**GIOVANA MUSSI POLACHINI**

# INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES PROTÉICOS DO CARCINOMA ORAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

**GIOVANA MUSSI POLACHINI**

# INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES PROTÉICOS DO CARCINOMA ORAL

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

---

**São José do Rio Preto - SP**

**2004**

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, passou a denominar-se Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução UNESP nº RU. 10/01 de 08/03/2001, DOE de 09/03/2001.

Polachini, Giovana Mussi.
Investigação de marcadores protéicos do carcinoma oral / Giovana Mussi Polachini – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004.
136 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eloiza Helena Tajara da Silva
Co-orientador: Mario Sergio Palma
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Cabeça – Câncer. 3. Pescoço - Câncer. 4. Marcadores moleculares. 5. Proteômica. I. Silva, Eloiza Helena Tajara da. II. Palma, Mario Sergio. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616-006.6

**GIOVANA MUSSI POLACHINI**

Investigação de marcadores protéicos do carcinoma oral

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

_____

Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo
Professor Adjunto
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

_____

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 03 de novembro de 2004.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, SP, Universidade Estadual Paulista (UNESP) e no Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, sob orientação da Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

***Dedico este trabalho***

***Aos meus pais Oswaldo e Marylene.***

***À minha tia Mary Isabel.***

## *AGRADECIMENTOS*

*A realização deste trabalho contou com a colaboração de várias pessoas. Em especial, agradeço:*

*À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, por sua dedicada orientação, amizade, apoio e paciência sempre demonstrados ao longo desses anos e por ter acolhido os meus sonhos e me ajudado a lutar por eles.*

*Ao Prof. Dr. Mario Sergio Palma (IB, UNESP, Rio Claro, SP), pela co-orientação, constante disponibilidade em me receber em seu laboratório e, principalmente, por ter me apresentado a "Proteômica".*

*Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e à Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo, pela disponibilidade em participarem como membros da banca, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.*

*Novamente ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, por sempre ter me recebido em seu laboratório e disponibilizado a utilização do mesmo.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela preocupação em resolver as minhas dúvidas.*

*Às Profas. Dras. Maria Tercília Vilela de A. Oliveira e Ana Elizabete Silva, pelo apoio e consideração.*

*À Profa. Dra. Paula Rahal, pela amizade e descontraídas conversas.*

*Aos doutores José Francisco de Góis Filho, Érica Erina Fukuyama (Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo, SP) e José Victor Maniglia*

*(Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP), por terem cedido as amostras incluídas neste estudo e seus respectivos dados.*

*À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury (FAMERP), pela paciência ao microdissecar as amostras empregadas no presente trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por ter permitido a realização da microdissecção das amostras em seu laboratório.*

*À pós-graduanda Ana Maria Galvão Custódio, por ter colaborado na microdissecção das amostras.*

*À Lourdes Cominato (secretária da Dra. Érica Erina Fukuyama) e ao Cláudio Santana Barbosa (Laboratório de Patologia, Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo, SP), por terem me enviado dados importantes relativos às amostras.*

*Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), pela minha formação profissional.*

*Aos Professores do Departamento de Biologia, que compartilharam seus conhecimentos, contribuindo para o meu desenvolvimento.*

*Aos Funcionários do Departamento de Biologia, em especial à secretária Simone Carvalho Fernandes, pela atenção e bons serviços prestados.*

*Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial à Rosemar e à Rosana pela competência e colaboração na resolução de diversos problemas.*

*Aos Funcionários da Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela eficiência e simpatia com que sempre me atenderam.*

*A todos os Pacientes, que voluntariamente e despretensiosamente doaram suas amostras, sem as quais este trabalho seria impossível.*

*À Amersham Biosciences do Brasil LTDA, especialmente à Marisa D'Innocenzo, pelo excelente e competente atendimento, além do curso ministrado no IBILCE em junho de 2003.*

*Aos amigos Hamilton, Adriana, Fábio, Cecília e Patrícia Peres (Laboratório de Bioquímica, IBILCE/UNESP), pela constante disponibilidade e gentileