, provavelmente decorrente de hábitos alimentares e estilo de vida semelhantes (NEVES et al. 2005; Ministério da Saúde 2009).

Nove em cada dez casos de CCR ocorre em pacientes sem antecedentes familiares importantes, ou seja, de maneira esporádica (PEREZ et al. 1998). Nesses casos os fatores de risco ambientais mais importantes são os hábitos de vida e as dietas pouco saudáveis. As doenças inflamatórias intestinais, como retocolite ulcerativa e doença de Crohn, também são fatores de risco importantes. O aumento da incidência parece ser decorrente do alto consumo de gordura animal e carnes, principalmente carnes vermelhas, processadas e industrializadas, seus diferentes métodos de preparo, e do baixo consumo de frutas e vegetais. Além disso, a obesidade e o sedentarismo também são associados a um aumento no risco de CCR

(SANDHU et al. 2001; WU et al. 2001; SINHA 2002; SUGIMURA et al. 2004; GUNTER et al. 2005; SINHA et al. 2005; DANAEI et al. 2005).

Segundo dados do *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC), um estudo prospectivo em 23 centros de 10 países europeus, incluindo 519,978 indivíduos, na faixa etária entre 35-70 anos, recrutados entre 1992 e 1998 e desenhado especialmente para investigar a relação entre dieta e câncer, confirmou uma associação positiva entre o consumo de carne vermelha e carnes processadas com o risco de desenvolvimento de CCR (GONZALEZ e RIBOLI 2006).

Os mecanismos bioquímicos e genéticos pelos quais o alto consumo de carne vermelha e processada aumenta o risco de CCR têm sido estudados. Entre eles temos a formação, a partir de derivados da carne vermelha, de agentes carcinogênicos, como os compostos N-nitrosos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas heterocíclicas (HCAs) (SANDHU et al. 2001; JAGERSTAD e SKOG 2005).

As HCAs estão relacionadas com tumores mais frequentes em países ocidentais (cólon, mama e próstata), onde a ingestão de carnes vermelhas e processadas é maior (KEATING et al. 1999; JAGERSTAD e SKOG 2005).

1.2 AMINAS HETEROCÍCLICAS

Existem mais de 12 tipos de HCAs, entre elas, cinco são mais comuns na dieta ocidental (PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, IQ e A α C). São consideradas potentes agentes mutagênicos e, também carcinogênicos. O processo de sua formação é desconhecido, mas um dos mecanismos mais aceitos seria a partir da exposição de

certas proteínas e aminoácidos a altas temperaturas, ou quando certos aminoácidos (e, em alguns casos açúcares) reagem em altas temperaturas com creatina e creatinina, que estão presentes somente em carnes com músculos como bife, carne de porco, aves e peixes (BERNER 1996).

SINHA et al. (2001) demonstraram associação entre adenomas colorretais e maior ingestão de carne vermelha e carne vermelha bem passada, provavelmente por aumento na atividade mutagênica de HCAs.

A bioativação das HCAs é feita por uma hidroxiamina derivada do citocromo P450s e, subsequente acetilação pela N-acetiltransferase tipo 2 (NAT2). Alguns autores demonstraram que carnes preparadas sob altas temperaturas podem ativar CYP1A2 e NAT2 (SINHA et al. 1994; CROSS e SINHA 2004; JAGERSTAD e SKOG 2005).

Com base em estudos experimentais, a amina heterocíclica IQ tem sido classificada pelo *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no grupo 2A, ou seja, como possível carcinogênico humano, e outras, tais como PhIP, MeIQx, A α C e 4,8-DiMeIQx, no grupo 2B, como provável agente carcinogênico humano (JAGERSTAD e SKOG 2005; IARC 2006).

As HCAs também podem gerar compostos N-nitrosos (nitrosaminas e nitrosamidas) a partir do óxido nítrico (NO), assim como o nitrato e o nitrito (SANDHU et al. 2001; LAKSHMI et al. 2005).

1.3 COMPOSTOS N-NITROSOS

1.3.1 Óxido nítrico

O NO é um gás incolor com um curto tempo de vida que é moderadamente solúvel em água e altamente solúvel em solventes orgânicos. É sintetizado a partir da L-arginina por várias enzimas chamadas de sintases do óxido nítrico (NOS). As três principais formas destas enzimas são: neuronal ou nNOS (NOS1), induzida ou iNOS (NOS2) e a endotelial ou eNOS (NOS3). Em geral, NOS1 e NOS3 são expressas em neurônios e células endoteliais, respectivamente, e ambas são cálcio dependentes. A expressão de NOS2 produz altas concentrações de NO e está diretamente relacionada à carcinogênese humana. Isto pode ocorrer de diversas maneiras, como por exemplo, alterações nas bases de ácidos nucleicos, inativação de proteínas de reparo do DNA, inativação da proteína p53, inibição da apoptose, indução da angiogênese ou modulação de fatores de transcrição (PEEYUSH e CHAKRABORTY 2001; JAISWAL et al. 2001; RAO 2004; WANG et al. 2005).

TANAKA et al. (2005), em um estudo experimental, induziram a formação de adenocarcinomas colônicos com administração de PhIP, MeIQx e DSS (dextran sódio sulfato). Após 16 semanas, todos os casos positivos expressavam, à imunoistoquímica, iNOS, COX2 e β -catenina. A expressão destas proteínas está fortemente associada a carcinogênese de vários tumores em modelos murinos e humanos, demonstrando a importância da exposição a estes fatores ambientais.

YAGIHASHI et al. (2000) detectaram, por imunoistoquímica, a expressão de iNOS em 88% dos casos de CCR, com expressão citoplasmática difusa. Além disso,

demonstraram aumento de cinco vezes da expressão de mRNA em tecido tumoral quando comparado com a mucosa colônica normal.

YU et al (2006) encontraram expressão de NOS2 de padrão granular no citoplasma das células neoplásicas em 78,2% dos CCR, e somente 25,6% no tecido colônico normal. Observaram também a presença da expressão citoplasmática de NOS3, com aspecto granular e, em alguns casos, a expressão nuclear em 33,3% no tecido de tumores colorretais, comparado com 60,3% de expressão desta proteína na mucosa colônica normal.

O NO tem um elétron não pareado que se torna um cátion (NO^+) ou um ânion (NO^-) pela doação ou aceitação de um elétron, respectivamente. O ânion pode sofrer dimerização espontânea para formar óxido de dinitrogênio (N_2O), ou reagir com metais. Já o cátion está envolvido em reações de nitrosação com amidas, carboxilas, hidroxilas e anéis aromáticos. Pode reagir com O_2 para formar dióxido de nitrogênio ou nitrito (NO_2^-), com O_2^- para formar o peroxinitrito (ONOO^-), ou com transição de íons de metal para formar o complexo metal nitrosil (M-NO), estes são conhecidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS). Isto demonstra que este composto é altamente reativo e de baixa meia-vida, desta maneira sua análise é realizada de forma indireta, através de seus produtos ou das enzimas relacionadas com a sua reação (PEEYUSH e CHAKRABORTY 2001).

1.3.2 Nitrato e nitrito

A principal fonte exógena de nitrato e nitrito é a dieta. Cerca de 60 a 80% do nitrato ingerido diariamente vem dos vegetais e da água. O nitrito é usualmente adicionado a carnes processadas, para manter sua coloração avermelhada, aroma e

proteção contra microorganismos como *Clostridium botulinum*. Além disso, o nitrito pode ser formado à partir do nitrato pela ação de bactérias durante a digestão.

A segunda principal fonte é endógena, a via L-arginina-NO (LUNDBERG et al. 2004; MILKOWSKI et al. 2009), e por isso, seus níveis biológicos podem indicar a produção celular de NO (GHASEMI et al. 2009). Por outro lado, recentemente tem sido mostrado que, em uma situação de hipoxia, nitrito é capaz de formar NO independentemente da presença de NOS (LUNDBERG et al. 2004).

O metabolismo do nitrato e do nitrito também pode resultar na formação de N-nitrosaminas. O mecanismo exato como isso ocorre ainda não é bem conhecido, podendo ou não envolver agentes nitrosantes ou bactérias que catalisam a formação de compostos nitrosos à partir do nitrito em pH neutro (LUNDBERG et al. 2004).

Os compostos nitrosos são capazes de formar adutos no DNA, como por exemplo, o $O^6\text{MeG}$ (*O6-methylguanine*) e o $O^6\text{CMG}$ (*O6-carboxymethyldeoxyguanosine*) (POVEY et al. 2000).

O $O^6\text{MeG}$ é o principal responsável pela mutagenicidade e carcinogenicidade dos agentes alquilantes. Ele leva a alteração $G:C \rightarrow A:T$ em cultura de célula e modelos animais, quando não reparado pela proteína MGMT (*O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*) (GOLDMAN e SHIELDS 2003).

Devido as suas características mutagênicas, por promover instabilidade genômica e inativação de genes de reparo do DNA, as HCAs e o NO têm sido associados a diferentes tumores, tais como: mama, próstata, cólon, pele e fígado. Essas moléculas apresentam um importante papel na carcinogênese humana, principalmente em tumores associados às alterações nos genes *HRAS*, *KRAS*, *TP53*, *APC* e *β -catenina* (SUGIMURA 2000).

1.4 *O⁶ METHYLGUANINE DNA METHYLTRANSFERASE*

O gene *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q26). Codifica uma proteína denominada *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase (MGMT ou AGT)*, que atua no processo de reparo do DNA removendo radicais alquila do oxigênio da posição 6 (*O⁶*) das guaninas. A adição de radicais alquila ao *O⁶* da guanina é uma importante fonte de mutações pois a *O⁶-metil-guanina*, durante a replicação do DNA pareia com timina e não com citosina, acarretando a troca de pares guanina-citosina (GC) por adenina-timina (AT). Além disso, a *O⁶-metil-guanina* pode formar ligações cruzadas com citosinas da fita de DNA complementar, impedindo a replicação do DNA. A proteína MGMT participa do reparo do DNA transferindo os grupos alquila do *O⁶* das guaninas para um sítio aceitor na sua própria estrutura, e então se desliga do DNA e é degradada por ubiquitinação (ESTELLER et al. 2000; ZUO 2004; KAINA et al. 2007).

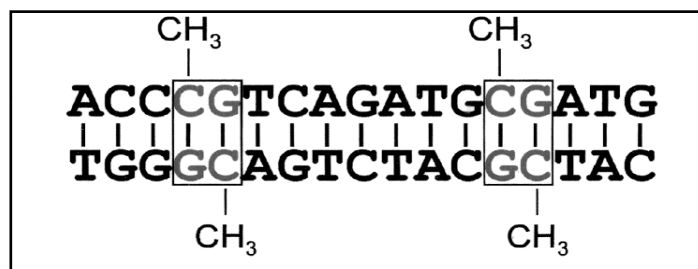
O papel de reparação de MGMT contra o câncer têm sido demonstrado em experimentos com camundongos transgênicos e *knockout*. Em cólon, reduz a formação de criptas aberrantes e mutações no gene *KRAS* (KAINA et al. 2007).

Está claro que a expressão de MGMT varia de acordo com o tecido, mesmo em indivíduos saudáveis. Há maior expressão no fígado e no cólon e uma menor expressão no cérebro (KAINA et al. 2007). Da mesma forma, há uma variação inter-individual de sua expressão. Em tecidos de tumor, sua expressão é ainda mais variável, sendo maior em câncer de mama, cólon, pulmão e ovário (KAINA et al. 2007).

Alguns estudos demonstram a existência de reações de NO com as proteínas de reparo do DNA. LAVAL e WINK (1994) reportaram que o NO inibe a proteína de reparo MGMT sendo dose e tempo dependente, mas podendo ser reversível ao longo do tempo (LAVAL e WINK 1994). Os autores observaram que a ubiquitinação de *MGMT* ocorre logo depois da retirada dos adutos alquilantes, pois a incorporação destes causa uma mudança em sua estrutura desencadeando sua degradação. Outro estudo demonstrou que NO colabora com a degradação de *MGMT* por meio da capacidade deste em gerar compostos nitrosos, sendo que os mesmos se ligam a esta proteína, proporcionando uma conformação similar àquela observada quando da retirada de agentes alquilantes, levando assim, a ubiquitinação da mesma (LIU et al. 2002).

Mutações no gene *MGMT* raramente são observadas, assim sendo, a metilação na região promotora do gene é considerada outro mecanismo essencial para o seu silenciamento (NAGASAKA et al. 2008).

A adição de um grupo metil (CH_3) ocorre quase que exclusivamente nas citosinas que são imediatamente seguidas por uma guanina, assim denominadas de dinucleotídeos CpG. O genoma humano possui poucas sequências desses dinucleotídeos, no entanto, algumas sequências denominadas ilhas CpG são comparativamente ricas nestas sequências (1 a 2%) (ATTWOOD et al. 2002). E estas, se encontram principalmente na região promotora do gene (Figura 1).

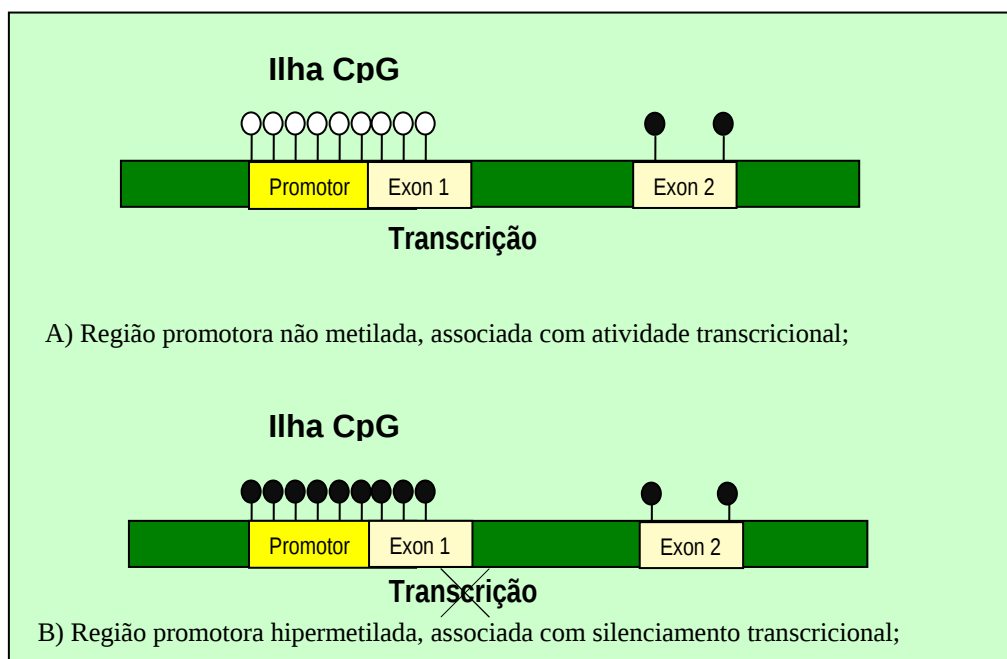


Fonte: WORM e GULDBERG (2002)

Figura 1 - Sequências de dinucleotídeos CpG adicionadas com o grupo metil.

As alterações na metilação do DNA possuem um papel central no desenvolvimento e na progressão de vários cânceres, principalmente por estarem associadas à repressão transcricional de vários genes. Essas alterações são consideradas epigenéticas, porque embora modifiquem a constituição química do DNA, não alteram diretamente a sequência de nucleotídeos. A denotação CpG descreve a união de uma citosina a uma guanina por uma ligação fosfodiéster na mesma fita de DNA o que difere das ligações CG unidas por pontes de hidrogênio nas fitas opostas de DNA (WORM e GULDBERG 2002; ATTWOOD et al. 2002).

O *status* de metilação da região promotora das ilhas CpGs confere informação sobre a atividade transcricional do gene. Conforme ilustrado na Figura 2.



Fonte: WORM e GULDBERG (2002).

Figura 2 - Status de metilação da região promotora e atividade transcricional.

O gene *MGMT* encontra-se metilado em 20%-50% em diferentes neoplasias, como por exemplo, cólon, cérebro, pulmão e mama (ESTELLER et al. 1999; ZUO 2004).

XU et al. (2004) avaliaram o perfil de metilação na região promotora das ilhas CpGs em 31 genes relacionados ao CCR. O gene *MGMT* apresentou hipermetilação em 20% dos casos, mas a presença desta não demonstrou uma associação clara com a sua expressão quando comparado com a imunoistoquímica. No entanto, ESTELLER et al. (1999), demonstram que a hipermetilação do gene *MGMT* está relacionada com a perda de sua expressão (ESTELLER et al. 1999).

Desta forma, dois mecanismos são responsáveis pela perda da proteína *MGMT* e podem contribuir para a carcinogênese colorretal. Um deles, causado pela inativação funcional da proteína pela nitrosação da mesma e outro decorrente da

perda de produção por hipermetilação do gene que a codifica. Sendo que, ambos podem contribuir para a carcinogênese colorretal.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação do CCR ao consumo de alimentos que contém nitrito e nitrato, no entanto, o mecanismo molecular envolvido neste processo ainda é desconhecido. Sabe-se que tanto nitrito como nitrato estão envolvidos na formação de nitrosaminas, que são os mais abundantes de todos os carcinogênicos químicos ambientais. Esta formação pode estar associada a efeitos indiretos do NO.

O NO é uma molécula reativa que exerce um importante número de funções biológicas, como regulação vascular, modulação da resposta imune e neurotransmissão. Ele reage com oxigênio e moléculas biológicas, para formar variados produtos, incluindo o nitrito e o nitrato. O NO gerado pelas NOS a partir da L-arginina é oxidado no sangue e tecidos para formar nitrito e nitrato. Indivíduos que apresentam maior expressão de NOS3 também apresentam maiores níveis circulantes de nitrato. Da mesma forma, indivíduos com doenças inflamatórias possuem altos níveis de nitrito e nitrato, devido à alta produção de NOS2. A determinação destes metabólitos pode refletir o *status* de um paciente quanto a sua produção de NO. Altas concentrações de nitrato e nitrito sugerem que grandes quantidades de NO foram produzidas.

O NO pode participar de numerosas reações, incluindo a formação biológica de espécies reativas de nitrogênio (RNOS), que podem ser carcinogênicas tanto por alterar quimicamente o DNA, como através da genotoxicidade de outras substâncias como os agentes alquilantes.

Altos níveis de NO podem inativar proteínas de reparo resultando em mutações indiretas no DNA. A atividade de proteínas de reparo pode ser influenciada pelo NO e/ou RNOS inibindo sua atividade. A proteína de reparo MGMT que atua no processo de reparo do DNA removendo radicais alquila do oxigênio da posição 6 (O⁶) das guaninas tem demonstrado sofrer esta inibição.

Outro mecanismo que leva a perda de *MGMT* é decorrente da hipermetilação em ilhas CpGs na região promotora do gene, sendo que, ambos podem contribuir para a carcinogênese colorretal.

Apesar da intrínseca associação entre NO e seus derivados e a proteína *MGMT*, existem poucas publicações a respeito, principalmente associando alterações moleculares com dados anatomopatológicos e clínicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visou avaliar o status de metilação do gene *MGMT* e a expressão de sua proteína associando-os com a expressão das proteínas NOS1, NOS2, NOS3 e concentração de nitrito e nitrato nos adenocarcinomas colorretais.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3 em adenocarcinomas colorretais e sua associação com dados anátomo-clínicos;
- Avaliar os níveis de nitrito e nitrato no sangue de pacientes com adenocarcinomas colorretais e sua associação com dados anátomo-clínicos;
- Avaliar o status de metilação do gene *MGMT* e a expressão de sua proteína com os dados anátomo-clínicos.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo retrospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente, sob o número 1011/07, em 18 de Fevereiro de 2008.

4.2 LEVANTAMENTO DOS CASOS E COLETA DAS AMOSTRAS

O estudo utilizou amostras biológicas de pacientes com CCR esporádico que foram operados no Hospital A.C. Camargo no período de 2000-2006 e que se encontravam armazenadas no Banco de Tumores. O prontuário destes pacientes foi avaliado para obtenção de informações clínicas (Anexo 1). As lâminas de H&E presentes no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica foram avaliadas para confirmação diagnóstica e para obter as variáveis anatomopatológicas.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Os casos selecionados foram de CCR esporádicos, com disponibilidade de dados anatomopatológicos e clínicos, tecido congelado, sangue e tecidos fixados em parafina e processados em formalina.

4.2.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes que receberam tratamento cirúrgico ou quimioterápico prévio em outra instituição.
- Pacientes que receberam tratamento neoadjuvante com radio ou quimioterapia.
- Pacientes que tiveram outra neoplasia primária, com exceção de neoplasias de pele não melanoma.
- Pacientes portadores de síndromes associadas à predisposição de tumores colorretais.

4.3 REVISÃO DOS CASOS

Foram revistos 388 casos de CCR que se encontravam armazenados no Banco de Tumores, excluindo 77 pacientes com tumores prévios, 10 com tumores sincrônicos, 31 que fizeram neoadjuvância, operados em outra instituição 15, 1 com prontuário incompleto, 1 com registro hospitalar desconhecido, 5 com polipose familiar e 18 com síndrome de Lynch.

Devido ao pequeno número de casos (31 casos) que apresentavam plasma armazenado no banco de tumores para avaliação do nitrito e nitrato, foram inclusos mais 10 casos de pacientes operados no ano de 2007 que tinham este material disponível para o estudo. Desta forma foram selecionados 240 pacientes para o estudo.

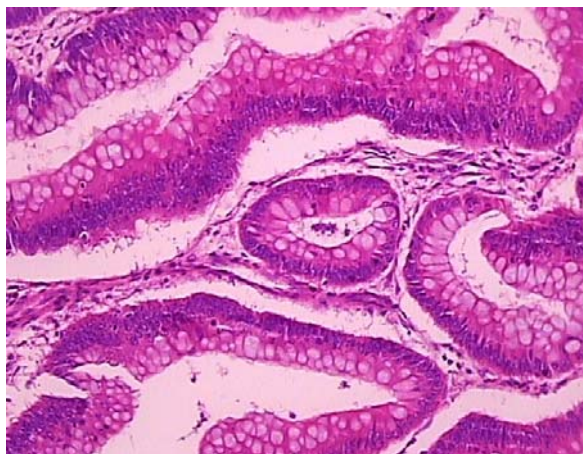
Todas as amostras selecionadas foram submetidas à revisão por um patologista do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo

para confirmação diagnóstica de adenocarcinoma, do estadiamento e para obter as seguintes variáveis anatomopatológicas: grau de diferenciação, padrão de crescimento macroscópico, desmoplasia, invasões sanguínea, linfática e perineural, infiltrado linfocitário peritumoral, necrose suja, *budding*, borda de invasão, tipo histológico e associação ou origem em adenomas (Figura 3) . Segundo Jass (2007) *budding* se caracteriza por células isoladas ou agrupamento com menos de cinco células na frente de invasão.

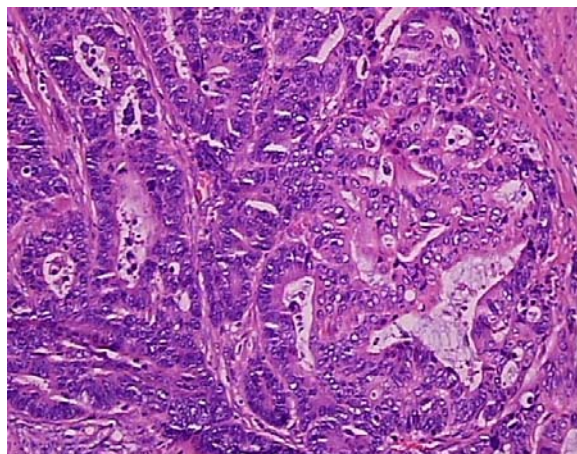
Histologicamente a Organização Mundial da Saúde (OMS) (HAMILTON et al. 2000) classifica os carcinomas colorretais em: adenocarcinoma mucinoso (>50% de mucina extracelular); adenocarcinoma com células em anel de sinete (> 50% de células em anel de sinete); carcinoma epidermóide, carcinoma adenoescamoso; carcinoma de pequenas células; carcinoma medular; carcinoma indiferenciado, e outros (carcinoma de células claras, adenocarcinoma papilífero etc.).

O adenocarcinoma colorretal é graduado levando-se em consideração a extensão da aparência glandular do tumor, sendo subdividido em: bem diferenciado (mais de 95% de estruturas glandulares), moderadamente diferenciado (50 a 95% de formações glandulares) e pouco diferenciados (5 a 50% de formações glandulares).

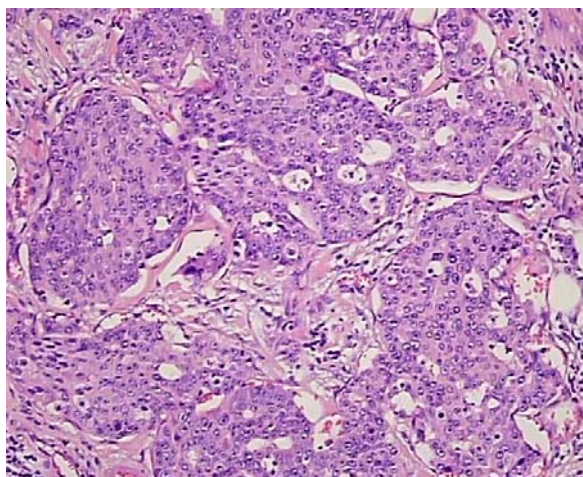
Além da classificação histológica e do estadiamento, outros parâmetros histológicos devem ser considerados, pois estão associados ao valor prognóstico. São eles: a invasão angiolinfática, a invasão perineural, o infiltrado inflamatório peritumoral ou intratumoral, a desmoplasia e o padrão de crescimento do tumor (infiltrativo ou expansivo).



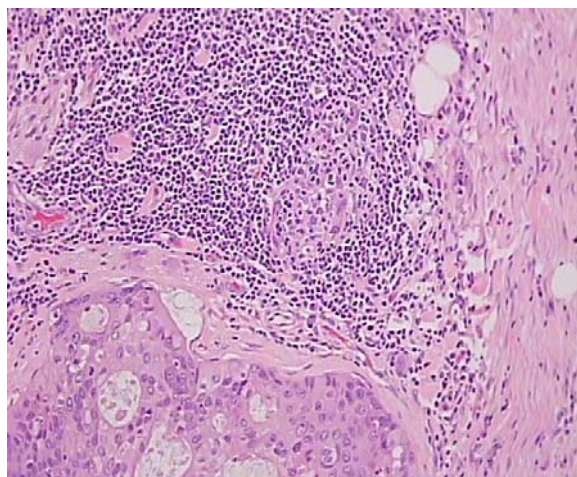
A - Adenocarcinoma bem diferenciado (20X)



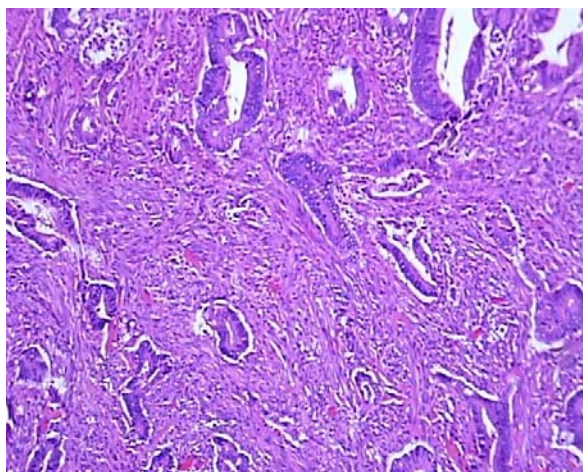
B - Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (20X)



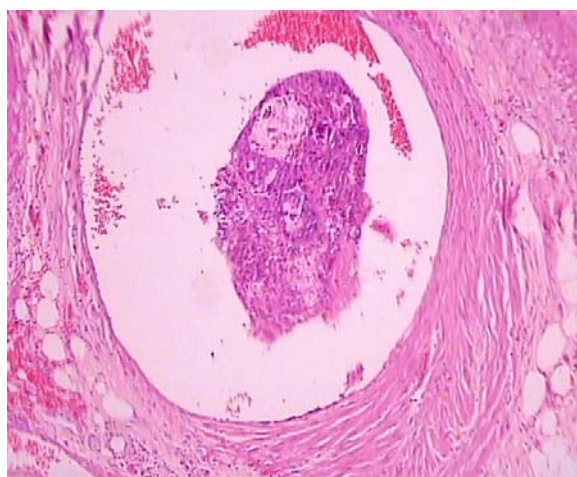
C - Adenocarcinoma pouco diferenciado (20X)



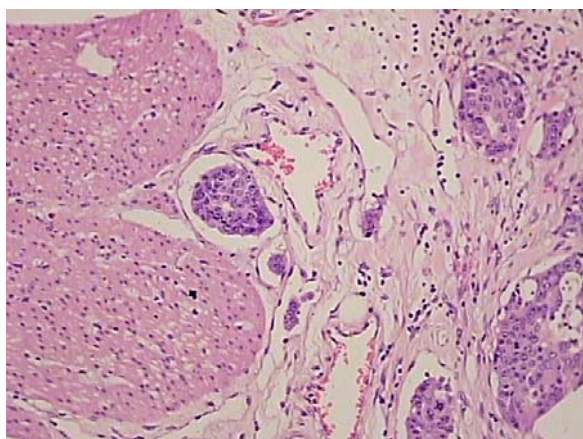
D - Infiltrado tipo Crohn (20X);



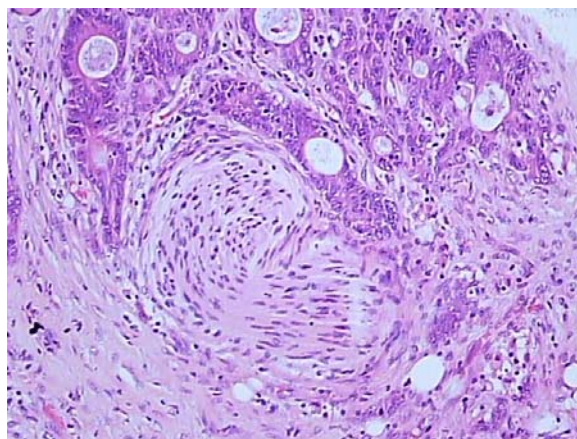
E - Desmoplasia (10X);



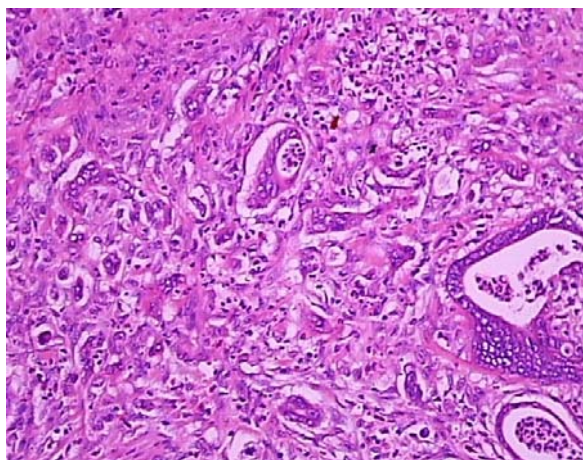
F - Invasão vascular sanguínea (10x)



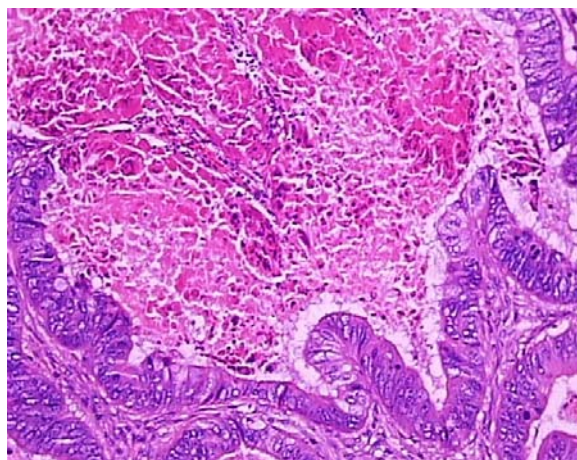
G - Invasão vascular linfática (10x)



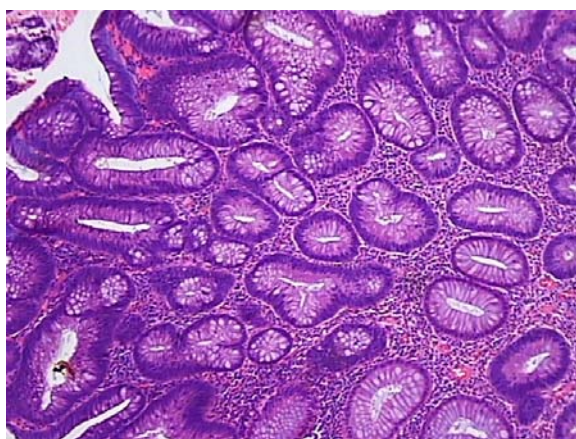
H - Invasão perineural (20x)



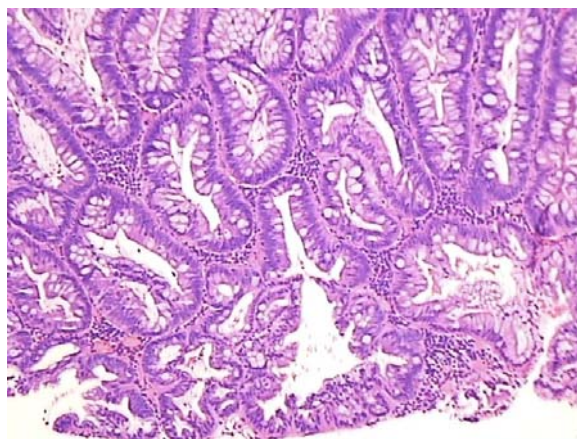
I - Budding (20x)



J - Necrose suja (20x)



K - Adenoma clássico (20X)



L - Adenoma serreado tradicional (20X)

Figura 3 – Fotomicrografia de variáveis anatomopatológicas do adenocarcinoma colorretal utilizadas neste estudo.

4.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

O estudo imunoistoquímico para as proteínas NOS1, NOS2, NOS3 e *MGMT* foi realizado em tecido de tumor dos casos selecionados. Foram utilizados cortes de 5µm dos blocos de parafina dos tumores correspondentes ao tumor colônico que se encontrava no banco de tumores. Foram usados anticorpos contra as proteínas: NOS1, NOS2 e NOS3 e *MGMT*, conforme Tabela 1.

Para a avaliação da expressão da proteína *MGMT* foi usado o anticorpo da Labvision® (clone MT 3:1) nas seguintes diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1: 1000 e 1:2000 nos pHs 6 e 9, tanto com recuperação antigênica em panela de pressão, quanto em panela pascal e em banho-maria. Por se tratar de uma proteína nuclear esperava-se encontrar positividade exclusivamente nuclear (Figura 4). Porém, neste estudo foi constatada positividade tanto nuclear quanto citoplasmática. Por isso, foram testadas as mesmas diluições e os mesmos pHs em tecido congelado, na tentativa de um achado mais conclusivo, mas também foi constatada positividade tanto nuclear quanto citoplasmática (Figura 5). Diante disso, foram mantidas as análises com material parafinado e os casos com expressão citoplasmática foram considerados inconclusivos (Figura 6) e retirados das análises.

Tabela 1 – Anticorpos, clones, origens e diluições utilizadas.

Antígeno	Clones	Títulos	Recuperação Antigênica	Fabricante
NOS 1	16	1:200	Citrato PH6,0 Panela pressão	BDtranduction cat#610309
NOS 2	6	1:25	Citrato PH6,0 Panela pressão	BDtranduction cat#610329
NOS 3	3	1:2000	Citrato PH6,0 Panela pressão	BDtranduction cat#610297
MGMT	MT3:1	1:100	EDTA Tris PH9,0 Panela Pascal	Labvision

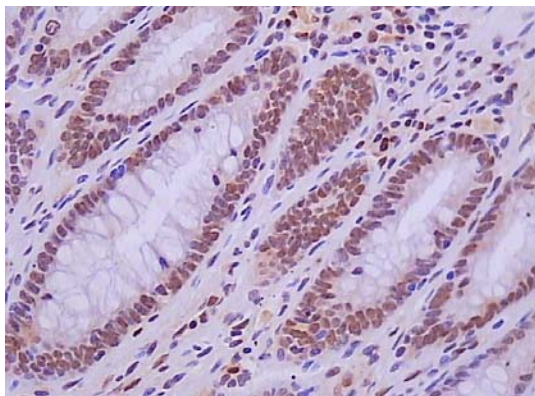


Figura 4 – Mucosa colônica normal. Expressão de *MGMT* com controle nuclear positivo (40X).

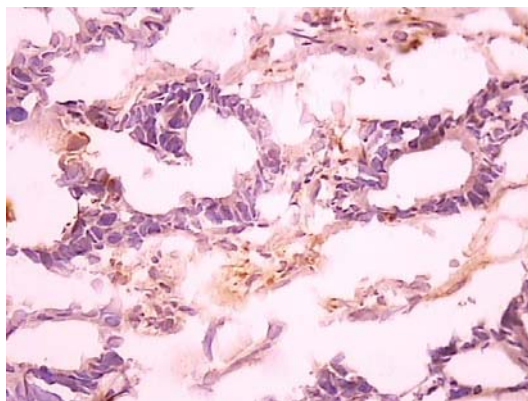


Figura 5 – Adenocarcinoma colorretal. Expressão de *MGMT* com positividade citoplasmática, encontrada nas amostras de tecido congelado (40X).

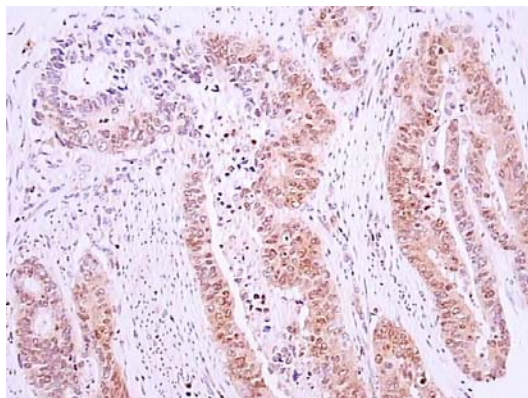


Figura 6 - Adenocarcinoma colorretal. Expressão de *MGMT* considerada inconclusiva (20X).

O protocolo realizado segue no Anexo 2.

4.4.1 Critério de Análise Imunoistoquímica

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum. Os cortes histológicos de neoplasia foram examinados e considerados perda da expressão da proteína de reparo *MGMT* quando houve negatividade nuclear na reação de imunoistoquímica e a presença de células positivas no estroma. A expressão de *MGMT* foi classificada quanto à perda da expressão e presença da expressão.

A expressão de NOS1, NOS2 e NOS3 foi avaliada multiplicando-se a extensão da positividade pela intensidade da expressão, sendo de 0 a 4 pouco expressivo, de 5 a 8 expressão intermediária e de 9 a 12 expressão intensa. A extensão da positividade foi estabelecida em uma escala de 0 a 4 e a intensidade da expressão foi medida de 0 a 3, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Escore para leitura imunoistoquímica das lâminas de NOS1, NOS2 e NOS3.

Intensidade	Extensão
0: não expressão	0: Negatividade
1: pouca intensidade	1: 1 – 25%
2: moderada intensidade	2: > 25% <50%
3: grande intensidade	3: > 50% <75%
	4: > 75%

Para o controle das reações imunoistoquímicas foram usadas mucosas colônicas normais.

4.5 MICRODISSECÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA

Para a microdissecção manual das amostras foram realizados de cada amostra 15 cortes de 5µm em creostato à -20°C dos tumores congelados que se encontravam no banco de tumor e que eram correspondentes àqueles usados para a realização do estudo imunoistoquímico. Os cortes foram capturados em lâminas de vidro e colocados em caixa de lâminas que foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo seco com cuidados para evitar DNases e RNases. Um dos cortes foi corado utilizando a técnica de hematoxilina e eosina para avaliar a quantidade de tumor e marcar a área do tumor para realizar a microdissecção manual (*scrape*) ou selecionar os casos onde seria necessária a realização de microdissecção a *laser* (LCM). Os casos contendo mais de 60% de volume do tumor foram realizados microdissecção manual e nos demais LCM. Para a realização da microdissecção manual quatro lâminas foram selecionadas e postas contra a lâmina marcada para que retirasse apenas o material do tumor raspando a lâmina com bisturi e transferindo para um tubo de 1,5 ml contendo o buffer adequado para a lise das células. Para a realização de LCM foram coradas quatro lâminas e foram capturadas aproximadamente 2000 células malignas de cada caso. Cada macrocápsula (Molecular Devices) utilizada no processo de microdissecção contendo as células de interesse foi colocada em um tubo de 1,5 ml contendo o buffer adequado para lise das células.

O DNA foi extraído do material utilizando-se o KIT de extração QIAamp DNA Micro (Qiagen, Uniscience do Brasil), conforme Anexo 3 e quantificado por espectrofotometria utilizando-se 1µL de DNA no NanoDrop 1000 (Thermo

scientific). Para verificar a integridade das amostras extraídas foi realizado PCR utilizando iniciadores para o gene β -ACTINA (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequência de iniciadores para amplificação do gene β -ACTINA empregados para verificar a integridade das amostras de DNA.

GENE	INICIADOR SENSO (5' – 3')	INICIADOR ANTISENTO (3' – 5')
β -ACTINA	GTGTTGTGGGTGTAGGTAG	CATGTCACACTGGGGAAG

Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 1X tampão de PCR, 1,5mM de $MgCl_2$; 0,2mM de dNTPs; 10pMol de cada iniciador; 1,0U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 100ng de DNA em um volume final de 25 μ l. Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: utilizado foi: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 7 minutos. Para visualização dos produtos amplificados as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2% (Figura 7) e, posteriormente estocadas a - 20° C.

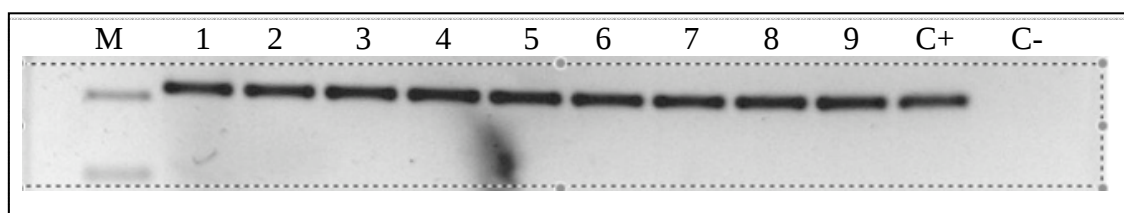
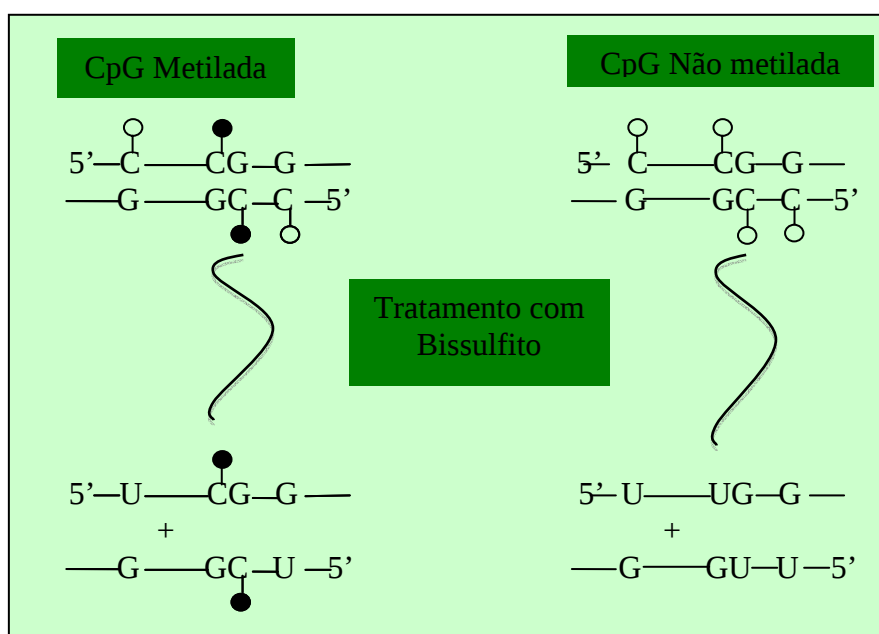


Figura 7 - Gel representativo da PCR para teste da integridade do DNA antes do tratamento com bissulfito de sódio.

4.6 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

A seguir foi realizado um tratamento com bissulfito de sódio. Neste tratamento ocorre a conversão das citosinas não metiladas em uracilas, por deaminação. As citosinas metiladas são protegidas da conversão e permanecem como citosinas. A Figura 8 ilustra esta conversão.



Fonte: TRINH et al. (2001)

Figura 8 – Conversão do tratamento com bissulfito de sódio. O bissulfito de sódio modifica a sequência do DNA genômico pela conversão de citosinas não metiladas (círculos abertos) em uracilas, enquanto citocinas metiladas (círculos fechados) permanecem inalteradas.

Um μg de DNA de cada amostra foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio através do kit *EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research)*, conforme Anexo 4. Para verificar sua integridade foi realizado PCR utilizando *primers* constitutivos de β -ACTINA tratada com bissulfito (Tabela 4).

Tabela 4 – Sequência de iniciadores para amplificação do gene β -ACTINA tratada com bissulfito.

GENE	INICIADOR SENSO (5' – 3')	INICIADOR ANTISENTO (3' – 5')
β -ACTINA BISSULFITO	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 1X tampão de PCR, 1,5 μ l de MgCl₂; 0,5 μ l de dNTPs; 1 μ l de cada iniciador; 0,2 μ l de *Taq Platinum (Invitrogen)* e 2 μ l de DNA em um volume final de 25 μ l. O programa de PCR utilizado foi: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 7 minutos. Para visualização dos produtos amplificados as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2% (Figura 9) e, posteriormente estocado a - 80° C.

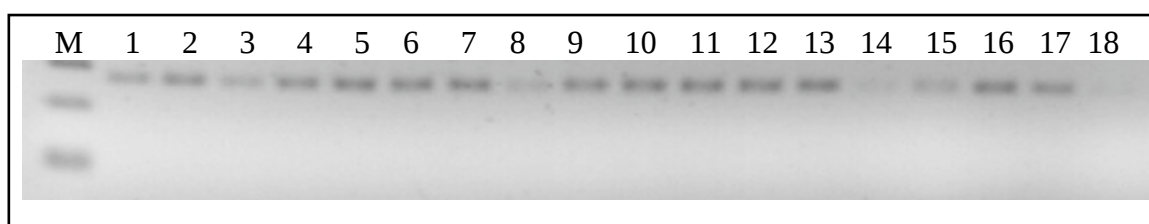


Figura 9 - Gel representativo da PCR para teste da integridade do DNA depois do tratamento com bissulfito de sódio.

Após o tratamento as amostras foram amplificadas utilizando-se a técnica de PCR. Cada reação de PCR continha 2 μ l de DNA, 10pmols de iniciadores senso e antisenso (PyromarkTM MGMT- Qiagen), 1,5 μ l de MgCl₂; 1 μ l de dNTPs e 0,5 μ l de HotStar Taq (Qiagen) em um volume total de 50 μ l. Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de 95°C por 20

segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e finalmente 7 minutos à 72°C. A seguir visualizado em gel de agarose 2% (Figura 10).

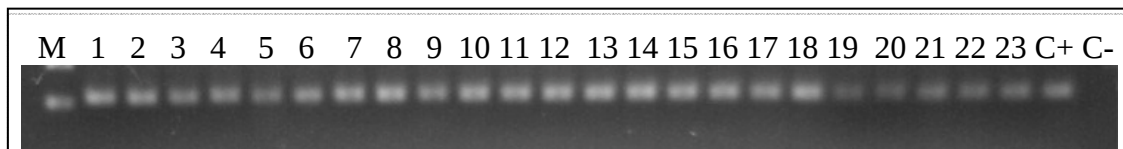


Figura 10 - Gel representativo para teste da integridade do DNA após amplificação do gene *MGMT*

4.7 EXTRAÇÃO, METILAÇÃO *IN VITRO* E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO DE DNA DE LINFÓCITOS

O DNA de linfócitos metilados *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio foi empregado como controle das reações. Seguindo protocolo, conforme Anexo 5.

Vinte alíquotas de 2µg de DNA metilado *in vitro*, foram tratadas com bissulfito de sódio, conforme protocolo já descrito no Anexo 4.

4.8 AVALIAÇÃO DO STATUS DE HIPERMETILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MGMT* POR MEIO DA TÉCNICA DE PIROSSEQUENCIAMENTO

O pirosequenciamento é uma abordagem baseada no monitoramento em tempo real da síntese do DNA. A reação de pirosequenciamento é catalisada por quatro enzimas: DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase. Após o anelamento do iniciador, a cada nucleotídeo incorporado, pela atividade da DNA polimerase, ocorre a liberação de fosfato inorgânico (PPi), substrato da ATP

sulfurilase para a produção de ATP. Este por sua vez reage com a luciferase produzindo luz, cuja intensidade é proporcional à quantidade de nucleotídeos incorporados. A apirase degrada os nucleotídeos não incorporados e o excesso de substrato (Figura 11) (NORDSTRÖM et al. 2002; AGAH et al. 2004; AHMADIAN et al. 2006; SWAN et al. 2006).

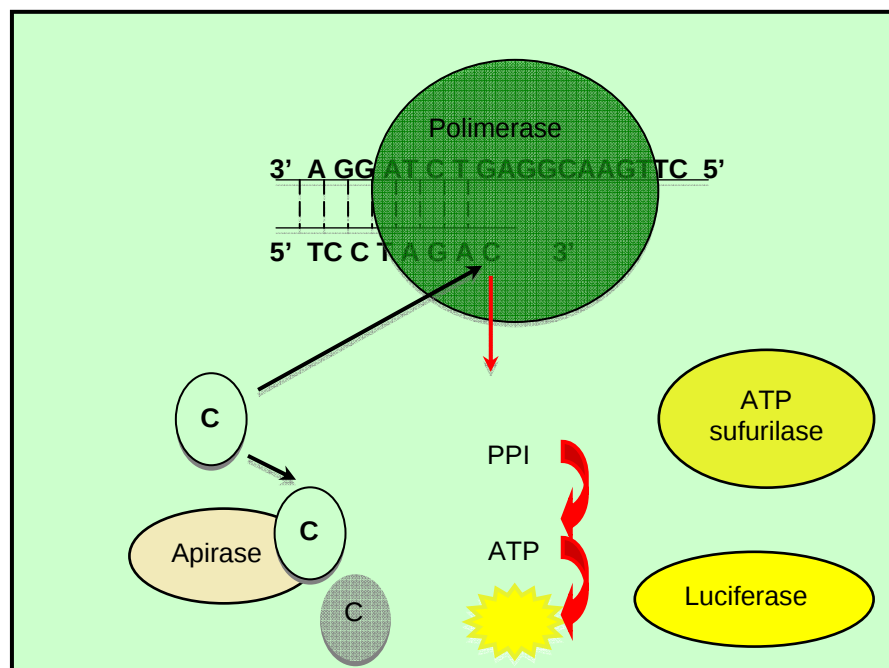


Figura 11 – Enzimas que catalisam a reação de pirosequenciamento. Após a incorporação dos nucleotídeos pela DNA polimerase há liberação de fosfato inorgânico (PPI) que reage com a luciferase produzindo luz. A apirase degrada os nucleotídeos não incorporados e o excesso de substrato.

A aplicação do pirosequenciamento na avaliação da hipermetilação apresenta algumas vantagens com relação aos demais métodos empregados atualmente (MSP, QMSP, sequenciamento, COBRA). Com essa abordagem é possível avaliar diversos sítios CpG, sem que seja necessário ficar restrito àqueles presentes nos iniciadores e/ou sondas; não depende da presença de sítios de restrição;

não requer o sequenciamento de diversos clones e permite a quantificação dos sítios de CpG (RAJEEVAN et al. 2006). Em nosso estudo foram avaliados os níveis de metilação das posições 17-39 no exon 1 do gene *MGMT*. Este experimento foi realizado utilizando o kit Pyromark *MGMT* (Biotage, Suíça) no qual contém todos os primers necessários para a avaliação dos sítios designados. Foi também avaliado como controle de incorporação do tratamento de bissulfito um sítio de C seguido de A na sequência original. A sequência de nucleotídeos dispensados para o sequenciamento em tempo real foi: ATCAGTTGTCAGTCTGATCAGTCAGTCGA.

A purificação da fita simples de DNA utilizada como molde na reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96-wells (Millipore, Bedford, MA). Vinte e cinco µl do produto biotinilado foi purificado utilizando *sefaroze beads* marcadas com estreptoavidina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). A reação de síntese por sequenciamento da fita complementar foi realizada automaticamente pelo instrumento PyroMark ID (Biotage) em temperatura ambiente usando reagentes PyroGold (Biotage) (Figura 12). O sinal emitido durante a incorporação de cada nucleotídeo é detectado por uma câmera CCD e convertido em picos para formar um pirograma (Figura 13).

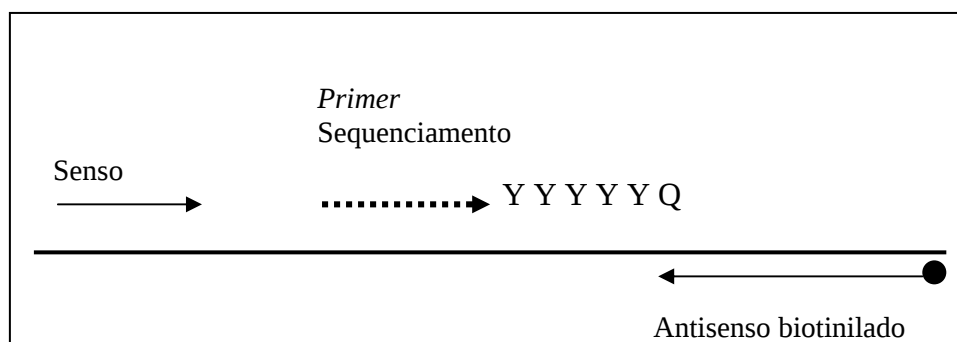


Figura 12 - Ilustração da reação de PCR para o gene *MGMT* por pirosequenciamento. Y, sítio CpG; Q, controle do tratamento de bissulfito.

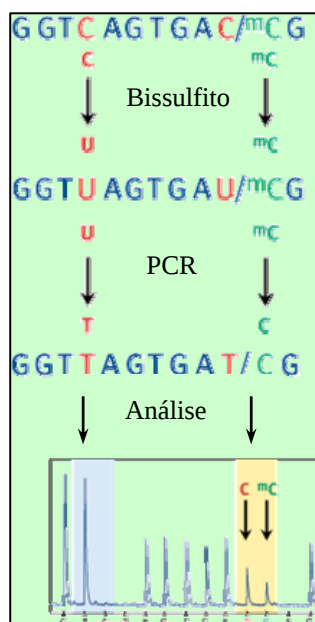


Figura 13 – Procedimento para análise de metilação do DNA. Tratamento com bissulfito que transforma as citosinas não metiladas em uracilas; PCR para amplificação da gene região alvo do gene; análise por pirosequenciamento através da emissão do pirograma.

4.8.1 Critérios de Análise do Perfil de Metilação

Todos os ensaios foram feitos em duplicata, com duas amplificações realizadas em momentos diferentes. Foram levados em consideração os resultados que permaneceram iguais em ambos os ensaios. Os casos que não obtivemos os mesmos resultados foram excluídos da análise (N=32), pois não havia reagentes suficientes para repeti-los.

Ainda não há um consenso sobre valores utilizados para estabelecer um *cutoff*, e também quais critérios devem ser usados para considerar um caso metilado. No entanto, alguns estudos consideraram casos metilados, aqueles que variam de 9 a 15% das ilhas CpGs metiladas. Outros autores, estabeleceram que casos demonstrando de 10 a 26% de metilação como intermediários ou com baixo nível de

metilação e acima destes valores como metilado ou alto nível de metilação, respectivamente (RAJEEVAN et al. 2006; MINESKA et al. 2007; LEE et al. 2008; EVERHARD et al. 2009).

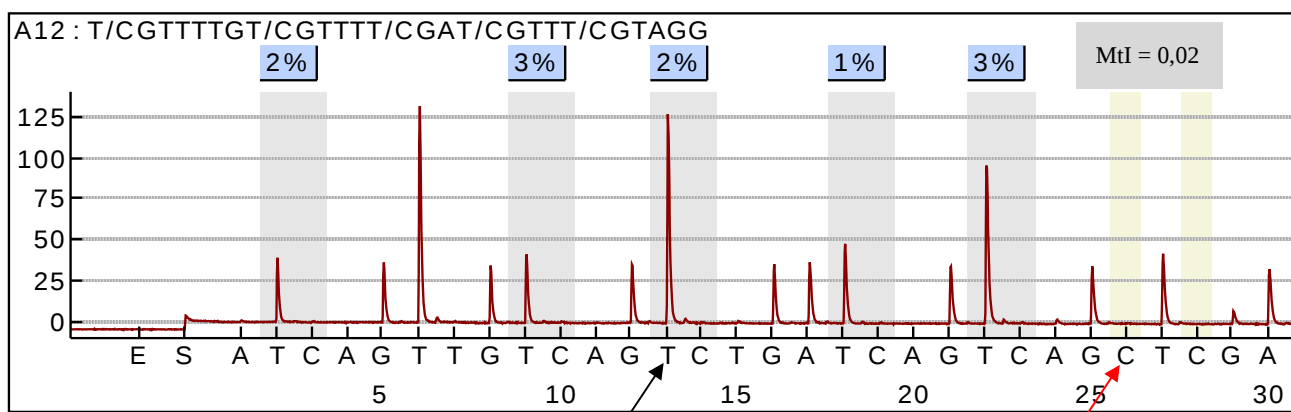
Em nosso estudo para determinar o nível de metilação de uma amostra, utilizamos os critérios descritos por SHAW et al. (2006), com algumas modificações. Os autores estabeleceram o índice de metilação (MtI) para cada sítio CpG, utilizando a seguinte fórmula: $mC/(mC+C)$ onde, mC corresponde ao número de citosinas metiladas e C ao número de citosinas não metiladas. As citosinas metiladas demonstram uma porcentagem correspondente ao dinucleotídeo C e as citosinas não metiladas demonstram uma porcentagem correspondente ao dinucleotídeo T. Após o cálculo deste índice para cada sítio CpG avaliado foi realizada uma média dos cinco sítios avaliados para cada amostra.

Em nosso estudo não houve nenhuma amostra que apresentou 0% de metilação para os cinco sítios CpGs avaliados. Assim sendo, consideramos uma discreta porcentagem de metilação como sendo background. No estudo de SHAW et al. (2008) foi considerado um cut-off de 5% de forma aleatória. Diante disso, para estabelecer um cut-off mais acurado, avaliamos o nível de metilação do promotor do gene *MGMT* em nove amostras de tecido colônico normal. Observamos que os sítios mC demonstraram uma variação de 1% a 10%. Assim sendo, foi realizada uma média destes sítios onde, MtI igual ou menor que 0,10 foi considerado dentro do padrão de variabilidade dos casos não metilados. Os casos que demonstraram MtI maior que 0,10 foram considerados metilados.

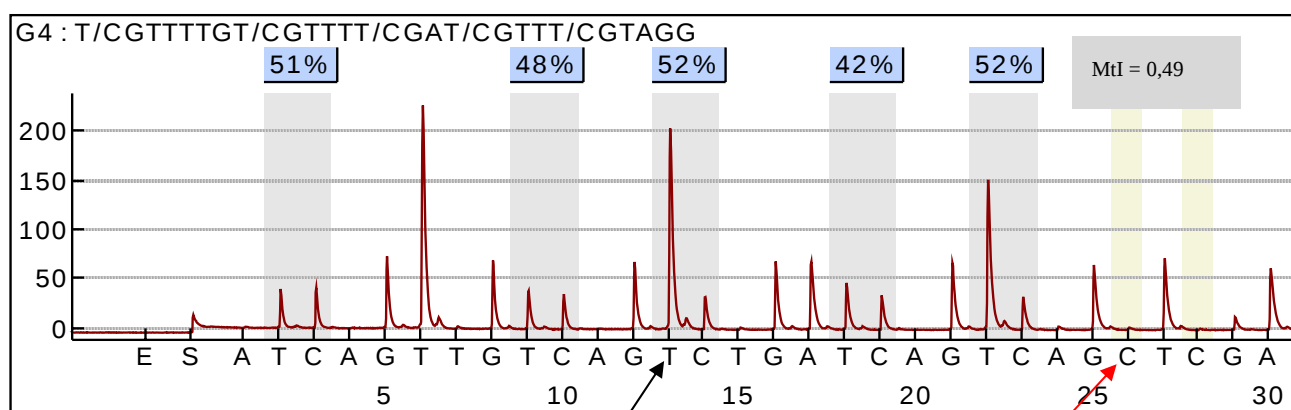
Tabela 5 - Critérios de classificação do *status* de metilação do gene *MGMT*.

Não metilado	Metilado
MtI 0 a 0,10	MtI > 0,10

A Figura abaixo representa os pirogramas emitidos com a variação de incorporação do nucleotídeo T nas ilhas CpGs que são utilizados para o cálculo do MtI.



A – Pirograma demonstrando variação de incorporação de T nas ilhas CpGs de 1 a 3%;



B - Pirograma demonstrando variação de incorporação de T nas ilhas CpGs de 42 a 52%;

Figura 14 – Pirogramas de incorporação de nucleotídeos T nas ilhas CpGs de DNA tratado com bissulfito. Seta preta representa a ilha CpG e seta vermelha o controle.

4.9 ANÁLISE DO NÍVEL DE NITRATO E NITRITO NO SANGUE

A análise de nitrato e nitrito foi realizada na amostra do plasma congelado (arquivado no Banco de Tumores). Dos pacientes selecionados, apenas 38 amostras de plasma estavam disponíveis no banco de tumores para o estudo. Assim, foram incluídos mais 3 casos operados no ano de 2007, chegando num total de 41 casos analisados e 50 controles com indivíduos sem neoplasia, cujas amostras foram cedidas pelo laboratório responsável pela dosagem. A média de idade destes foi de 63,6 anos. A concentração de nitrito neste grupo variou de 8,8 mg/l a 98,9mg/l e, a de nitrato variou de 10,2mg/l a 144,4mg/l e, estes resultados foram usados como referência para as nossas análises.

4.9.1 Nitrato

O método se baseia na redução do nitrato, presente na amostra, a nitrito. O nitrito é determinado pela formação de um azo corante, por copulação entre ácido sulfanílico diazotado e dicloridrato de N-(1-naftyl)-etilediamina. A leitura é feita em um comprimento de onda de 500nm.

O protocolo foi seguido conforme Anexo 6.

4.9.2 Nitrito

O método se baseia na formação de um azo corante, por copulação entre ácido sulfanílico diazotado e dicloridrato de N-(1-naftyl)-etilediamina, em um pH entre 2,0 e 2,5. Como o ácido sulfanílico diazotado é gerado no meio por reação entre o ácido sulfanílico adicionado e o nitrito presente na amostra. A intensidade da

coloração final depende da concentração de nitrito na amostra. A leitura é feita em um comprimento de onda de 500nm.

O protocolo foi seguido conforme Anexo 6.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foram utilizados bancos de dados obtidos a partir das informações de dados clínicos e anatomopatológicos armazenados no programa *SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows*, versão 17.0. Na análise de associação entre as variáveis foi utilizado o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher

A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

6.1.1 Descrição Anatomopatológica

No presente estudo, a revisão de lâminas para a confirmação diagnóstica foi possível em 212 casos que apresentavam lâminas armazenados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo, mas 1 destes não havia blocos para realização de novos cortes e análise imunoistoquímica . Neste momento, também foi realizado a confirmação das seguintes variáveis anatomopatológicas: grau de diferenciação, sendo bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado; padrão de crescimento macroscópico do tumor, sendo dividido em exofítico, endofítico, difuso e misto; borda de invasão, infiltrativa ou expansiva; Infiltrado tipo Crohn; presença de infiltrado linfocitário peritumoral leve, moderado ou intenso; desmoplasia leve, moderada ou intensa; invasões vascular sanguínea, linfática e perineural; *budding*; necrose suja; adenomas associados, ou tumores oriundo em adenomas como, adenoma clássico, adenoma serreado tradicional, pólipó hiperplásico e adenoma sésil serreado.

De acordo com o grau de diferenciação foi observado a predominância de adenocarcinoma moderadamente diferenciado, sendo este 163 casos (76,9%), pouco diferenciado em 25 casos (11,8%) e bem diferenciado em 24 casos (11,3%). Quanto ao padrão de crescimento macroscópico do tumor, em 52 casos (23,8%) foi exofítico, em 49 (22,8%) endofítico, em 5 (2,4%) difuso, em 103 (44,1%) era misto e, em 3

casos (1,5%) não foi possível avaliar. De acordo com a borda de invasão, em 153 casos (72,2%) o tumor era infiltrativo, em 58 (27,4%) era expansivo e, em um caso (0,5%) não havia invasão. Em 4 casos (1,9%) encontramos presença de infiltrado tipo Crohn e, em 208 (98,1%) não foi encontrado este tipo de infiltrado. Infiltrado linfocitário peritumoral moderado foi mais predominante, correspondendo a 95 casos (44,8%), seguido de 89 casos (42%) com infiltrado linfocitário leve, 23 (10,8%) intenso e, em 5 casos (2,4%) estava ausente. Desmoplasia ocorreu de forma leve e moderada no mesmo número de casos, 67 casos (31,6%), em 20 casos (9,4%) apresentou-se de forma intensa e, em 58 (27,4%) estava ausente. Em relação à invasão sanguínea, em 199 casos (93,9%) estava ausente e, em 13 (6,1%) presente. Invasão linfática foi encontrada em 29 casos (13,7%) e ausente em 183 casos (86,3%). Invasão perineural estava ausente em 190 casos (89,6%) e, presente em 22 casos (10,4%). *Budding* estava ausente em 124 casos (58,5%), e presente em 76 casos, sendo leve em 69 casos (32,5%), moderado em 6 (2,8%), intenso em 1 caso (0,5%) e ignorado em 12 casos (5,7%). Necrose suja estava ausente em 53 casos (25%) e presente em 84, sendo leve em 27 casos (12,7%), moderada em 34 (16%), intensa em 23 (10,8%) e ignorada em 75 casos (35,4%). Foi encontrada associação com adenoma em 42 casos, sendo adenoma clássico em 27 casos (12,7%), adenoma serreado tradicional em 13 (6,2%), pólipos hiperplásicos em 7 (3,3%), adenoma sésil serreado em 1 caso (0,4%). Todas as variáveis anatomopatológicas estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis anatomopatológicas (n=212).

Variável	N	%
Grau de diferenciação		
Bem	24	11,3
Moderadamente	163	76,9
Pouco	25	11,8
Padrão de crescimento macroscópico		
Exofítico	52	23,8
Endofítico	49	22,8
Difuso	5	2,4
Misto	103	44,1
Ignorado	3	1,5
Borda de invasão		
Infiltrativa	153	72,2
Expansiva	58	27,4
Ausente	1	0,5
Infiltrado tipo Crohn		
Ausente	208	98,1
Presente	4	1,9
Infiltrado linfocitário peritumoral		
Ausente	5	2,4
Leve	89	42
Moderado	95	44,8
Intenso	23	10,8
Desmoplasia		
Ausente	58	27,4
Leve	67	31,6
Moderada	67	31,6
Intensa	20	9,4
Invasão sanguínea		
Ausente	199	93,9
Presente	13	6,1
Invasão linfática		
Ausente	183	86,3
Presente	29	13,7
Invasão perineural		
Ausente	190	89,6
Presente	22	10,4
Budding		
Ausente	124	58,5
Presente	76	35,8
Ignorado	12	5,7
Necrose suja		
Ausente	53	25,0
Leve	27	12,7
Moderada	34	16,0
Intensa	23	10,8
Ignorado	75	35,4
Tipo histológico		
Tubular	140	66,0
Com diferenciação mucinosa	26	12,3
Mucinoso	16	7,5
Cribriforme	8	3,8
Anel de sinete	1	0,5
Outros	20	9,4
Ignorado	1	0,5
Oriundo em adenoma		
Adenoma serreado tradicional	11	5,2
Adenoma séssil serreado	2	0,9
Adenoma tradicional	5	2,4
Ausente	194	91,5
Adenoma associado		
Adenoma clássico	27	12,7
Adenoma serreado tradicional	13	6,2
Pólipo hiperplásico	7	3,3
Adenoma séssil serreado	1	0,4
Ausente	164	77,4

6.1.2 Descrição de dados clínicos

As variáveis clínicas foram coletadas durante a revisão dos prontuários, sendo: localização do tumor, tipo de cirurgia realizada, estágio T, N e M e grupo por estágio.

Os tumores colônicos foram mais presentes nesta amostra, sendo em 92 casos (31,7%) no cólon direito, também em 92 casos (31,7%) no cólon esquerdo e, em 56 (19,3%) localizados no reto. Colectomia parcial foi a cirurgia mais prevalente, 163 casos (68,2%), seguida da ressecção anterior do reto em 58 casos (24,3%) e outras em 18 casos (7,5%). Em relação ao estágio T, 49 casos (20,4%) estavam entre T1 e T2 e, 191 (79,6%) entre T3 e T4. Cento e vinte casos (50%) se apresentaram sem comprometimento de linfonodo (N0), 118 (49,2%) apresentavam-se entre estágio N1 e N2 e, em 2 casos (0,8%) esta informação não constava no prontuário. Em relação à metástase ao diagnóstico, em 187 casos (77,9%) não apresentaram metástase. Dos que apresentaram, 28 casos (11,7%) era no fígado, 8 (3,3%) no pulmão ou retroperitônio e, em 17 casos (7,1%) em outras localizações. Quanto ao estágio clínico, 115 casos (47,9%) estavam entre estágio I e II, e 125 casos (52,1%) entre os estádios III e IV. As variáveis clínicas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Variáveis clínicas (n=240).

Variáveis	N	%
Tumor primário		
Cólon direito	92	31,7
Cólon esquerdo	92	31,7
Reto	56	19,3
Cirurgia realizada		
Colectomia parcial	163	67,9
Ressecção anterior do reto	58	24,2
Outras	19	7,9
Estádio pT		
T1 – T2	49	20,4
T3 – T4	191	79,6
Estádio pN		
N0	120	50,0
N1 – N2	118	49,2
Ignorado	2	0,8
Metástase ao diagnóstico		
Fígado	28	11,7
Pulmão ou retroperitônio	8	3,3
Outros	17	7,1
Ausente	187	77,9
Grupo por estágio		
I – II	115	47,9
III - IV	125	52,1

6.2 ANÁLISE DA METILAÇÃO DE *MGMT*

Em todos os casos disponíveis no banco de tumores foi realizada revisão da lâmina de H&E em microscópio óptico comum e a área do tumor foi demarcada. Quatro casos foram excluídos por apresentarem apenas material de adenoma, e onze por apresentarem menos que 10% de tecido tumoral.

De acordo com os critérios estabelecidos para a análise 43 casos (31,2%) encontravam-se não metilados, 95 casos (68,8%) metilados, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Perfil de metilação de *MGMT* (n=138)

Metilação de <i>MGMT</i>	N	%
Não metilado	43	31,2
Metilado	95	68,8

Todos os valores de metilação de cada caso estão descritos no Anexo 7.

6.3 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA

6.3.1 *MGMT*

Foram encontrados 43 casos (32,6%) com perda de expressão (Figura 15), 89 (67,4%) com presença da expressão de *MGMT* (Figura 16). Conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Expressão da proteína *MGMT* de acordo com a presença ou perda da proteína (n=132).

<i>MGMT</i>	N	%
Perda da expressão	43	32,6
Presença da expressão	89	67,4

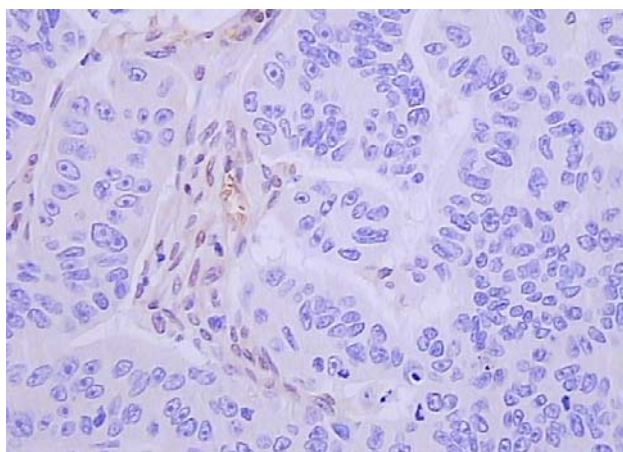


Figura 15 – Adenocarcinoma colorretal. Perda da expressão de MGMT (40X).

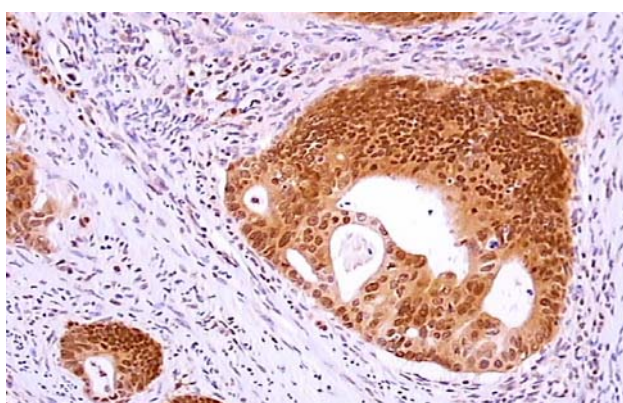


Figura 16 – Adenocarcinoma colorretal. Expressão de MGMT com positividade nuclear e citoplasmática, encontrada nas amostras parafinadas (20X).

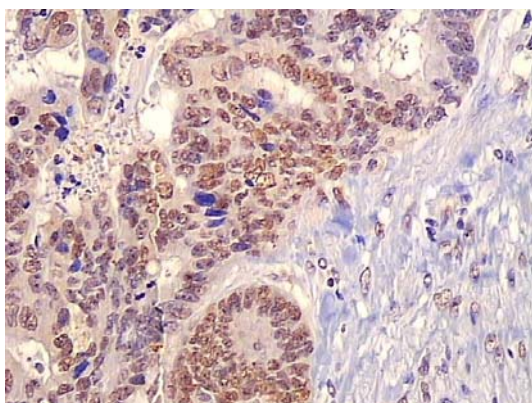
A associação do perfil de metilação de *MGMT* com a expressão de sua proteína demonstrou que, 93,9% dos casos com perda da expressão da proteína encontravam-se metilados ($p < 0,001$), conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Associação do perfil de metilação de *MGMT* com a expressão da proteína *MGMT* (n=76).

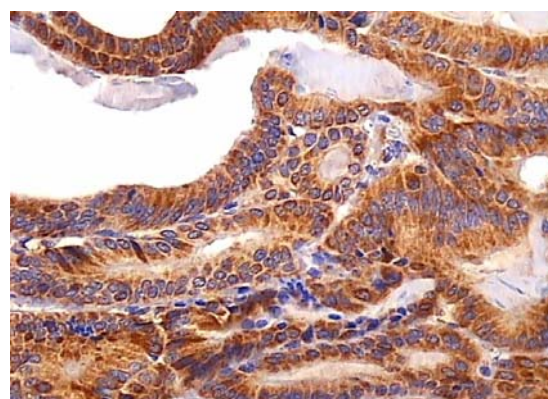
Metilação de <i>MGMT</i>	Expressão de <i>MGMT</i>		p
	Perda	Presença	
Não metilado	2(6,1%)	21(48,8%)	<0,001
Metilado	31(93,9%)	22(51,2%)	

6.3.2 NOS1, NOS2 e NOS3

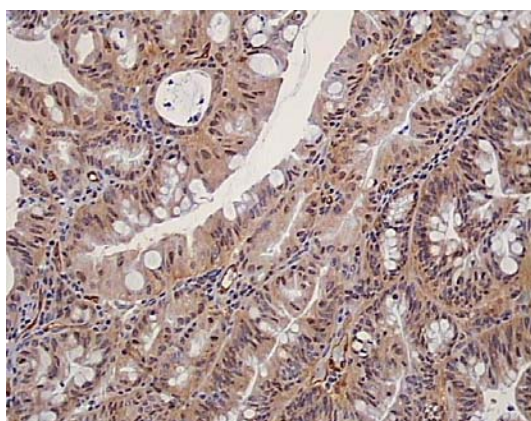
A imunorreatividade da NOS1 foi negativa em 4 (1,9%) dos 211 pacientes e positiva em 204 (98,1%). Dentre estes com expressão positiva, a marcação foi evidenciada em 34 (16,4%) casos no núcleo, 43 (20,8%) no citoplasma e, 130 (62,8%) no núcleo e citoplasma. Para a NOS2 foi negativa em 4 (1,9%) e positiva em 207 (98,1%). Em todos os casos a positividade foi citoplasmática. Na NOS3 foi negativa em 9 (4,3%) e positiva em 202 (95,7%). Dentre estes casos de positividade a distribuição da marcação ocorreu em 2 (0,9%) casos no núcleo, 195 (96,5%) no citoplasma e 5 (2,6%) no núcleo e citoplasma (Tabela 11 e 12). Foi analisada a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3 como demonstrado na Figura 17.



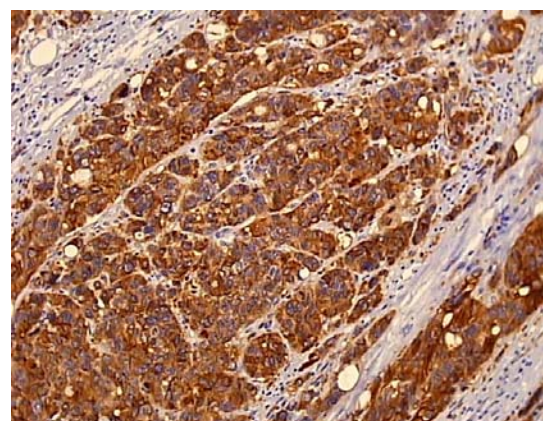
A - NOS1 demonstrando expressão nuclear e citoplasmática (40x)



B - NOS2 demonstrando expressão citoplasmática (40x)



C - NOS3 demonstrando expressão nuclear e citoplasmática (20x)



D - NOS3 demonstrando expressão citoplasmática (20x)

Figura 17 – Fotomicrografia demonstrando as expressões protéicas nos adenocarcinomas colorretais com os anticorpos contra NOS1, NOS2 e NOS3.

Tabela 11 – Expressões das enzimas NOS (n=211) de acordo com a ausência ou presença.

Marcador	Expressão	N	%
NOS1	Positiva	207	98,1
	Negativa	4	1,9
NOS2	Positiva	207	98,1
	Negativa	4	1,9
NOS3	Positiva	202	95,7
	Negativa	9	4,3

Tabela 12 – Expressões das enzimas NOS de acordo com a localização da expressão(n=207).

Marcador	Expressão	N	%
NOS1	Núcleo	34	16,4
	Citoplasma	43	20,8
	Núcleo e citoplasma	130	62,8
NOS2	Citoplasma	207	100,0
NOS3	Núcleo	2	0,9
	Citoplasma	195	96,5
	Núcleo e citoplasma	5	2,6

Para a avaliação das associações da expressão das proteínas NOS1 foi dividida em dois grupos, expressão nuclear e citoplasmática, NOS2 e NOS3 em apenas um grupo, todas levando em consideração a intensidade da expressão.

A associação da expressão de NOS1, NOS2 e NOS3 não apresentou associação com a expressão de MGMT (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação entre a expressão de MGMT com as expressões das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3(n=132).

Variáveis	Expressão de <i>MGMT</i>		p
	Perda	Presença	
NOS1 nuclear			
Ausente/ Fraca	33(76,7%)	62(69,7%)	0,396
Forte / Moderada	10(23,3%)	27(30,3%)	
NOS1 citoplasmática			
Ausente/ Fraca	43(100,0%)	81(91,0%)	NA
Forte / Moderada	-	8(9%)	
NOS2 citoplasmática			
Ausente/ Fraca	23(53,5%)	38(42,7%)	0,244
Forte / Moderada	20(46,5%)	51(57,3%)	
NOS3 nuclear e citoplasmática			
Ausente/ Fraca	31(72,1%)	66(74,2%)	0,801
Forte / Moderada	12(27,9%)	23(25,8%)	

NA- Não avaliável

A associação do perfil de metilação de *MGMT* não foi significativa com a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3. Todos os dados estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Associação do perfil de metilação de *MGMT* com as expressões das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3 (n=115).

Variáveis	Perfil de metilação		
	Não metilado	Metilado	
NOS 1 nuclear			
Ausente/ Fraca	27(67,5%)	57(76,0%)	0,328
Forte / Moderada	13(32,5%)	18(24,0%)	
NOS 1 citoplasmática			
Ausente/ Fraca	37(92,5%)	72(96,0%)	0,421
Forte / Moderada	3(7,5%)	3(4,0%)	
NOS 2			
Ausente/ Fraca	20(50%)	25(33,3%)	0,081
Forte / Moderada	20(50%)	50(66,7%)	
NOS 3			
Ausente/ Fraca	25(62,5%)	54(72,0%)	0,295
Forte / Moderada	15(37,5%)	21(28,0%)	

6.4 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NITRATO E NITRITO

Foram analisadas amostras de plasma de 41 pacientes que foram elegíveis para o estudo e possuíam material disponível no Banco de Tumores. Os resultados estão apresentados em mg/l.

A concentração de nitrito variou de 9,9mg/l a 58,3mg/l e, a de nitrato variou de 6,7 mg/l a 66,6mg/l. A média da concentração de nitrito foi significativamente maior no grupo controle do que nos pacientes, 37,82mg/L e 23,05mg/L respectivamente ($p=0,001$), assim como a média da concentração de nitrato foi significativamente maior no grupo controle do que nos pacientes, 35,44mg/L e

24,65mg/L respectivamente ($p=0,010$) Estes dados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 – Descrição da concentração de Nitrito e Nitrato entre casos e controles.

Características	Casos n(41)	Controle n(50)	p
Concentração de Nitrito (mg/L)	23,05	37,82	0,001*
Concentração de Nitrato (mg/L)	24,65	35,44	0,010*

A concentração média de nitrito e nitrato não foi associada com a expressão da proteínas NOS1, NOS2 e NOS3, conforme demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16 - Associação entre as concentrações de Nitrito e Nitrato com as expressões das proteínas NOS1, NOS 2 e NOS3 (n=40).

Variáveis	Concentração de Nitrito Média	p	Concentração de Nitrato Média	p
NOS 1 nuclear				
Ausente/ Fraca	23,77	0,589	24,97	0,753
Forte / Moderada	20,99		23,13	
NOS 1 citoplasmática				
Ausente/ Fraca	23,64	0,510	25,08	0,493
Forte / Moderada	18,77		19,30	
NOS 2				
Ausente/ Fraca	22,78	0,829	23,70	0,716
Forte / Moderada	23,64		25,35	
NOS 3				
Ausente/ Fraca	23,53	0,856	25,12	0,764
Forte / Moderada	22,77		23,68	

A expressão de MGMT não apresentou associação significativa com as concentrações de nitrito e nitrato (Tabela 17).

Tabela 17 - Associação entre a expressão da proteína *MGMT* com as concentrações de Nitrito e Nitrato (n=21).

<i>MGMT</i>	Concentração de Nitrito	p	Concentração de Nitrato	p
	Média		Média	
Perda da expressão	17,65	0,108	18,55	0,154
Presença da expressão	26,47		26,68	

A concentração de nitrito e nitrato não apresentou associação com o perfil de metilação, conforme demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18 - Associação do perfil de metilação de *MGMT* com as concentrações de Nitrito e Nitrato (n=16).

Metilação <i>MGMT</i>	Concentração de Nitrito	p	Concentração de Nitrato	p
	Média		Média	
Não metilado	14,40		15,80	
Metilado	22,26	0,243	25,28	0,267

6.5 ASSOCIAÇÃO COM DADOS ANÁTOMO-CLÍNICOS

A associação do perfil de metilação de *MGMT* foi realizada para as variáveis clínicas e anatomopatológicas estabelecidas no estudo. Porém, não apresentou nenhuma associação significativa (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 - Associação do perfil de metilação de *MGMT* com variáveis clínicas (n=138)

Variáveis	Perfil de metilação de <i>MGMT</i>		
	Metilado	Não metilado	p
Tumor primário			
Cólon direito	15(34,9%)	33(34,7%)	0,827
Cólon esquerdo	19(44,2 %)	45(47,4%)	
Reto	9(20,9%)	17(17,9%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	27(62,8%)	70(73,7%)	0,140
Ressecção anterior do reto	12(27,9%)	21(22,1%)	
outras	4(9,3%)	4(4,2%)	
Estádio T			
T1 – T2	10(23,3%)	16(16,8%)	0,372
T3 – T4	33(76,7%)	79(83,2%)	
Estádio N			
N0	23(53,5%)	41(43,6%)	0,283
N+	20(46,5%)	53(56,4%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	34(79,1%)	72(75,8%)	0,672
Presente	9(20,9%)	23(24,2%)	
Grupo por estágio			
I – II	23(53,5%)	37(38,9%)	0,111
III - IV	20(46,5%)	58(61,1%)	

Tabela 20 - Associação do perfil de metilação de *MGMT* com variáveis anatomopatológicas (n=116).

Variáveis	Perfil de metilação de <i>MGMT</i>		P
	Não Metilado	Metilado	
Grau de diferenciação			
Bem	4(10,0%)	6(7,9%)	0,875
Moderadamente	32(80,0%)	63(82,9%)	
Pouco	4(10,0%)	7(9,2%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofídico	9(22,5%)	19(25,0%)	NA
Endofídico	10(25,0%)	16(21,1%)	
Difuso	-	2(2,6%)	
Misto	21(52,5%)	39(51,3%)	
Desmoplasia			
Ausente	8(20,0%)	24(31,6%)	0,185
Presente	32(80,0)	52(68,4%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	38(95,0%)	68(89,5%)	0,313
Presente	2(5,0%)	8(10,5%)	
Invasão linfática			
Ausente	35(87,5%)	68(89,5%)	0,749
Presente	5(12,5%)	8(10,5%)	
Invasão perineural			
Ausente	34(85,0%)	68(89,5%)	0,482
Presente	6(15,0%)	8(10,5%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	1(2,5%)	1(1,3%)	0,641
Presente	39(97,5%)	75(98,7%)	
Necrose suja			
Ausente	7(26,9%)	15(34,9%)	0,492
Presente	19(73,1%)	28(65,1%)	
Budding			
Ausente	22(59,5%)	46(64,8%)	0,586
Presente	15(40,5%)	24(35,2%)	
Borda de invasão			
Ausente	31(77,5%)	51(67,1 %)	NA
Infiltrativa	9(22,5%)	25(32,9%)	
Expansiva	-	-	
Tipo histológico			
Tubular	28(71,8%)	44(57,9%)	0,341
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	4(10,3%)	17(22,4%)	
Cribriforme	3(7,7%)	4(5,3%)	
Outros	4(10,3%)	11(14,5%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	2(66,7%)	3(50,0%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	1(16,7%)	
Adenoma tradicional	1(33,3%)	2(33,3%)	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	2(20,0%)	5(35,7%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	-	
Pólipo hiperplásico	1(10,0%)	3(21,4%)	
Adenoma clássico	7(70,0%)	6(42,9%)	

NA- Não avaliável

A expressão de *MGMT* foi também associada com as variáveis clínicas e anatomopatológicas do estudo.

A presença da expressão mostrou associação com a presença de linfonodos positivos ($p=0,047$), com a presença de desmoplasia ($p=0,003$), com a presença de necrose suja ($p=0,002$) e com a presença de *budding* ($p=0,007$). Todas as associações analisadas estão demonstradas nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 - Associação entre a expressão da proteína *MGMT* com variáveis clínicas (n=132).

Variáveis	Expressão de <i>MGMT</i>		p
	Negativa	Positiva	
Tumor primário			
Cólon direito	17(39,5%)	35(39,3%)	0,762
Cólon esquerdo	19(44,2%)	36(40,4%)	
Reto	7(16,3%)	18(20,2%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	32(74,4%)	54(60,7%)	0,188
Ressecção anterior do reto	8(18,6%)	27(30,3%)	
outras	3(7,0%)	8(9,0%)	
Estádio T			
T1 – T2	8(18,6%)	18(20,2%)	0,826
T3 – T4	35(81,4%)	71(79,8%)	
Estádio N			
N0	27(62,8%)	39(44,3%)	0,047*
N+	16(37,2%)	49(55,7%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	35(81,4%)	64(73,0%)	0,293
Presente	8(18,6%)	24(27,0%)	
Grupo por estágio			
I – II	24(55,8%)	39(43,8%)	0,196
III - IV	19(44,2%)	50(56,2%)	

Tabela 22 – Associação entre a expressão da proteína *MGMT* com variáveis anatomopatológicas (n=132)

Variáveis	Expressão de <i>MGMT</i>		p
	Negativa	Positiva	
Grau de diferenciação			
Bem	5(11,6%)	6(6,7%)	0,720
Moderadamente	35(81,4%)	67(75,3%)	
Pouco	3(7,0%)	16(18,0%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofídico	9(20,9%)	24(27,3%)	0,831
Endofídico	12(27,9%)	20(22,7%)	
Difuso	2(4,7%)	1(1,1%)	
Misto	20(46,5%)	43(48,9%)	
Desmoplasia			
Ausente	16(37,2%)	13(14,6%)	0,003*
Presente	27(62,8%)	76(85,4%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	38(88,4%)	83(93,3%)	0,341
Presente	5(11,6%)	6(6,7%)	
Invasão linfática			
Ausente	40(93,0%)	74(83,1%)	0,121
Presente	3(7,0%)	15(16,9%)	
Invasão perineural			
Ausente	42(97,7%)	79(88,8%)	0,83
Presente	1(2,3%)	10(11,2%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	1(2,3%)	2(2,2%)	0,977
Presente	42(97,7%)	87(97,8%)	
Necrose suja			
Ausente	13(59,1%)	14(23,0%)	0,002*
Presente	9(40,9%)	47(77,0%)	
Budding			
Ausente	27(71,1%)	38(44,7%)	0,007*
Presente	11(28,9%)	47(55,3%)	
Borda de invasão			
Ausente	-	-	NA
Infiltrativa	29(67,4%)	74(83,1%)	
Expansiva	14(32,6%)	15(16,9%)	
Tipo histológico			
Tubular	25(58,1%)	61(69,3%)	0,474
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	12(27,9%)	14(15,9%)	
Cribriforme	1(2,3%)	5(5,7%)	
Outros	5(11,6%)	8(9,1%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	2(66,7%)	5(83,3%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	1(16,7%)	
Adenoma tradicional	1(33,3%)	-	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	3(30,0%)	5(26,3%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	-	
Pólipo hiperplásico	1(10,0%)	1(5,3%)	
Adenoma clássico	6(60,0%)	13(68,4%)	

NA- Não avaliável

As expressões protéicas de NOS1, NOS2 e NOS3 foram associadas com as variáveis clínicas e anatomopatológicas já citadas.

A expressão moderada/forte de NOS1 citoplasmática foi associada com linfonodos positivos. Já a expressão nuclear de NOS1 não apresentou significância estatística com as variáveis clínicas, conforme descrito nas Tabelas 23 e 24.

Tabela 23 - Associação entre a expressão de NOS1 citoplasmática com variáveis clínicas (n=211)

Variáveis	NOS1 citoplasmática		
	Fraca/ Negativa	Moderada/ Forte	P
Tumor primário			
Cólon direito	75(37,7%)	7(58,3%)	0,219
Cólon esquerdo	75(37,7%)	3(25,0%)	
Reto	49(24,6%)	2(16,7%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	137(68,8%)	9(75,0%)	0,809
Ressecção anterior do reto	49(24,6%)	2(16,7%)	
Outras	13(6,5%)	1(8,3%)	
Estádio T			
T1 – T2	36(22,9%)	2(22,2%)	0,915
T3 – T4	121(77,1%)	42(77,8%)	
Estádio N			
N0	112(56,6%)	2(16,7%)	0,007*
N+	86(43,4%)	10(83,3%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	163(81,9%)	9(75,0%)	0,549
Presente	36(18,1%)	3(25,0%)	
Grupo por estágio			
I – II	107(53,8%)	3(25,0%)	0,053
III - IV	92(46,2%)	9(75,0%)	

Tabela 24 - Associação entre a expressão de NOS1 nuclear com variáveis clínicas (n=211)

Variáveis	NOS1 nuclear		
	Fraca/ Negativa	Moderada/ Forte	P
Tumor primário			
Cólon direito	55(35,0%)	27(50,0%)	0,221
Cólon esquerdo	64(40,8%)	14(25,9%)	
Reto	38(24,2%)	13(24,1%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	107(68,2%)	39(72,2%)	0,403
Ressecção anterior do reto	38(24,2%)	13(24,1%)	
Outras	12(7,6%)	2(3,7%)	
Estádio T			
T1 – T2	36(22,9%)	12(22,2%)	0,915
T3 – T4	121(77,1%)	42(77,8%)	
Estádio N			
N0	88(56,4%)	26(48,1%)	0,294
N+	68(43,6%)	28(51,9%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	129(82,2%)	43(79,6%)	0,679
Presente	28(17,8%)	11(20,4%)	
Grupo por estágio			
I – II	85(54,1%)	25(46,3%)	0,320
III - IV	72(45,9%)	29(53,7%)	

A expressão forte/moderada de NOS1 citoplasmática apresentou associação significativa com a ausência das invasões sanguínea ($p=0,005$), linfática ($p=0,035$) e perineural ($p=0,05$), sendo que os demais dados associados não foram significativos, como demonstrado na Tabela 25.

Tabela 25 -Associação entre a expressão de NOS1 citoplasmática com variáveis anatomopatológicas (n=211).

Variáveis	NOS1 citoplasma		p
	Fraca/ Negativa	Moderada/ Forte	
Grau de diferenciação			
Bem	24(12,1%)	-	NA
Moderadamente	156(78,4%)	6(50%)	
Pouco	19(9,5%)	6(50%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofítico	51(25,8%)	2(16,7%)	NA
Endofítico	44(22,2%)	4(33,3%)	
Difuso	5(2,5%)	-	
Misto	98(49,5%)	6(50%)	
Desmoplasia			
Ausente	53(26,6%)	5(41,7%)	0,257
Presente	146(73,4%)	7(58,3%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	189(95,0%)	9(75,0%)	0,005*
Presente	10(5,0%)	3(25,0%)	
Invasão linfática			
Ausente	175(87,9%)	8(66,7%)	0,035*
Presente	24(12,1%)	4(33,3%)	
Invasão perineural			
Ausente	189(95,0%)	9(75,0%)	0,005*
Presente	10(5,0%)	3(25,0%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	5(2,5%)	-	0,578
Presente	194(97,5%)	12(100%)	
Necrose suja			
Ausente	48(37,8%)	5(55,6%)	0,291
Presente	79(62,2%)	4(44,4%)	
Budding			
Ausente	120(63,8%)	4(36,4%)	0,068
Presente	68(36,2%)	7(63,6%)	
Borda de invasão			
Ausente	1(0,5%)	-	NA
Infiltrativa	142(71,4%)	10(83,3%)	
Expansiva	56(28,1%)	2(16,7%)	
Tipo histológico			
Tubular	132(66,3%)	7(63,6%)	NA
Mucinoso ou c/diferenciação mucinosa	39(19,6%)	3(27,3%)	
Cribriforme	8(4,0%)	-	
Outros	20(10,1%)	1(9,1%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	10(55,6%)	1(100%)	NA
Adenoma séssil serreado	2(11,1%)	-	
Adenoma tradicional	5(27,8%)	-	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	11(28,2%)	-	NA
Adenoma séssil serreado	1(2,6%)	-	
Pólipo hiperplásico	3(7,7%)	1(33,3%)	
Adenoma clássico	24(61,5%)	2(66,7%)	

NA- Não avaliablel

A expressão forte/moderada de NOS1 nuclear apresentou associação significativa com a presença de *budding* ($p=0,013$) e, os demais dados de suas expressão com variáveis anatomopatológicas estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Associação entre a expressão de NOS1 nuclear com variáveis anatomopatológicas (n=211).

Variáveis	NOS1 nuclear		p
	Fraca/ Negativo	Moderada/ Forte	
Grau de diferenciação			
Bem	18(11,5%)	6(11,1%)	0,569
Moderadamente	122(77,7%)	40(74,1%)	
Pouco	17(10,8%)	8(14,8%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofítico	38(24,4%)	15(27,8%)	0,555
Endofítico	40(25,6%)	8(14,8%)	
Difuso	4(2,6%)	1(1,9%)	
Misto	74(47,4%)	30(55,6%)	
Desmoplasia			
Ausente	45(28,7%)	13(24,1%)	0,515
Presente	112(71,3%)	41(75,9%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	147(93,6%)	51(94,4%)	0,830
Presente	10(6,4%)	3(5,6%)	
Invasão linfática			
Ausente	139(88,5%)	44(81,5%)	0,188
Presente	18(11,5%)	10(18,5%)	
Invasão perineural			
Ausente	141(89,8%)	49(90,7%)	0,844
Presente	16(10,2%)	5(9,3%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	4(2,5%)	1(1,9%)	0,772
Presente	153(97,5%)	53(98,1%)	
Necrose suja			
Ausente	37(38,1%)	16(41,0%)	0,755
Presente	60(61,9%)	23(59,0%)	
Budding			
Ausente	100(67,1%)	24(48,0%)	0,016*
Presente	49(32,9%)	26(52,0%)	
Borda de invasão			
Ausente	1(0,6%)	-	NA
Infiltrativa	109(69,4%)	43(79,6%)	
Expansiva	47(29,9%)	11(20,4%)	
Tipo histológico			
Tubular	105(67,3%)	34(63,0%)	0,855
Mucinoso ou c/diferenciação mucinosa	28(17,9%)	14(25,9%)	
Cribriforme	6(3,8%)	2(3,7%)	
Outros	17(10,9%)	4(7,4%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	8(53,3%)	3(100%)	NA
Adenoma séssil serreado	2(13,3%)	-	
Adenoma tradicional	5(33,3%)	-	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	8(25,0%)	3(30,0%)	NA
Adenoma séssil serreado	1(3,1%)	-	
Pólipo hiperplásico	4(12,5%)	-	
Adenoma clássico	19(59,4%)	7(70,0%)	

NA- Não avaliável

A expressão moderada/forte de NOS2 apresentou associação estatisticamente significativa com o estágio N+ ($p=0,046$) e com o estágio clínico III - IV ($p=0,048$). Os demais dados não apresentaram significância estatística e estão apresentados nas Tabelas 27 e 28.

Tabela 27 - Associação entre a expressão de NOS2 com variáveis clínicas (n=211).

Variáveis	NOS2		p
	Fraco/ Negativo	Moderado/ Forte	
Tumor primário			
Cólon direito	42(46,7%)	40(33,1%)	0,820
Cólon esquerdo	29(32,2%)	49(40,5%)	
Reto	19(21,1%)	32(26,4%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	62(68,9%)	84(69,4)	0,873
Ressecção anterior do reto	23(25,6%)	28(23,1%)	
outras	5(5,6%)	9(7,4%)	
Estádio T			
T1 – T2	20(22,2%)	28(23,1%)	0,875
T3 – T4	70(77,8%)	93(76,9%)	
Estádio N			
N0	56(62,2%)	58(48,3%)	0,046*
N+	34(37,8%)	62(51,7%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	75(83,3%)	97(80,2%)	0,558
Presente	15(16,7%)	24(19,8%)	
Grupo por estágio			
I – II	54(60,0%)	56(46,3%)	0,048*
III - IV	36(40,0%)	65(53,7%)	

Tabela 28 - Associação entre a expressão de NOS2 com variáveis anatomopatológicas (n=211).

Variáveis	NOS 2		p
	Fraco/ Negativo	Moderado/ Forte	
Grau de diferenciação			
Bem	7(7,8%)	17(14,0%)	0,058
Moderadamente	69(76,7%)	93(76,9%)	
Pouco	14(15,4%)	11(9,1%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofídico	23(25,8%)	30(24,8%)	0,931
Endofídico	20(22,5%)	28(23,1%)	
Difuso	2(2,2%)	3(2,5%)	
Misto	44(49,4%)	60 (49,6%)	
Desmoplasia			
Ausente	28(31,1%)	30(24,8%)	0,309
Presente	62(68,9%)	91(75,2%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	84(93,3%)	114(94,2%)	0,792
Presente	6(6,7%)	7(5,8%)	
Invasão linfática			
Ausente	75(83,3%)	108(89,3%)	0,210
Presente	15(16,7%)	13(10,7%)	
Invasão perineural			
Ausente	84(93,3%)	106(87,6%)	0,169
Presente	6(6,7%)	15(12,4%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	3(3,3%)	2(1,7%)	0,427
Presente	87(96,7%)	119(98,3%)	
Necrose suja			
Ausente	23(42,6%)	30(36,6%)	0,482
Presente	31(57,4%)	53(63,4%)	
Budding			
Ausente	52(61,9%)	72(62,6%)	0,919
Presente	32(38,1%)	43(37,4%)	
Borda de invasão			
Ausente	-	1(8,0%)	NA
Infiltrativa	62(68,9%)	90(74,4%)	
Expansiva	28(31,1%)	30(24,8%)	
Tipo histológico			
Tubular	57(64%)	82(67,8%)	0,693
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	20(22,5%)	22(18,2%)	
Cribriforme	2(2,2%)	6(5,0%)	
Outros	10(11,2%)	11(9,1%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	7(77,8%)	4(44,4%)	NA
Adenoma séssil serreado	1(11,1%)	1(11,1%)	
Adenoma tradicional	1(11,1%)	4(44,4%)	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	5(31,3%)	6(23,1%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	1(3,8%)	
Pólipo hiperplásico	1(6,3%)	3(11,5%)	
Adenoma clássico	10(62,5%)	16(61,5%)	

NA- Não avaliável

Dos casos com expressão forte/moderada da proteína NOS3, 59,7% apresentou associação significativa com presença de desmoplasia ($p=0,006$), 60,5% estiveram associados à ausência de necrose suja ($p=0,001$) e, 43,5% à tumores do tipo tubular ($p=0,004$) (Tabelas 29 e 30).

Tabela 29 - Associação entre a expressão de NOS3 com variáveis clínicas (n=211).

Variáveis	NOS3		p
	Fraco/ Negativo	Moderado/ Forte	
Tumor primário			
Cólon direito	51(34,2%)	31(50,0%)	0,07
Cólon esquerdo	55(36,9%)	23(37,1%)	
Reto	43(28,9%)	8(12,9%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	99(66,4%)	47(75,8%)	0,424
Ressecção anterior do reto	41(27,5%)	10(16,1%)	
outras	9(6,0%)	5(8,1%)	
Estádio T			
T1 – T2	30(20,1%)	18(29,0%)	0,160
T3 – T4	119(79,9%)	44(71,0%)	
Estádio N			
N0	81(71,1%)	33(28,9%)	0,546
N+	68(70,8%)	28(29,2%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	119(79,9%)	53(85,5%)	0,234
Presente	30(20,1%)	9(14,5%)	
Grupo por estágio			
I – II	76(51,0%)	34(54,8%)	0,612
III - IV	73(49,0%)	28(45,2%)	

Tabela 30 - Associação entre a expressão de NOS3 com variáveis anatomopatológicas (n=211).

Variáveis	NOS3		p
	Fraca/ Negativa	Moderada/ Forte	
Grau de diferenciação			
Bem	12(8,1%)	12(19,4%)	0,098
Moderadamente	119(79,9%)	43(69,4%)	
Pouco	18(12,1%)	7(11,3%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofídico	37(25,0%)	16(25,8%)	0,661
Endofídico	36(24,3%)	12(19,4%)	
Difuso	4(2,7%)	1(1,6%)	
Misto	71(48,0%)	33(53,2%)	
Desmoplasia			
Ausente	33(22,1%)	25(40,3%)	0,006*
Presente	116(77,9%)	37(59,7%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	136(91,3%)	62(100%)	NA
Presente	13(8,7%)	-	
Invasão linfática			
Ausente	130(87,2%)	53(85,5%)	0,731
Presente	19(12,8%)	9(14,5%)	
Invasão perineural			
Ausente	138(92,6%)	52(83,9%)	0,053
Presente	11(7,4%)	10(16,1%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	4(2,7%)	1(1,6%)	0,540
Presente	145(97,3%)	61(98,4%)	
Necrose suja			
Ausente	30(30,6%)	23(60,5%)	0,001*
Presente	68(69,4%)	15(39,5%)	
Budding			
Ausente	85(61,2%)	39(65,0%)	0,607
Presente	54(38,8%)	21(35,0%)	
Borda de invasão			
Ausente	1(0,7%)	-	NA
Infiltrativa	111(74,5%)	41(66,1%)	
Expansiva	37(24,8%)	21(33,9%)	
Tipo histológico			
Tubular	112(75,5%)	27(43,5)	0,004*
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	18(12,2%)	24(38,7%)	
Cribriforme	5(3,4%)	3(3,8%)	
Outros	13(8,8%)	8(12,9%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	9(75,0%)	2(33,3%)	NA
Adenoma séssil serreado	1(8,3%)	1(16,7%)	
Adenoma tradicional	2(16,7%)	3(50,0%)	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	7(22,6%)	4(36,4%)	NA
Adenoma séssil serreado	1(3,2%)	-	
Pólipo hiperplásico	3(9,7%)	1(9,1%)	
Adenoma clássico	20(64,5%)	6(54,5%)	

NA- Não avaliável

Associando os dados clínicos e anatomopatológicos destes 41 pacientes com a concentração de nitrito e nitrato, a concentração de ambos foi significativamente maior em indivíduos com linfonodos positivos, 34,7mg/l ($p= 0,01$) e 33,5mg/l (0,05) respectivamente. Não houve associação significativa entre as concentrações de nitrito e nitrato com os demais dados estudados. Os valores estão na Tabelas 31 e 32.

Tabela 31 – Associação entre as concentrações de Nitrito e Nitrato com as variáveis clínicas (n=41).

Variáveis	Concentração de Nitrito	p	Concentração de Nitrato	p
	Média		Média	
Tumor primário				
Cólon direito	26,3		26,1	
Cólon esquerdo	21,8	0,631	23,5	0,862
Reto	22,5		24,6	
Estádio N				
N0	23,9	0,010*	24,6	0,050*
N+	34,7		33,5	
Estádio M				
Ausente	22,7	0,649	23,9	0,436
Presente	24,7		28,4	
Estádio T				
T1 + T2	25,3	0,505	26,7	0,597
T3 + T4	22,3		24,0	
Grupo por estágio				
I –II	23,4	0,776	24,1	0,731
III-IV	22,3		25,7	

Tabela 32 – Associação entre as concentração de Nitrito e Nitrato com as variáveis anatomopatológicas (41 casos).

Variáveis	Concentração de Nitrito	p	Concentração de Nitrato	p
	Média		Média	
Grau de diferenciação				
Bem	21,7	0,870	19,7	0,644
Moderadamente	23,8		25,5	
Pouco	20,7		26,2	
Padrão de crescimento macroscópico				
Exofídico	25,8	0,707	25,5	0,954
Endofídico	19,6		22,4	
Difuso	15,2		20,1	
Misto	23,1		25,6	
Desmoplasia				
Ausente	23,1	0,927	23,6	0,687
Presente	23,4		25,4	
Invasão sanguínea				
Ausente	22,8	0,329	24,4	0,614
Presente	31,6		29,5	
Invasão linfática				
Ausente	23,6	0,770	24,1	0,623
Presente	22,1		26,8	
Invasão perineural				
Ausente	23,6	0,612	24,9	0,749
Presente	20,7		22,8	
Infiltrado linfocitário peritumoral				
Ausente	13,7	0,431	12,0	0,361
Presente	23,5		24,9	
Tipo histológico				
Tubular	23,1	0,216	24,7	0,281
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	20,7		21,5	
Outros	34,6		36,0	
Necrose suja				
Ausente	22,4	0,820	24,4	0,829
Presente	23,6		23,2	
Budding				
Ausente	23,7	0,830	24,8	0,949
Presente	22,8		24,5	
Borda de invasão				
Infiltrativa	20,8	0,66	22,1	0,94
Expansiva	28,3		29,9	
Oriundo em adenoma				
Adenoma serreado tradicional	29,7	0,844	26,8	0,731
Adenoma séssil serreado	38,6		32,3	
Adenoma tradicional	29,1		13,8	
Associado com adenoma				
Adenoma serreado tradicional	22,6	0,491	22,8	0,889
Pólipo hiperplásico	19,4		20,0	
Adenoma clássico	17,1		19,9	

6.6 O PAPEL DA COMBINAÇÃO DO STATUS DE METILAÇÃO DE *MGMT* COM SUA EXPRESSÃO PROTEICA, ASSOCIADOS COM AS NOS, NITRITO E NITRATO E COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGIAS

Os pacientes avaliados para ambos, metilação e imunoistoquímica foram selecionados e divididos em 4 grupos: Grupo 1 - metilado com perda da expressão (n=31); Grupo 2 - metilado sem perda da expressão(n=22); Grupo 3 - não metilado com perda da expressão(n=2); Grupo 4 - não metilado sem perda da expressão(n=21).

Estes foram, então associados com a expressão das NOS, nitrato e nitrito e com as variáveis clínicas e anatomopatológicas. Nenhum dos grupos mostrou associação com a expressão das NOS (Tabela 33 e 34).

Tabela 33 - Combinação da metilação e expressão protéica de *MGMT*, associados com a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3(n=53).

Variáveis	Metilado c/ perda da expressão	Metilado s/ perda da expressão	p
NOS1 nuclear			
Ausente/ Fraca	24(77,4%)	15(68,2%)	0,452
Forte / Moderada	7(22,6%)	7(31,8%)	
NOS1 citoplasmático			
Ausente/ Fraca	31(100,0%)	21(95,5%)	NA
Forte / Moderada	-	1(4,5%)	
NOS2			
Ausente/ Fraca	14(45,2%)	6(27,3%)	0,186
Forte / Moderada	17(54,8%)	16(72,7%)	
NOS3			
Ausente/ Fraca	23(74,2%)	18(81,8%)	0,513
Forte / Moderada	8(25,8%)	4(18,2%)	

NA- Não avaliável

Tabela 34 – Combinação do *status* não metilado e expressão protéica de MGMT, associados com a expressão das proteínas NOS1, NOS2 e NOS3 (n=23).

Variáveis	Não Metilado c/ perda da expressão	Não Metilado s/ perda da expressão	p
NOS1 nuclear			
Ausente/ Fraca	1(50,0%)	14(66,7%)	0,636
Forte / Moderada	1(50,0%)	7(33,3%)	
NOS1 citoplasmática			
Ausente/ Fraca	2(100,0%)	18(85,7%)	NA
Forte / Moderada	-	3(14,3%)	
NOS2			
Ausente/ Fraca	1(50,0%)	10(47,6%)	0,949
Forte / Moderada	1(50,0%)	11(52,4%)	
NOS3			
Ausente/ Fraca	1(50,0%)	14(66,7%)	0,636
Forte / Moderada	1(50,0%)	7(33,3%)	

NA- Não avaliável

A associação dos grupos 1 e 2 com as concentrações de nitrito e nitrato também não demonstraram nenhuma significância estatística, conforme demonstrado na Tabela 35.

Tabela 35 – Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as concentrações de nitrito e nitrato(n=8).

Variáveis	Concentração de	p	Concentração de Nitrato	p
	Nitrito			
	Média		Média	
Metilado c/ perda da expressão	16,03	0,080	18,40	0,162
Metilado s/ perda da expressão	31,22		33,24	

Devido ao pequeno número de casos(n=2) não foi possível avaliar os grupos 3 e 4 com as concentrações de nitrito e nitrato.

A associação dos grupos 1 e 2 com as variáveis clínicas também não demonstraram nenhuma significância estatística, conforme demonstrado na Tabela 36.

Tabela 36 – Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis clínicas(n=53).

Variáveis	Metilado c/ perda da expressão	Metilado c/ presença da expressão	p
Tumor primário			
Cólon direito	12(38,7%)	6(27,3%)	0,379
Cólon esquerdo	15(48,4%)	12(54,5%)	
Reto	4(12,9%)	4(18,2%)	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	24(77,4%)	12(54,5%)	NA
Ressecção anterior do reto	7(22,6%)	9(40,9%)	
outras	-	1(5,0%)	
Estádio T			
T1 – T2	6(19,4%)	4(18,2%)	0,914
T3 – T4	25(80,6%)	18(81,8%)	
Estádio N			
N0	19(61,3%)	8(38,1%)	0,100
N+	12(38,7%)	13(61,9%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	25(80,6%)	16(72,7%)	0,497
Presente	6(19,4%)	6(27,3%)	
Grupo por estágio			
I – II	17(54,8%)	7(31,8%)	0,097
III - IV	14(45,2%)	15(68,2%)	

NA- Não avaliável

Já, em relação às variáveis anatomopatológicas, foram associados à presença de desmoplasia ($p=0,046$), presença de necrose suja ($p=0,002$) e de *budding* ($p=0,024$) (Tabela 37).

Tabela 37 - Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis anatomopatológicas(n=53).

Variáveis	Metilado c/ perda da expressão	Metilado c/ presença da expressão	p
Grau de diferenciação			
Bem	3(9,7%)	-	NA
Moderadamente	26(83,9%)	18(81,8%)	
Pouco	2(6,5%)	4(18,2%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofídico	6(19,2%)	5(22,7%)	NA
Endofídico	8(25,8%)	3(13,6%)	
Difuso	2(6,5%)	-	
Misto	15(48,4%)	14(63,6%)	
Desmoplasia			
Ausente	12(38,7%)	3(13,6%)	0,046*
Presente	19(61,3%)	19(86,4%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	27(87,1%)	19(86,4%)	0,938
Presente	4(12,9%)	3(13,6%)	
Invasão linfática			
Ausente	29(93,5%)	18(81,8%)	0,184
Presente	2(6,5%)	4(18,2%)	
Invasão perineural			
Ausente	30(96,8%)	20(90,9%)	0,363
Presente	1(3,2%)	2(9,1%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	1(3,2%)	-	NA
Presente	30(96,8%)	20(100,0%)	
Necrose suja			
Ausente	9(64,3%)	1(7,1%)	0,002*
Presente	5(35,7%)	13(92,9%)	
Budding			
Ausente	19(73,1%)	9(40,9%)	0,024*
Presente	7(26,9%)	12(59,1%)	
Borda de invasão			
Ausente	-	-	NA
Infiltrativa	20(64,5%)	18(81,8%)	
Expansiva	11(35,5%)	4(18,2%)	
Tipo histológico			
Tubular	16(51,6%)	16(72,7%)	0,247
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	9(29,0%)	3(13,6%)	
Cribriforme	1(3,2%)	1(4,5%)	
Outros	5(16,1%)	1(4,5%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	2(66,7%)		NA
Adenoma séssil serreado	-	-	
Adenoma tradicional	1(33,3%)		
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	2(33,3%)	1(50,0%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	-	
Pólipo hiperplásico	1(16,7%)	-	
Adenoma clássico	3(50,0%)	1(50,0%)	

NA- Não avaliável

A associação do grupo 3 e 4 com as variáveis clínicas e anatomopatológicas também não demonstraram nenhuma significância estatística, e os dados estão demonstrados nas Tabelas 38 e 39.

Tabela 38 – Combinação do *status* não metilado e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis clínicas(n=23).

Variáveis	Não Metilado c/ perda da expressão	Não Metilado s/ perda da expressão	p
Tumor primário			
Cólon direito	2(100,0%)	21(100,0%)	NA
Cólon esquerdo	-	-	
Reto	-	-	
Cirurgia realizada			
Colectomia parcial	2(100,0%)	13(61,9%)	NA
Ressecção anterior do reto	-	4(19,0%)	
outras	-	4(19,0%)	
Estádio T			
T1 – T2	-	5(23,8%)	NA
T3 – T4	2(100,0%)	16(76,2%)	
Estádio N			
N0	2(100%)	8(38,1%)	NA
N+	-	13(61,9%)	
Metástase ao diagnóstico			
Ausente	2(100,0%)	14(66,7%)	NA
Presente	-	7(33,3%)	
Grupo por estágio			
I – II	2(100,0%)	8(38,1%)	NA
III - IV	-	13(61,9%)	

NA- Não avaliável

Tabela 39 - Combinação da metilação e expressão protéica de MGMT, associados com as variáveis anatomopatológicas (n=23).

Variáveis	Não Metilado c/ perda da expressão	Não Metilado s/ perda da expressão	p
Grau de diferenciação			
Bem	-	2(9,5%)	NA
Moderadamente	2(100,0%)	15(71,4%)	
Pouco	-	4(19,0%)	
Padrão de crescimento macroscópico			
Exofídico	1(50,0%)	5(23,8%)	NA
Endofídico	-	6(28,6%)	
Difuso	-	-	
Misto	1(50,0%)	10(47,6%)	
Desmoplasia			
Ausente	1(50,0%)	4(19,0%)	0,311
Presente	1(50,0%)	17(81,0%)	
Invasão sanguínea			
Ausente	2(100,0%)	19(90,5%)	NA
Presente	-	2(9,5%)	
Invasão linfática			
Ausente	2(100,0%)	17(81,0%)	NA
Presente	-	4(19,0%)	
Invasão perineural			
Ausente	2(100,0%)	16(76,2%)	NA
Presente	-	5(23,8%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	-	-	NA
Presente	2(100,0%)	21(100,0%)	
Necrose suja			
Ausente	-	3(20,0%)	NA
Presente	-	12(80,0%)	
Budding			
Ausente	2(100,0%)	9(50,0%)	NA
Presente	-	9(50,0%)	
Borda de invasão			
Ausente	1(50,0%)	19(90,5%)	NA
Infiltrativa	1(50,0%)	2(9,5%)	
Expansiva	-	-	
Tipo histológico			
Tubular	1(50,0%)	12(60,0%)	NA
Mucinoso ou c/ diferenciação mucinosa	1(50,0%)	3(15,0%)	
Cribriforme	-	3(15,0%)	
Outros	-	2(10,0%)	
Oriundo em adenoma			
Adenoma serreado tradicional	-	2(100,0%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	-	
Adenoma tradicional	-	-	
Associado com adenoma			
Adenoma serreado tradicional	1(50,0%)	1(16,7%)	NA
Adenoma séssil serreado	-	-	
Pólipo hiperplásico	-	1(16,7%)	
Adenoma clássico	1(50,0%)	4(66,7%)	

NA- Não avaliável

7 DISCUSSÃO

Com a finalidade de estudar compostos que interferem no status de metilação do gene *MGMT* e na expressão de sua proteína no CCR, este estudo avaliou a expressão das NOS e as concentrações de nitrito e nitrato.

As concentrações de nitrito e nitrato foram avaliadas por meio da técnica de espectrofotometria, a expressão de NOS1, NOS2, NOS3 e *MGMT* por imunistoquímica e o *status* de metilação do gene *MGMT*, utilizando-se a técnica de pirosequenciamento.

O gene *MGMT* pode encontrar-se metilado entre 41% (DE VOGEL et al. 2009) e 60,7% (CHEN et al. 2009) dos tumores colorretais e, isso têm sido relacionado com a perda de expressão protéica. Entretanto, a perda da expressão de *MGMT* também foi associada à exposição ao NO e à compostos por ele formado (LIU et al. 2002; LAVAL e WINK 2004). Porém, até o presente momento nenhum estudo incluiu a avaliação de compostos nitrosos com perfil de metilação e a expressão de *MGMT* em CCR.

O NO é resultado da oxidação da L-arginina pela NOS e reage com o oxigênio formando produtos como o nitrato e o nitrito (LUNDBERG et al. 2004). O NO tem um importante papel na defesa do hospedeiro diante da agressão por patógenos e também na manutenção da homeostase normal do organismo. Contudo, excessiva ou prolongada exposição à NO pode causar uma variedade de processos patológicos incluindo a carcinogênese. Por ser um gás com curto tempo de vida, sua determinação laboratorial é complexa e, geralmente é feita de maneira indireta por

meio de seus produtos ou das enzimas NOS que atuam em seu metabolismo, como realizado neste estudo.

No presente estudo, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato nos pacientes com CCR comparando com o grupo controle de indivíduos sem câncer. Estes apresentaram concentrações significativamente maiores, tanto de nitrito ($p=0,001$) quanto de nitrato ($p=0,010$).

Na literatura os resultados são diferentes daqueles obtidos no presente estudo. SZALECZKY et al. (2000) demonstraram maior concentração de nitrito e nitrato ($p<0.001$) em pacientes com CCR, quando comparados ao grupo controle. Da mesma forma, PATEL et al. (2010) com o objetivo de estimar a formação de NO, avaliaram as concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato e seu papel na patogênese do câncer oral. Estes últimos, encontraram concentrações significativamente maiores em pacientes com lesões pré-neoplásicas e pacientes com tumor na cavidade oral, quando comparado com o grupo controle, associando isso a uma maior atividade do NO.

KODAMA et al. (2003) não observaram diferença entre a concentração de nitrito e nitrato em pacientes portadores de câncer gástrico e com gastrite atrófica, embora a concentração de nitrito no suco gástrico tivesse sido maior nos pacientes com câncer. Estes resultados demonstram que processos inflamatórios também colaboram com o aumento da concentração dos compostos nitrosos.

Tanto nos estudos descritos acima, como neste estudo, foram utilizados os mesmos testes para a determinação de nitrito e nitrato no plasma dos indivíduos. Sendo que em todos foi utilizado plasma congelado. Assim sendo, a alegação de diferenças entre as metodologias não é cabível neste caso. Além disso, se espera

biologicamente que haja um aumento destes compostos no tumor quando comparado com o indivíduo sem tumor. No entanto, uma possível explicação seja o número diminuto de casos utilizados neste estudo para a determinação de nitrito e nitrato no plasma de pacientes portadores de CCR.

JOBGEN et al. (2007) discutem que devido ao fato de nitrito e nitrato não serem somente um produto específico da metabolização do NO, mas também poderem ser originados de outras fontes, o uso de suas concentrações em amostras biológicas como indicador de NO deve ser usado com cautela.

O outro método indireto utilizado para evidenciar o papel do NO na carcinogênese foi através das enzimas NOS, onde observamos 98,1% de expressão positiva de NOS1 e NOS2 e, 95,7% de NOS3.

Vários autores demonstraram a expressão das enzimas NOS em adenocarcinomas colorretais. YAGIHASHI et al. (2000) descreveram expressão de NOS2 em 88% dos pacientes estudados, NOS3 em 20% e não observaram a expressão de NOS1. YU et al. (2006) observaram expressão de NOS2 em 78,2% e, de NOS3 em 60,3% dos casos avaliados. ZAFIRELLIS et al. (2010) encontraram expressão de NOS2 em 45% dos pacientes com CCR estudados.

Em outros tumores a expressão das enzimas NOS, principalmente NOS2, também foi investigada em diversos estudos. Como exemplo, temos no câncer gástrico, que BEGNAMI et al. (2004) avaliaram a expressão das enzimas NOS e observaram expressão mais freqüente das NOS1 (70%) e NOS3 (42%) do que da NOS2 (30%). Por outro lado, também em tumores gástricos, WANG et al. (2005), encontraram 81,2% dos casos com expressão de NOS2 e somente 20% com expressão de NOS3.

Como demonstrado acima, os dados da literatura mostram uma intensa variabilidade na expressão das enzimas NOS tanto nos carcinomas colorretais como em tumores gástricos. Uma possível explicação para estas discrepâncias seja decorrente dos diferentes anticorpos utilizados entre os estudos.

A hipermetilação das ilhas CpGs localizadas na região promotora do gene *MGMT* é a principal responsável pela perda funcional de *MGMT* em muitos tumores (ESTELLER e HERMAN 2004). Segundo JASS (2007) a metilação de *MGMT* é a mais freqüente alteração molecular que ocorre no CCR que demonstra baixa instabilidade de microssatélites (MSI-L) e mutação do gene *KRAS*.

No presente estudo, foi observado 68,8% de metilação na região promotora do gene *MGMT* e 32,6% de perda da expressão protéica, sendo que destes, 93,9% encontravam-se metilados (31/33 casos).

SHEN et al. (2005), utilizando a metodologia *combined bisulfite restriction analysis* (COBRA) e *methylation-sensitive polymerase chain reaction* (MSP-PCR), demonstraram 46% de casos com metilação de *MGMT* nos adenocarcinomas colorretais avaliados, utilizando um *cutoff* $\geq 3\%$ de nível de metilação. CHEN et al. (2009) demonstraram hipermetilação da região promotora de *MGMT*, por meio de MSP-PCR, em 60,7% dos pacientes com CCR na população Taiwanesa. ESTELLER et al. (2000) encontraram hipermetilação de *MGMT*, por meio de *reverse transcription-PCR* (RT-PCR), em 42% dos casos de CCR. Esta grande variabilidade do nível de metilação entre os estudos, pode ser decorrente da diferença de metodologias utilizadas nos mesmos. Além disso, podemos formular a hipótese que esta variabilidade possa ser devido a uma diferença populacional. Como demonstrado anteriormente, CHEN et al. (2009) observaram nos pacientes

Taiwaneses, um nível de metilação maior que os descritos em populações dos Estados Unidos e Europa. Assim sendo, os níveis de metilação em maior proporção observados neste estudo, também podem ser decorrentes de uma diferença entre as populações estudadas.

A perda da expressão protéica relacionada ao perfil de metilação já foi evidenciada por outros autores. KIM et al. (2003) avaliaram alterações moleculares do gene *MGMT* em CCR esporádicos e em casos de polipose adenomatosa familiar (FAP). Nos tumores esporádicos, 95% dos casos metilados demonstraram perda da expressão de *MGMT* (58/61 casos). O mesmo ocorreu na FAP, onde 80% dos casos metilados (4/5 casos) não demonstraram expressão da proteína. NAGASAKA et al. (2008) encontraram perda da expressão protéica em 81% dos pacientes que apresentaram hipermetilação na região promotora de *MGMT* em tumores colorretais. Entretanto, XU et al. (2004) demonstraram não haver associação entre a metilação e a expressão de *MGMT* no CCR. A contradição em relação ao XU et al. (2004) e os demais, incluindo o presente estudo, pode ser explicada pelo fato deste último ter observado exclusivamente uma expressão citoplasmática. As proteínas de reparo atuam no núcleo das células reparando o DNA. Desta forma, a marcação apresentada pela técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpos contra tais proteínas, apresenta padrão de reação nuclear. A ausência de reação de imunoistoquímica no núcleo de células tumorais é indicativo de deficiência no sistema de reparo. As células tumorais que apresentam apenas reação citoplasmática devem, na verdade, ser consideradas como apresentando um padrão anormal e, devem ser interpretadas como inconclusivas.

Na literatura também há exemplos da associação entre metilação e perda da

expressão protéica em outros tipos de tumores. Em sarcomas de partes moles, KIM et al. (2009) observaram perda da expressão nuclear de *MGMT* em 66,7% (14/21) dos casos hipermetilados. BAE et al. (2002) também demonstraram associação significativa entre a metilação e a perda da expressão de *MGMT* em câncer gástrico.

Os resultados deste estudo demonstram o que prévios estudos já têm evidenciado que a hipermetilação da região promotora do gene leva à perda da expressão protéica de *MGMT* ($p < 0,001$). No entanto, neste estudo, em alguns casos a metilação não foi a responsável pela perda da proteína (6,1%). Isto indica que a expressão desta proteína pode ser regulada por outros fatores que não a metilação do gene, como por exemplo, a mutação do mesmo, como sugere HALFORD et al (2005). Além disso, recentemente, LAVON et al. (2007) demonstraram que NF- κ B pode regular a expressão de *MGMT* independente do *status* de metilação da região promotora deste gene.

O NO gerado pelas NOS2 pode inibir processos de reparo de danos causado ao DNA (JAISWAL et al. 2001). JAISWAL et al. (2000) observaram que a ativação de NOS2 e a produção excessiva de NO em resposta a citocinas inflamatórias causaram danos ao DNA e inibição do processo de reparo em tecido hepático. IWAKUMA et al. (1997), em um estudo experimental em ratos, com *MGMT* silenciado, induziram a formação de tumores no pulmão e fígado utilizando injeções de nitrosaminas (produto da reação do nitrito com aminas). LIU et al. (2002) demonstraram que a exposição ao NO leva a uma perda irreversível da capacidade de reparo do DNA por adutos alquilantes, pois *in vitro* e *in vivo* *MGMT* é inativado irreversivelmente pela formação de S-nitrosilcisteína no resíduo de cisteína Cys 145, sítio aceptor de alquil.

Entretanto, neste estudo não foi observada associação entre a expressão das enzimas NOS1, NOS2 e NOS3 e alterações na expressão de *MGMT* ($p=0,396$, $p=0,244$ e $p=0,801$, respectivamente) ou no *status* de metilação do gene *MGMT* ($p=0,328$, $p=0,081$ e $p=0,295$, respectivamente). Da mesma forma, que não foi observada relação de nitrito e nitrato com o perfil de metilação ($p=0,243$ e $p=0,267$, respectivamente) e a expressão da proteína *MGMT* ($p=0,108$ e $p=0,154$, respectivamente). Neste estudo, não foi possível demonstrar a interferência dos compostos nitrosos no *status* de metilação do gene *MGMT* e na expressão de sua proteína no CCR. No entanto, sabe-se que outros fatores podem estar envolvidos na metilação gênica, dentre estes fatores, poderíamos sugerir a expressão da família de enzimas chamadas DNA - metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b), complexos protéicos com domínios de ligação ao DNA metilado, as *methyl CPG-binding domain proteins* (MBDs) (WORM e GULDBERG 2002), a deficiência de folato e a ingestão de álcool (VAN ENGELAND et al. 2003; ARASARADNAN et al. 2008).

A relação dos dados clinicopatológicos e a hiperexpressão de NOS1 citoplasmática apesar de estar associada significativamente com o comprometimento dos linfonodos ($p=0,007$), mostrou-se inversamente associada à presença de invasão sanguínea ($p=0,005$), linfática ($p=0,035$) e perineural ($p=0,005$). A hiperexpressão nuclear de NOS1 demonstrou associação com a presença de *budding* ($p=0,016$).

Como citado anteriormente, poucos autores tem analisado a expressão de NOS1 no CCR. BEGNAMI et al. (2004) estudou NOS1 em tumores gástricos, mas não identificou nenhuma relação com características clinicopatológicas.

A hiperexpressão de NOS2, em concordância com a literatura, esteve relacionada com o comprometimento dos linfonodos ($p=0,046$) e com o estágio clínico mais avançado ($p=0,048$). ZAFIRELLIS et al. (2010) demonstraram associação entre a expressão de NOS2 e o envolvimento de linfonodos, além de uma correlação com a menor sobrevida, independente de outros fatores prognósticos, em adenocarcinomas colorretais.

Em tumores gástricos, BEGNAMI et al. (2004), apesar de não demonstrarem expressão de NOS2 na maioria dos casos (30%), encontraram associação com tumores mais avançados. WANG et al. (2005) também demonstraram, nestes tumores, uma associação entre a expressão de NOS2 e o comprometimento dos linfonodos.

Desta forma, os achados, tanto do presente estudo como da literatura, relacionados à isoforma NOS2, favorecem a hipótese da associação de sua expressão com tumores de pior prognóstico.

Em relação à hiperexpressão de NOS3, neste estudo, houve associação com a presença de desmoplasia ($p=0,006$), ausência de necrose suja ($p=0,001$) e com tumores do tipo histológico tubular ($p=0,004$). YU et al. (2006) não observaram, em CCR, associação significativa da expressão de NOS3 com fatores prognósticos.

No câncer gástrico, BEGNAMI et al. (2004) também não demonstraram associação entre a expressão de NOS3 e prognóstico.

Quanto ao nitrito e nitrato, neste estudo, foi observado unicamente associação com o comprometimento dos linfonodos ($p=0,010$ e $p=0,050$, respectivamente), poucas são as referências na literatura associando estas concentrações com dados clinicopatológicos, no CCR. Mesmo SZALECZKY et al. (2000), que encontraram

concentrações significativamente maiores destes compostos em pacientes com CCR, não observaram nenhuma associação com dados clinicopatológicos. Porém, novos estudos com um maior número de pacientes precisam ser realizados para um melhor entendimento desta correlação, pois neste estudo foram avaliados apenas 41 amostras de pacientes com CCR e no estudo de SZALECZKY et al. (2000) foram avaliadas 89 amostras.

No presente estudo, não houve significância entre a associação do *status* de metilação do gene *MGMT* e a perda da proteína com parâmetros prognósticos. No entanto, a positividade da expressão de *MGMT* foi significativa em relação à desmoplasia ($p=0,003$), necrose suja ($p=0,002$) e *budding* ($p=0,007$). No entanto, a perda da expressão da proteína *MGMT* esteve associada apenas com tumores que não apresentaram comprometimento de linfonodos ($p=0,047$). Quando a amostra foi dividida em quatro grupos, amostras metiladas com perda e sem perda da expressão protéica e não metiladas com e sem perda da expressão protéica, a associação entre a presença da expressão com desmoplasia ($p=0,046$), necrose suja ($p=0,002$) e *budding* ($p=0,024$) se mantiveram inalteradas. Os dados na literatura relacionando uma associação da metilação da região promotora do gene *MGMT* e a conseqüente perda protéica com parâmetros prognósticos é ainda controversa. KRTOLICA et al. (2007), em casos de CCR, não observaram associação da metilação de *MGMT* com a histologia do tumor, a macroscopia, a localização, a diferenciação e o estágio da doença. BAI et al. (2004) também não demonstraram nenhuma associação entre o perfil de metilação de *MGMT* com dados clinicopatológicos.

Por outro lado, KRAKOWCZYK et al. (2008) demonstraram que o perfil de metilação de *MGMT*, em CCR, foi significativamente relacionado com o estágio C e

D de Dukes. NAGASAKA et al. (2008) encontraram associação entre a metilação e o estágio T, sendo que 43% dos tumores colorretais T3 e T4 demonstram perda da expressão devido à hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, e sugeriram que a metilação neste gene é um evento central na progressão do tumor.

Em outras neoplasias a presença de metilação do gene *MGMT* e perda da expressão protéica associada a fatores prognósticos também é controversa. LEE et al. (2008) avaliaram o perfil de metilação de *MGMT* em carcinomas de glândula salivar e não demonstraram nenhuma associação com a localização do tumor, metástase em linfonodos, estágio da doença e grau de diferenciação. No entanto, em adenocarcinoma de esôfago, BAUMANN et al. (2006) observaram que a hipermetilação do gene *MGMT* foi mais freqüente em tumores grau 1 e 2, mas não mostraram associação com a classificação de Laurén, classificação da OMS, com a localização do tumor, estágio T e N. A associação da perda da expressão protéica com tumores menos invasivos em adenocarcinomas de esôfago descrita pelos autores acima é semelhante ao encontrado neste estudo, onde a perda da expressão da proteína está associada com tumores sem invasão de linfonodos, denotando que em alguns casos a perda de expressão protéica está mais associada a um melhor prognóstico. KIM et al. (2003) apesar de no texto do artigo afirmarem que a perda da expressão da proteína está associada com tumores colorretais mais invasivos (T3 e T4) e estágios mais avançados de Astler-Coller (B/C/D), quando se analisa as tabelas reproduzidas no próprio artigo, vê-se que a positividade é que está associada com estes fatores de pior prognóstico e não a perda da expressão da proteína.

Em resumo, a metilação na região promotora do gene *MGMT* tem um importante papel na carcinogênese colorretal e está associada com a perda da

expressão da proteína e a diminuição de sua capacidade de reparo. No entanto, não foi demonstrada uma associação no reparo do DNA com os compostos nitrosos avaliados neste estudo. A expressão da enzima NOS2 e maior concentração plasmática de nitrito podem servir como preditor do prognóstico de pacientes portadores de CCR.

8 CONCLUSÕES

1. A metilação na região promotora do gene *MGMT* demonstrou associação com a perda da expressão protéica;
2. A expressão da proteína *MGMT* e o *status* de metilação do gene não estão associadas com a expressão das enzimas NOS1, NOS2 e NOS3;
3. A expressão da proteína *MGMT* e o *status* de metilação do gene não estão associadas com as concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato;
4. Não houve associação entre o perfil de metilação e os dados clinicopatológicos;
5. A expressão da proteína *MGMT* está associada com estágio N, presença de desmoplasia, presença de necrose suja e presença de *budding*;
6. A expressão de NOS2 está associada com estágio N e estágio clínico avançado;
7. A concentração de nitrito e nitrato está associada com o estágio N.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agah A, Aghajan M, Mashayekhi F, Amini S, et al. A multi-enzyme model for pyrosequencing. **Nucleic Acids Res** 2004; 32:e166.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **Clinica Chimica Acta** 2006; 363:83-94.

Arasaradnam RP, Commane DM, Bradburn D, Mather JC. A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. **Epigenetics** 2008;3:193-8.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:241-57.

Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. **Br J Cancer** 2002; 86:1888-92.

Baumann S, Keller G, Pühringer F, et al. The prognostic impact of O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promotor hypermetilation in esophageal adenocarcinoma. **Int J Cancer** 2006; 119:264-68.

Begnami MDFS, Cunha IW, Montagnini A, Nonogaki A, Soares F. Análise imuno-histoquímica das sintases do óxido nítrico em adenocarcinomas gástricos. **Bras Patol Med Lab** 2004; 40:351-7.

Berner LA. Heterocyclic amines in food and their implications to health: a special report of current status. 1996. Available from: <URL:<http://www.beefnutrition.org/uDocs/HA%20paper%202003.pdf>>. [2007 jul 24]

Chen SP, Chiu SC, Wu CC, et al. The association of methylation in the promoter of APC and MGMT ad prognosis of Taiwanese CRC patients. **Genet Test Mol Biomarkers** 2009; 13:67-71.

Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. **Environ Mol Mutagem** 2004; 44:44-55.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet** 2005; 366:1784-93.

de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG, et al. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. **Ann Oncol** 2009; 20:1216-22.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Laboratorial** 2003; 39:343-50.

Esteller M, Hamilton SR, Burguer PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer Res** 1999; 59:793-7.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. **Cancer Res** 2000; 60:2368-71.

Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase in human cancer. **Oncogene** 2004; 23:1-8.

Ghasemi A, Zahedias L, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. **Clin Biochem** 2010; 43:89-94.

Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastoma. **Neuro Oncol** 2009; 11:348-56.

Goldman R, Shields PG. Food mutagens. **J Nutr** 2003; 133:965-73.

Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: where we are, where we are going. **Nutr Cancer** 2006; 56:225-31.

Gunter MJ, Probst-Hensch NM, Cortessis VK, Kulldorff M, Haile RW, Sinha R. Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. **Carcinogenesis** 2005; 26:637-42.

Halford S, Rowan A, Sawyer E, Talbot I, Tomlinson I. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions. **Gut** 2005; 54:797-802.

Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of the tumors of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.105-19.

[IARC]. International Agency for Research on Cancer. **Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. vol. 94, 14-21 June 2006; [Monographs on line]. Lyon-France: IARC; Available from: <URL:<http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-nitratenitrite.pdf>> [2010 jan 20].

Iwakuma T, Sakumi K, Nakatsuru Y, et al. High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase. **Carcinogenesis** 1997; 18:1631-5.

Jagerstad M, Skog Kerstin. Genotoxicity of heat-processed foods. **Mut Res** 2005; 547:156-72.

Jaiswal M, Larusso NF, Burgart LJ, Gores G J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. **Cancer Res** 2000; 60:184-90.

Jaiswal M, Larusso NF, Gores G J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2001; 281:G626-G34.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology** 2007;113-30.

Jobgen WS, Jobgen SC, Li H, Meininger CJ, Wu G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 2007; 851:71-82.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair** 2007; 6:1079-99.

Keating GA, Layton DW, Felton JS. Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. **Mut Res** 1999; 443:149-56.

Kim JIL, Suh JT, Choi KU, et al. Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in soft tissue sarcomas: association with K-ras mutations. **Hum Pathol** 2009; 40:934-41.

Kim SH, Bae SI, Lee HS, Kim WH. Alteration of O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase in colorectal neoplasms in sporadic and familial adenomatous polyposis patients. **Mol Carcinogenesis** 2003; 37:32-38.

Kodama K, Sumii K, Kawano M, et al. Gastric juice and vitamin C in patients with gastric cancer and atrophic gastritis: is low acidity solely responsible for cancer risk. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2003; 15:987-93.

Kojima M, Morisaki T, Tsukhara Y, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. **J Surg Oncol** 1999; 70:222-9.

Krakowczyk L, Strzelczyk JK, Adamek B, et al. Methylation of the MGMT and p16 genes in sporadic colorectal carcinoma and corresponding normal colonic mucosa. **Med Sci Monit** 2008; 14:BR219-25.

Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. **World J Gastroenterol** 2007; 13:1187-94.

Lakshmi VM, Hsu FF, Zenser TV. Nitric oxide-mediated nitrosation of 2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline potentiated by hemin and myeloperoxidase. **Chem Res Toxicol** 2005; 18:1038-47.

Laval F, Wink DA. Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. **Carcinogenesis** 1994; 15:443-7.

Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, et. al. Novel mechanism whereby nuclear factor κB mediates DNA damage repair through regulation of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. **Cancer Res** 2007; 67:8952-9.

Lee ES, Issa JP, Roberts DB, et al. Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. **Clin Cancer Res** 2008; 14:2664-72.

Liu L, Xu-Welliver M, Kanugula S, Pegg AE. Inactivation and degradation of O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase after reaction with nitric oxide. **Cancer Res** 2002; 62:3037-43

Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. Nitrate, bacteria and human health. **Nat Rev** 2004; 2:593-602.

Milkowski A, Garg HK, Coughlin JR, Bryan NS. Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. **Nitric Oxide** 2010; 22:110-9.

Mineska T, Bock C, El-Maarri O, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. **J Mol Diagn** 2007; 9:368-81.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Nagasaka T, Goel A, Notohara K, et al. Methylation pattern of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. **Int J Cancer** 2008; 122:2429-36.

Neves FJ, Mattos IE, Koifman RJ. Mortalidade por câncer de cólon e reto nas capitais brasileiras no período 1980-1997. **Arq Gastroenterol** 2005; 42:63-70.

Nordström T, Alderborn A, Nyrén P. Method for one-step preparation of double-stranded DNA template applicable for use with pyrosequencing technology. *J Biochem Biophys Methods* 2002; 52:71-82.

Patel JB, Shah FD, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Role of nitric oxide and antioxidant enzymes in the pathogenesis of oral cancer. *J Cancer Res Ther* 2009; 5:247-53.

Peeyush K L, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet* 2001; 2:149-56.

Perez RO, Gama AH, Jacob CE, Souza Jr AHS, Picolo MM, Pécora RA. A genética do câncer colorretal: princípios para o cirurgião. *Rev Bras Colo-Proct* 1998; 18:5-10.

Povey A, Hall C, Badawi A, Cooper D, O'Connor P. Elevated levels of the pro-carcinogenic adduct, *O*⁶-methylguanine, in normal DNA from the cancer prone regions of the large bowel. *Gut* 2000; 47:362-5.

Rajeevan MS, Swan DC, Duncan K, Lee DR, Limor JR, Unger ER. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods* 2006; 138:170-6.

Rao CV. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res* 2004; 555:107-19.

Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:439-46.

Swan DC, Limor JR, Duncan KL, Rajeevan MS, Unger ER. Human papillomavirus type 16 variant assignment by pyrosequencing. *J Virol Methods* 2006; 136:166-70.

Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK, Liloglou T. Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MDP with validation by pyrosequencing. **Nucleic Acids Res** 2006; 34:e78.

Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, et al. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics - Correlation of quantitative methylation data with gene expression. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2008; 134:251-6.

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:1330-8.

Sinha R, Rothman N, Brown ED, et al. Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. **Cancer Res** 1994; 54:6154-9.

Sinha R, Kulldorff M, Chow WH, Denobile J, Rothman. Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:559-62.

Sinha R. An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. **Mutation Res** 2002; 506-507: 197-204.

Sinha R, Peters U, Cross AJ, et al. Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. **Cancer Res** 2005; 65:8034-41.

Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis** 2000; 21:387-95.

Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. **Cancer Sci** 2004; 95:290-9.

Szaleczky E, Pronai L, Nakazawa H, Tulassay Z. Evidence of in vivo peroxynitrite formation in patients with colorectal carcinoma, higher plasma nitrate/nitrite levels, and lower protection against oxygen free radicals. **J Clin Gastroenterol** 2000; 30:47-51.

Tanaka T, Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Takahashi M, Wakabayashi K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess β -catenin gene mutations and increases immunoreactivity for β -catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. **Carcinogenesis** 2005; 26:229-38

Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by methylight technology. **Methods** 2001; 25:456-62.

van Engeland M, Weijnenberg MP, Roemen GM, et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: The Netherlands cohort study on diet and cancer. **Cancer Res** 2003; 63:3133-37.

Wang YZ, Cao YQ, Wu JN, Chen M, Cha XY. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. **World J Gastroenterol** 2005; 11:46-50.

Worm J, Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:443-9.

Wu AH, Shibata D, Yu MC, Lai MY, Ross RK. Dietary heterocyclic amines and microsatellite instability in colon adenocarcinomas. **Carcinogenesis** 2001; 22:1681-4.

Wu PF, Kuo KT, Kuo LT, et al. O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase expression and prognostic value in brain metastases of lung cancers. **Lung Cancer** 2009 Sep 7. [Epub ahead of print].

Xu XL, Yu J, Zhang HY, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. **World J Gastroenterol** 2004; 10:3441-54.

Yagihashi N, Kasajima H, Sugai S, et al. Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. **Virchows Arch** 2000; 436:109-14.

Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Ji P, Wei HJ, Ma HY. Expression of NOS and HIF-1 α in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4660-4.

Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K. Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. **APMIS** 2010; 118:115-24.

Zuo C, Ai L, Ratliff P, Suen JY, Hanna E, Brent TP, Fan CY. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:967-75.

Anexo 1 - Ficha de Coleta de Dados - CCR

PACIENTE: _____

RGH: _____

NATURALIDADE: _____

ESCOLARIDADE: _____

PROFISSAO: _____

DATA DE ADMISSAO: ____ / ____ / ____

[] dt_adm

DATA NASCIMENTO: ____ / ____ / ____

[] dt_nasc

IDADE AO DIAGNOSTICO: _____

[] idd_diag

SEXO: 1- FEMININO () 2 – MASCULINO () 3 – IGNORADO ()

[] sexo

RAÇA: 1-BRANCA() 2-NEGRA() 3-AMARELA() 4-OUTRAS()

[] raça

TABAGISMO 1-SIM () 2-NAO ()

[] tab

PESO: _____

[] peso

ALTURA: _____

[] alt

TUMOR PRIMARIO:

[] tu_prim

1- COLON PROX (D+T)

2- COLON DISTAL (E+S)

3- RETO

9- IGNORADO

DATA DA CIRURGIA: _____

CIRURGIA: _____

[] cir

1- COLECTOMIA PARCIAL

2- COLECTOMIA TOTAL

3- PCT

4- RA/APP

5- EXANTERAÇÃO

6- RESSECÇÃO LOCAL ENDOSCOPICA

7- RESSECÇÃOABERTA TRANSANAL

8- OUTRA

9- IGNORADO

ESTADIO T:

T0 (0) T1 (1) T2 (2) T3 (3) T4 (4) TX (9)

[] estadio t

ESTADIO N :

N0 (0) N1 (1) N2 (2) NX (9)

[] estadio n

ESTADIO M :

M0 (0) M1 (1) - retroperitoneo M1 (2) – figado M1 (3) – pulmão

M1 (4) – outro (_____) MX (9)

[] estadio m

GRUPOS POR ESTADIOS

O (0) I (1) IIA (2) IIB (3) IIIA (4) IIIB (5) IIIC (6) IV (7) [] gr_estadio

NUMERO DE LINFONODOS DISSECADOS []linf_dis

888 () NAO REALIZADO 999 () IGNORADO

NUMERO DE LINFONODOS POSITIVOS []linf_pos

888 () NAO REALIZADO 999 () IGNORADO

RESSECÇÃO DE METASTASE []res_meta

(0) SEM METASTASE (1) SIM (2) NAO (9) IGNORADO

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO []lgrau_dife

(1) BEM (2) MODERADAMENTE (3) POUCO
(4) INDIFERENCIADO (8) OUTRO (9) IGNORADO

CONFIGURAÇÃO DO TUMOR []conf_tu

(1) EXOFITICA (2) ENDOFITICA (3)DIFUSA (4) OUTRAS (9)IGNORADO

DIMENSAO DO TUMOR: _____ 999 – IGNORADA []dim_tu

BORDA DE INVASAO: []borda_inv

(1) INFILTRATIVA (2) EXPANSIVA (9) IGNORADO

INFITRADO TIPO CROHN: []linf_crohn

(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

INFILTRADO LINFOCITARIO PERITUMORAL []linf_linfoperi

(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

DESMOPLASIA []desmo

(0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

INVASAO VASCULAR SANGUINEA []invasc_sang

(0) V0 (1)V1 (2) V2 (9) Vx

INVASAO VASCULAR LINFATICA []invasc_linf

(0) L0 (1)L1 (2) L2 (9) Lx

INVASAO PERINEURAL [] inv_peri
 (0) AUSENTE (1) PRESENTE (9) IGNORADO

MARGENS ANATOMOPATOLOGICAS [] marg_anatomo
 (0) não operado (1) livres (2) comprometida (9) ignorado

MARGEM DISTAL: _____ mm [] margem_dis
 888-COLON E SIGMOIDE 999- IGNORADA

MARGEM RADIAL: _____ mm [] margem_rad
 888-COLON E SIGMOIDE 999- IGNORADA

TIPO HISTOLOGICO: [] tipo_histo
 1- ADENOCARCINOMA TUBULAR 2- ADENOC C/ DIF MUCINOSA ATE 50%
 3- ADENOC MUCINOSO 4- DIFERENCIACAO NEUROENDOCRINA
 5- CEC 6- CRIBIFORME (<50%)
 7-ADENOESCAMOSO 8- INIFERENCIADO
 9- PEQUENAS CELULAS 10-ANEL DE SINETE
 11-MEDULAR 12- OUTROS
 99 - IGNORADO

ADENOMA ASSOCIADO [] adeno_asso
 (0) SIM (1) NAO (9) IGNORADO

ADJUVANCIA [] adjuvancia
 (0) AUSENTE (1) QT (2) RT (9) IGNORADO

QUIMIOTERAPICOS ADJUVANTES [] qt_adj
 (0)SEM QT (1)5-FU/LV (2)FOLFOZ/FLOX
 (3)CAPECITABINA
 (4)BEVACIZUMAB (8)OUTROS (9) IGNORADO

ESTADO DA QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE [] lest_qtadj
 (0) SEM QT (1) INCOMPLETA (2) COMPLETA

PRIMEIRA RECIDIVA: [] prim_rec
 1- PELVICA 2- PAREDE ABDOMINAL 3-PERITONEO
 4- ANASTOMOSE 5- LINFONODO 6- FIGADO
 7-PULMAO 8-OSSO 9- IGNORADO
 10-OUTRO LOCAL

DATA DA RECIDIVA POS CIRURGIA: _____

METILAÇÃO

TOTAL (1)	PARCIAL (2)	AUSENTE (3)	[] metil
-------------	---------------	---------------	---------------

PARCIAL (2) AUSENTE (3)

[] metil

CONCENTRAÇÃO DE NITRITO

ALTA (1) MODERADA (2) BAIXA (3) []co_nitri

MODERADA (2)

BAIXA (3)

[]co_nitri

CONCENTRAÇÃO DE NITRATO

ALTA (1) MODERADA (2) BAIXA (3) []co_nitra

MODERADA (2)

BAIXA (3)

[]co_nitra

EXPRESSAO DAS NOS

NOS 1	_____	[	_____]	ex_nos1
NOS 2	_____	[	_____]	ex_nos2
NOS 3	_____	[	_____]	ex_nos3

[]ex_nos1

[]ex_nos2

[]ex_nos3

DATA DA ULTIMA INFORMACAO: _____

ESTADO ATUAL 1 - VIVO SEM DOENÇA () [] e_atual

[] e_atual

2 – VIVO COM DOENÇA ()

3- MORTE POR CANCER ()

4 – MORTE POR OUTRAS CAUSAS ()

5 – PERDIDO DE VISTA ()

NUMERO DO ANATOMOPATOLOGICA

AP DA BIOPSIA _____

AP DA PEÇA COLORRETAL _____

AP OUTRA PEÇA _____

AP OUTROS _____

Anexo 2 - Protocolo de Imunoistoquímica

As lâminas para o estudo das foram previamente tratadas com 3-aminopropiltietoxi-silano (Sigma, A-3648, USA) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C, ou utilizando-se lâminas especiais polarizadas do tipo Superfrost. Os cortes histológicos nela acondicionados foram submetidos à desparafinização em xilol a 60°C por 20 minutos, e, então xilol a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, sua preparação foi através de passagens sucessivas em etanol a cada 30 segundos (100%, 95% e 70%), e, então lavagem em água corrente. As lâminas foram então submetidas à recuperação antigênica pelo calor. A seguir, o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com três trocas de 10 minutos cada, seguida de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *phosphate buffered saline* – 10mM e pH7.4) por 5 minutos. Incubou-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) a 0,1%, por 30 minutos a 37°C, por 30 minutos e 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a incubação, lavaram-se as lâminas em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada e foram submetidas a um sistema de amplificação incubando por 30 minutos a 37°C com SuperPicture Poly *HRP conjugate* (Invitrogen cat# 87-8963, Camarillo, CA, EUA). Com posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. As lâminas foram incubadas em solução substrato 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 100mg% (Sigma, D-5637 USA), 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1mL de água oxigenada 6%, 100mL de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após a observação do desenvolvimento do precipitado castanho, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Seguiu-se, então, a desidratação das lâminas em etanol e xilol e subsequente montagem das mesmas para a leitura. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

Anexo 3 - Protocolo de Extração do DNA

Resumidamente, o DNA microdissecado manualmente foi extraído seguindo as seguintes etapas:

1. Foram separados 5 cortes de tecido congelado de 5µm para cada caso.
2. Imediatamente foram desidratados em 2 banhos de álcool 100%, 5 minutos cada.
3. Esperou-se secar em temperatura ambiente e realizado a raspagem com o bisturi da região marcada.
4. Adicionou-se em 90 µL de *Buffer* ATL (fornecido pelo kit).
5. Seguido da digestão das amostras em 20 µL de proteinase K (pertencente ao kit) e incubação a 56°C *overnight* até a lise total dos tecidos.
6. Adição de 110µL de *Buffer* AL (fornecido pelo kit) e 1µL de *carrier* RNA (fornecido pelo kit)
7. Adição de 100µL de etanol 100%, homogenização através do vortex e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Transferência das amostras para colunas de purificação (fornecidas pelo kit) e centrifugação a 8000rpm por 1 minuto.
8. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
9. Adicionados 500µL de *Buffer* AW1 (fornecido pelo kit) e centrifugação de 1 minuto a 8000rpm.
10. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
11. Adição de 500µL de *Buffer* AW2 (proveniente do kit) e centrifugação por 1 minutos a 8000rpm.
12. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
13. Adição de 500µL de álcool 70% e centrifugação por 1 minuto a 8000rpm.
14. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
15. Centrifugação por 3 minutos a 14000rpm.

16. Transferência das colunas para novos tubos *eppendorf* 1,5ml e adicionar 50µL de água ultrapura. Incubados por 1 minuto e nova centrifugação a 14000rpm por 1 minuto.

O DNA obtido através de técnica de LCM foi extraído seguindo as seguintes etapas:

1. Adicionados à amostra 15µL de *Buffer* ATL (fornecido pelo kit).
2. Digestão das amostras em 10µL de proteinase K (pertencente ao kit) e incubação a 56°C *overnight* até a lise total dos tecidos.
3. Adição de 25µL *Buffer* ATL (fornecido pelo kit).
4. Adição de 50µL de *Buffer* AL (fornecido pelo kit) e 1µL de *carrier* RNA (fornecido pelo kit)
5. Adição de 50µL de etanol 100%, homogenização através do vortex e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Transferência das amostras para colunas de purificação (fornecidas pelo kit) e centrifugação a 8000rpm por 1 minuto.
6. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
7. Adicionar 500µL de *Buffer* AW1 (fornecido pelo kit) e centrifugação de 1 minuto a 8000rpm.
8. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
9. Adição de 500µL de *Buffer* AW2 (proveniente do kit) e centrifugação por 1 minutos a 8000rpm.
10. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
11. Adição de 500µL de álcool 70% e centrifugação por 1 minutos a 8000rpm.
12. Transferência das colunas para novos tubos. Descarte das colunas contendo os filtrados.
13. Centrifugação por 3 minutos a 14000rpm.
14. Transferir as colunas para novos tubos *eppendorf* 1,5 ml e adicionar 50µL de água ultrapura. Incubar por 1 minuto e nova centrifugação a 14000rpm por 1 minuto.

Anexo 4 - Protocolo de Tratamento de Bissulfito

Resumidamente o tratamento de bissulfito seguiu as seguintes etapas:

- 1) Partir de uma quantidade mínima de 1µg de DNA (que equivale a 1000ng). Ou seja, feita a quantificação no NanoDrop deve-se usar uma quantidade de amostra suficiente para atingir 1µg de DNA, de forma de não ultrapasse 45µL, pois o volume da amostra mais o acréscimo de 5µL de *M-Dilution Buffer* (fornecido pelo kit) deve ser igual a 50 µL e, caso não chegue nesta quantidade, completar com água ultrapura.
- 2) Incubação a 37°C por 15 minutos;
- 3) Adição de 100µL de *CT conversion* (fornecido pelo kit) homogeneizando no vortex;
- 4) Incubação no escuro a 50°C por 12 a 16 horas;
- 5) Incubação no gelo por 10 minutos;
- 6) Adição de 400µL de *M-Binding Buffer* (fornecido pelo kit), homogeneizar vertendo e em seguida centrifugar por 30 segundos a 11500rpm;
- 7) Transferência do material para a coluna e nova centrifugação por 30 segundos a 11500rpm;
- 8) Trocar o tubo de conexão e adição de 100µL de *M-Wash buffer*, seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500rpm;
- 9) Adição de 200µL *M-Desulphonation* (fornecido pelo kit) e incubação em temperatura ambiente por 15 a 20 minutos;
- 10) Adição de 200µL de *M-Wash buffer*, seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500rpm;
- 11) Troca do *connection tube* e adição de 200µL de *M-Wash buffer*, seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500rpm;
- 12) Transferência do material para tubos de 1,5ml e adição de 20µL de *M-Elution buffer* (fornecido pelo kit), seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500rpm;
- 13) Separação de 2 µL para a PCR do gene constitutivo e posterior estocagem a -80°C.

Anexo 5 - Extração e Metilação de Linfócitos para Controle das Reações

Duas alíquotas de 20mL de sangue periférico foram submetidas à centrifugação (em tubo de Falcon de 15mL) para separação do soro da porção celular, o primeiro foi retirado e estocado a -80°C. À porção celular foi adicionada solução de Tris-EDTA pH8,0 1X (TE 1X) – 10mM Tris-EDTA pH8,0 e 1 mM EDTA pH8,0 – em volume suficiente para 15mL, para lise das hemácias, seguida de centrifugação por 5 minutos a 1.500rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspensionado em 1mL de TE 1X e transferido para tubo de 1,5mL. A amostra foi submetida a nova centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado.

Para obtenção do DNA foi utilizado o protocolo de digestão com Proteinase K e extração do DNA com fenol-clorofórmio. Em seguida foi realizada a quantificação de DNA por espectrofotometria (Nanodrop) e a integridade do DNA foi verificada com PCR para o fragmento de 133 pb do gene β -actina.

A metilação *in vitro* do DNA de linfócitos foi realizada com o kit CpG *Methylase-SssI* (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, o volume final da reação foi de 250 μ L contendo 20 μ g de DNA, 0,032mM de S-adenosilmetionina (SAM – doador de radicais metil) e 25 unidades de enzima metilase. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C, período após o qual foi adicionado 0,064mM de SAM e 12,5 unidades da enzima metilase. Após nova incubação de 4 horas a 37°C, as amostras foram submetidas a extração com fenolclorofórmio e precipitação com etanol. Os pellets formados foram secos a temperatura ambiente e ressuspensionados em 15 μ L de água e o DNA metilado foi estocado a -20°C.

Anexo 6 - Nitrato – Estudo das amostras de plasma

Reagentes utilizados:

Reagente NTA-S1

Reagente NTI-S2

Reagente NTA-S3

Reagente NTA-S4

Solução padrão de nitrato

Curva de Calibração:

Pipetar solução padrão de **nitrato** em duplicata de acordo com as concentrações de: 0,20; 0,40; 0,60; 5,0; 10,0;15,0;20,0.

Adicionar 100 microlitros do reagente NTA-S1

Adicionar 50 microlitros do reagente NTA-S2

Adicionar 100 microlitros do reagente NTA-S3

Adicionar 100 microlitros do reagente NTA-S4

Agitar e incubar overnight em temperatura ambiente.

Realizar a leitura em 500 nm.

Traçar curva de calibração.

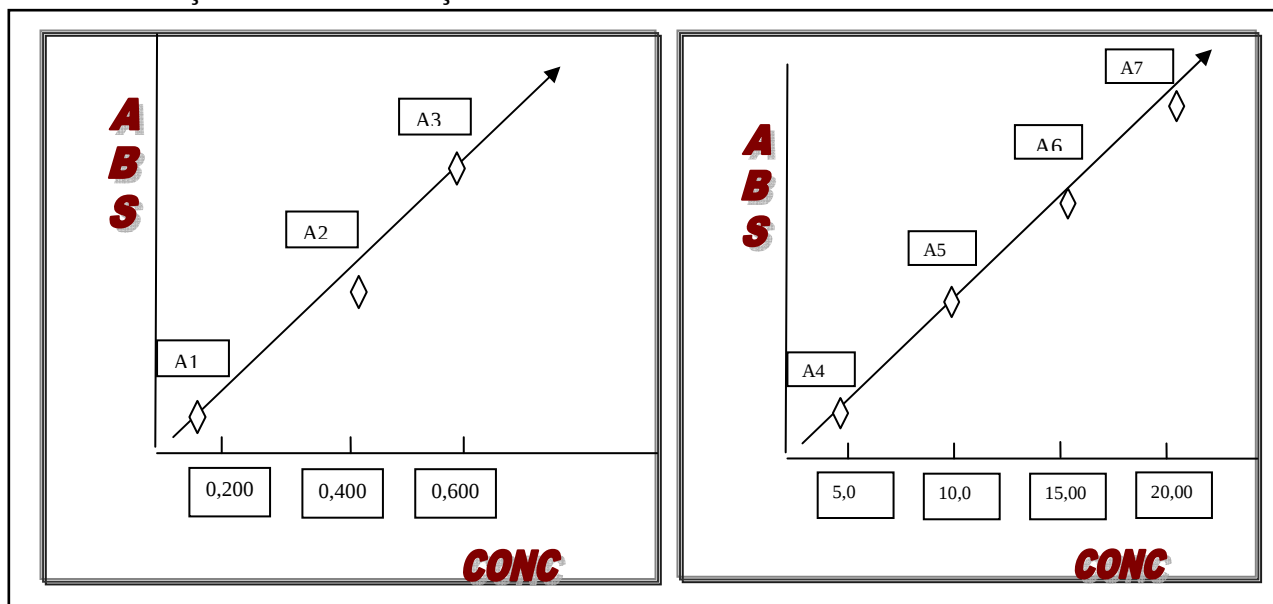


Gráfico 1 - Curva calibração do Nitrato; ABS – Absorbância; Conc – Concentração; λ medida que aumenta a concentração de nitrato é feita a leitura pelo comprimento da onda (nm). A1= 0,008nm; A2 = 0,019nm; A3 = 0,029nm; A4 = 0,230nm; A5 = 0,475nm; A6 = 0,700nm; A7 = 0,940nm

Procedimento:

Pipetar 500 microlitros de água deionizada

Adicionar 100 microlitros de cada concentração dos padrões

Pipetar 500 microlitros de água deionizada

Adicionar 100 microlitros de cada concentração dos padrões

Adicionar 100 microlitros do reagente NTA-S1

Adicionar 50 microlitros do reagente NTA-S2

Adicionar 100 microlitros do reagente NTA-S3

Adicionar 100 microlitros do reagente NTA-S4

Agitar e incubar *overnight* em temperatura ambiente.

O limite de detecção do método estabelecido é de 0,2 mg/L

NITRITO – Estudo das amostras de plasma.**REAGENTES**

Reagente NTI-S1 (ácido sulfanílico diazotado)- Solução Sulfanílica

Reagente NTI-S2 (N-(1-naftyl)-etilenodiamina)- Solução NED

Solução padrão de nitrito 100 mg/L

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Pipetar solução padrão de nitrito em duplicata de acordo com as concentrações de: 0,02; 0,04; 0,06; 0,10; 0,20; 0,30; 0,50.

Adicionar 500 microlitros de água deionizada

Adicionar 100 microlitros de cada concentração dos padrões

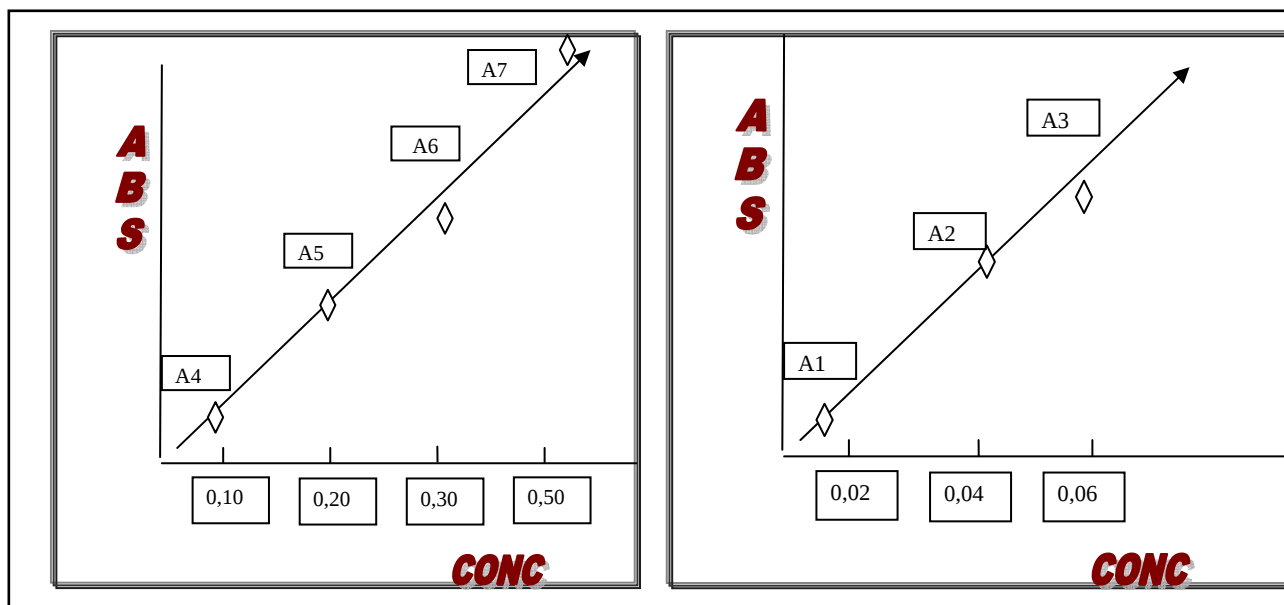
Adicionar 50 microlitros do reagente NTI-S1 (ácido sulfanílico diazotado)

Adicionar 50 microlitros do reagente NTI-S2 (N-(1-naftyl)-etilenodiamina)

Agitar e incubar *overnight* em temperatura ambiente.

Realizar a leitura em 500 nm.

Traçar curva de calibração.



Absorbância; Conc – Concentração; À medida que aumenta a concentração de nitrato é feita a leitura pelo comprimento da onda (nm). A1= 0,122 nm; A2 = 0,244 nm; A3 = 0,366 nm; A4 = 0,61 nm; A5 = 1,22 nm; A6 = 1,83 nm; A7 = 3,05nm

PROCEDIMENTO

Pipetar 500 microlitros de água deionizada

Adicionar 100 microlitros de amostra

Adicionar 50 microlitros do reagente NTI-S1 (ácido sulfanílico diazotado)

Adicionar 50 microlitros do reagente NTI-S2 (N-(1-naftyl)-etilenodiamina)

Agitar e incubar overnight em temperatura ambiente.

Realizar a leitura em 500 nm.

Anexo 7 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

CASO	CORRIDA 1										Index 1	CORRIDA 2									
	sitio 1	^m C1	sitio 2	^m C2	sitio 3	^m C3	sitio 4	^m C4	sitio 5	^m C5		sitio 1	^m C1	sitio 2	^m C2	sitio 3	^m C3	sitio 4	^m C4	sitio 5	^m C5
1	93	0,93	34	0,34	100	1	76	0,76	95	0,95	0,796	93	0,93	92	0,92	97	0,97	83	0,83	96	0,96
2	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0,01	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01
3	23	0,23	20	0,2	23	0,23	17	0,17	24	0,24	0,214	23	0,23	19	0,19	24	0,24	17	0,17	24	0,24
4	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	1	0,01
5	60	0,6	25	0,25	61	0,61	46	0,46	57	0,57	0,498	41	0,41	36	0,36	42	0,42	31	0,31	42	0,42
6	91	0,91	33	0,33	100	1	74	0,74	100	1	0,796	68	0,68	66	0,66	72	0,72	61	0,61	71	0,71
7	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	2	0,02	0,008	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02
8	4	0,04	5	0,05	5	0,05	3	0,03	4	0,04	0,042	1	0,01	2	0,02	3	0,03	1	0,01	2	0,02
9	77	0,77	32	0,32	98	0,98	60	0,6	78	0,78	0,69	79	0,79	77	0,77	83	0,83	73	0,73	82	0,82
10	49	0,49	45	0,45	48	0,48	37	0,37	48	0,48	0,454	48	0,48	43	0,43	51	0,51	40	0,4	45	0,45
11	10	0,1	18	0,18	29	0,29	16	0,16	52	0,52	0,25	13	0,13	21	0,21	32	0,32	20	0,2	66	0,66
12	13	0,13	22	0,22	36	0,36	22	0,22	73	0,73	0,332	16	0,16	26	0,26	38	0,38	25	0,25	77	0,77
13	62	0,62	56	0,56	52	0,52	48	0,48	63	0,63	0,562	58	0,58	52	0,52	55	0,55	47	0,47	62	0,62
14	2	0,02	2	0,02	3	0,03	2	0,02	2	0,02	0,022	2	0,02	3	0,03	3	0,03	2	0,02	2	0,02
15	22	0,22	15	0,15	21	0,21	17	0,17	24	0,24	0,198	28	0,28	21	0,21	27	0,27	20	0,2	29	0,29
16	78	0,78	30	0,3	91	0,91	58	0,58	75	0,75	0,664	90	0,9	89	0,89	93	0,93	82	0,82	92	0,92
17	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	1	0,01
18	2	0,02	2	0,02	3	0,03	2	0,02	3	0,03	0,024	2	0,02	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
19	26	0,26	21	0,21	27	0,27	18	0,18	27	0,27	0,238	26	0,26	21	0,21	27	0,27	19	0,19	25	0,25
20	39	0,39	22	0,22	34	0,34	30	0,3	37	0,37	0,324	62	0,62	58	0,58	63	0,63	52	0,52	57	0,57
21	60	0,6	53	0,53	59	0,59	47	0,47	61	0,61	0,56	56	0,56	42	0,42	54	0,54	43	0,43	58	0,58
22	28	0,28	30	0,3	39	0,39	33	0,33	36	0,36	0,332	38	0,38	34	0,34	39	0,39	29	0,29	38	0,38
23	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	2	0,02	0,008	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
24	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02
25	13	0,13	11	0,11	13	0,13	9	0,09	11	0,11	0,114	7	0,07	9	0,09	12	0,12	9	0,09	11	0,11
26	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0	0	1	0,01
27	48	0,48	43	0,43	51	0,51	40	0,4	51	0,51	0,466	51	0,51	48	0,48	52	0,52	42	0,42	52	0,52
28	1	0,01	3	0,03	2	0,02	0	0	2	0,02	0,016	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0
29	89	0,89	35	0,35	100	1	73	0,73	92	0,92	0,778	90	0,9	89	0,89	89	0,89	80	0,8	92	0,92
30	79	0,79	32	0,32	92	0,92	61	0,61	83	0,83	0,694	71	0,71	69	0,69	76	0,76	66	0,66	78	0,78
31	2	0,02	3	0,03	2	0,02	2	0,02	2	0,02	0,022	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	1	0,01
32	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01
33	18	0,18	16	0,16	18	0,18	13	0,13	19	0,19	0,168	14	0,14	10	0,1	14	0,14	10	0,1	15	0,15
34	40	0,4	32	0,32	59	0,59	40	0,4	54	0,54	0,45	41	0,41	36	0,36	42	0,42	31	0,31	41	0,41
35	70	0,7	61	0,61	71	0,71	55	0,55	68	0,68	0,65	69	0,69	62	0,62	72	0,72	57	0,57	71	0,71
36	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	2	0,02	0,012	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01
37	17	0,17	12	0,12	18	0,18	13	0,13	20	0,2	0,16	19	0,19	16	0,16	21	0,21	14	0,14	20	0,2
38	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01
39	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	2	0,02	0,008	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
40	60	0,6	29	0,29	60	0,6	50	0,5	60	0,6	0,518	77	0,77	75	0,75	77	0,77	68	0,68	77	0,77
41	27	0,27	23	0,23	25	0,25	19	0,19	28	0,28	0,244	23	0,23	20	0,2	24	0,24	18	0,18	25	0,25

42	83	0,83	82	0,82	83	0,83	73	0,73	84	0,84	0,81	82	0,82	78	0,78	87	0,87	70	0,7	86	0,86
43	94	0,94	34	0,34	100	1	72	0,72	98	0,98	0,796	88	0,88	86	0,86	93	0,93	78	0,78	91	0,91
44	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01
45	5	0,05	5	0,05	6	0,06	4	0,04	3	0,03	0,046	2	0,02	2	0,02	3	0,03	2	0,02	3	0,03
46	53	0,53	52	0,52	48	0,48	45	0,45	56	0,56	0,508	59	0,59	41	0,41	52	0,52	48	0,48	67	0,67
47	74	0,74	34	0,34	100	1	69	0,69	100	1	0,754	85	0,85	82	0,82	87	0,87	75	0,75	87	0,87
48	46	0,46	40	0,4	47	0,47	36	0,36	45	0,45	0,428	41	0,41	37	0,37	44	0,44	33	0,33	43	0,43
49	6	0,06	6	0,06	6	0,06	5	0,05	6	0,06	0,058	9	0,09	7	0,07	9	0,09	7	0,07	9	0,09
50	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	1	0,01
51	45	0,45	40	0,4	44	0,44	35	0,35	44	0,44	0,416	43	0,43	35	0,35	44	0,44	32	0,32	43	0,43
52	34	0,34	29	0,29	35	0,35	25	0,25	35	0,35	0,316	30	0,3	27	0,27	32	0,32	23	0,23	32	0,32
53	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02
54	45	0,45	42	0,42	45	0,45	37	0,37	46	0,46	0,43	50	0,5	46	0,46	48	0,48	39	0,39	46	0,46
55	45	0,45	24	0,24	41	0,41	37	0,37	48	0,48	0,39	53	0,53	48	0,48	53	0,53	47	0,47	56	0,56
56	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
57	6	0,06	6	0,06	7	0,07	5	0,05	7	0,07	0,062	4	0,04	6	0,06	5	0,05	3	0,03	4	0,04
58	31	0,31	41	0,41	40	0,4	38	0,38	100	1	0,5	35	0,35	39	0,39	40	0,4	37	0,37	98	0,98
59	64	0,64	33	0,33	67	0,67	55	0,55	68	0,68	0,574	40	0,4	37	0,37	41	0,41	32	0,32	41	0,41
60	22	0,22	18	0,18	23	0,23	16	0,16	22	0,22	0,202	72	0,72	69	0,69	74	0,74	63	0,63	76	0,76
61	1	0,01	2	0,02	2	0,02	0	0	2	0,02	0,014	2	0,02	2	0,02	2	0,02	1	0,01	3	0,03
62	26	0,26	22	0,22	25	0,25	20	0,2	25	0,25	0,236	27	0,27	22	0,22	26	0,26	20	0,2	28	0,28
63	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01	0,012	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	1	0,01
64	71	0,71	67	0,67	67	0,67	61	0,61	69	0,69	0,67	77	0,77	63	0,63	77	0,77	65	0,65	88	0,88
65	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	1	0,01	0,014	3	0,03	3	0,03	3	0,03	3	0,03	2	0,02
66	23	0,23	18	0,18	26	0,26	20	0,2	26	0,26	0,226	40	0,4	36	0,36	28	0,28	31	0,31	40	0,4
67	82	0,82	35	0,35	91	0,91	69	0,69	81	0,81	0,716	90	0,9	89	0,89	91	0,91	80	0,8	90	0,9
68	47	0,47	38	0,38	81	0,81	51	0,51	68	0,68	0,57	49	0,49	42	0,42	50	0,5	38	0,38	51	0,51
69	45	0,45	24	0,24	41	0,41	33	0,33	46	0,46	0,378	41	0,41	38	0,38	39	0,39	33	0,33	38	0,38
70	56	0,56	28	0,28	56	0,56	46	0,46	63	0,63	0,498	64	0,64	60	0,6	67	0,67	55	0,55	66	0,66
71	57	0,57	34	0,34	80	0,8	50	0,5	70	0,7	0,582	40	0,4	37	0,37	41	0,41	33	0,33	40	0,4
72	33	0,33	23	0,23	31	0,31	29	0,29	37	0,37	0,306	73	0,73	71	0,71	74	0,74	62	0,62	75	0,75
73	53	0,53	37	0,37	88	0,88	53	0,53	72	0,72	0,606	35	0,35	34	0,34	42	0,42	18	0,18	43	0,43
74	63	0,63	29	0,29	62	0,62	46	0,46	66	0,66	0,532	63	0,63	60	0,6	65	0,65	52	0,52	65	0,65
75	18	0,18	16	0,16	18	0,18	17	0,17	20	0,2	0,178	22	0,22	19	0,19	24	0,24	16	0,16	22	0,22
76	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,016	2	0,02	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
77	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
78	48	0,48	41	0,41	47	0,47	38	0,38	47	0,47	0,442	44	0,44	40	0,4	46	0,46	33	0,33	45	0,45
79	39	0,39	22	0,22	34	0,34	29	0,29	41	0,41	0,33	69	0,69	65	0,65	68	0,68	59	0,59	69	0,69
80	49	0,49	25	0,25	43	0,43	41	0,41	53	0,53	0,422	62	0,62	58	0,58	61	0,61	51	0,51	62	0,62
81	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01
82	56	0,56	27	0,27	56	0,56	43	0,43	58	0,58	0,48	53	0,53	47	0,47	54	0,54	46	0,46	56	0,56
83	30	0,3	21	0,21	28	0,28	27	0,27	36	0,36	0,284	43	0,43	40	0,4	46	0,46	39	0,39	48	0,48
84	71	0,71	29	0,29	76	0,76	52	0,52	74	0,74	0,604	73	0,73	68	0,68	79	0,79	67	0,67	81	0,81

85	0	0	1	0,01	2	0,02	0	0	1	0,01	0,008	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01
86	88	0,88	33	0,33	100	1	72	0,72	85	0,85	0,756	42	0,42	37	0,37	42	0,42	32	0,32	40	0,4
87	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0,012	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	1	0,01
88	47	0,47	24	0,24	43	0,43	39	0,39	32	0,32	0,37	55	0,55	50	0,5	49	0,49	43	0,43	36	0,36
89	3	0,03	3	0,03	4	0,04	2	0,02	3	0,03	0,03	0	0	1	0,01	2	0,02	0	0	2	0,02
90	19	0,19	20	0,2	28	0,28	22	0,22	27	0,27	0,232	40	0,4	36	0,36	42	0,42	31	0,31	42	0,42
91	16	0,16	12	0,12	15	0,15	12	0,12	11	0,11	0,132	10	0,1	7	0,07	17	0,17	11	0,11	10	0,1
92	9	0,09	8	0,08	9	0,09	6	0,06	8	0,08	0,08	7	0,07	4	0,04	6	0,06	4	0,04	6	0,06
93	29	0,29	24	0,24	28	0,28	22	0,22	27	0,27	0,26	33	0,33	30	0,3	36	0,36	26	0,26	34	0,34
94	48	0,48	36	0,36	100	1	47	0,47	92	0,92	0,646	34	0,34	33	0,33	42	0,42	12	0,12	42	0,42
95	54	0,54	33	0,33	90	0,9	50	0,5	84	0,84	0,622	70	0,7	64	0,64	71	0,71	57	0,57	71	0,71
96	2	0,02	3	0,03	2	0,02	1	0,01	3	0,03	0,022	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
97	29	0,29	18	0,18	24	0,24	21	0,21	28	0,28	0,24	36	0,36	32	0,32	35	0,35	28	0,28	31	0,31
98	32	0,32	20	0,2	31	0,31	25	0,25	37	0,37	0,29	37	0,37	34	0,34	40	0,4	32	0,32	41	0,41
99	58	0,58	33	0,33	100	1	58	0,58	95	0,95	0,688	39	0,39	31	0,31	38	0,38	29	0,29	40	0,4
100	62	0,62	28	0,28	61	0,61	45	0,45	63	0,63	0,518	60	0,6	51	0,51	60	0,6	47	0,47	60	0,6
101	65	0,65	31	0,31	69	0,69	54	0,54	67	0,67	0,572	67	0,67	66	0,66	71	0,71	62	0,62	70	0,7
102	65	0,65	30	0,3	68	0,68	53	0,53	67	0,67	0,566	83	0,83	81	0,81	84	0,84	74	0,74	83	0,83
103	6	0,06	8	0,08	7	0,07	4	0,04	7	0,07	0,064	5	0,05	6	0,06	8	0,08	3	0,03	4	0,04
104	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	2	0,02	0,01	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	2	0,02
105	4	0,04	4	0,04	4	0,04	3	0,03	5	0,05	0,04	4	0,04	3	0,03	5	0,05	3	0,03	5	0,05
106	47	0,47	41	0,41	46	0,46	38	0,38	45	0,45	0,434	42	0,42	37	0,37	42	0,42	33	0,33	42	0,42
107	50	0,5	48	0,48	45	0,45	42	0,42	34	0,34	0,438	48	0,48	46	0,46	46	0,46	42	0,42	32	0,32
108	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,014	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	2	0,02
109	40	0,4	24	0,24	37	0,37	35	0,35	43	0,43	0,358	60	0,6	57	0,57	64	0,64	50	0,5	63	0,63
110	19	0,19	21	0,21	31	0,31	20	0,2	60	0,6	0,302	18	0,18	24	0,24	31	0,31	22	0,22	70	0,7
111	2	0,02	2	0,02	3	0,03	2	0,02	2	0,02	0,022	1	0,01	2	0,02	2	0,02	1	0,01	3	0,03
112	73	0,73	31	0,31	80	0,8	57	0,57	75	0,75	0,632	77	0,77	75	0,75	77	0,77	68	0,68	77	0,77
113	47	0,47	27	0,27	40	0,4	41	0,41	42	0,42	0,394	75	0,75	72	0,72	76	0,76	65	0,65	71	0,71
114	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	1	0,01	0,012	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0	0	1	0,01
115	14	0,14	23	0,23	33	0,33	22	0,22	76	0,76	0,336	16	0,16	27	0,27	38	0,38	25	0,25	85	0,85
116	45	0,45	40	0,4	44	0,44	34	0,34	46	0,46	0,418	45	0,45	38	0,38	46	0,46	34	0,34	47	0,47
117	41	0,41	23	0,23	37	0,37	33	0,33	43	0,43	0,354	55	0,55	50	0,5	58	0,58	47	0,47	58	0,58
118	27	0,27	25	0,25	26	0,26	22	0,22	27	0,27	0,254	21	0,21	14	0,14	14	0,14	14	0,14	20	0,2
119	77	0,77	30	0,3	97	0,97	61	0,61	79	0,79	0,688	72	0,72	70	0,7	84	0,84	65	0,65	75	0,75
120	35	0,35	22	0,22	33	0,33	30	0,3	42	0,42	0,324	45	0,45	42	0,42	50	0,5	39	0,39	48	0,48
121	79	0,79	31	0,31	100	1	64	0,64	83	0,83	0,714	84	0,84	81	0,81	84	0,84	72	0,72	82	0,82
122	58	0,58	26	0,26	49	0,49	40	0,4	56	0,56	0,458	62	0,62	58	0,58	55	0,55	49	0,49	61	0,61
123	41	0,41	24	0,24	38	0,38	33	0,33	43	0,43	0,358	56	0,56	51	0,51	56	0,56	47	0,47	55	0,55
124	36	0,36	23	0,23	34	0,34	31	0,31	42	0,42	0,332	63	0,63	60	0,6	64	0,64	54	0,54	64	0,64
125	32	0,32	20	0,2	32	0,32	25	0,25	37	0,37	0,292	29	0,29	25	0,25	31	0,31	22	0,22	31	0,31
126	49	0,49	34	0,34	81	0,81	47	0,47	79	0,79	0,58	41	0,41	37	0,37	41	0,41	32	0,32	41	0,41
127	38	0,38	32	0,32	61	0,61	38	0,38	56	0,56	0,45	41	0,41	38	0,38	41	0,41	32	0,32	41	0,41

[illegible]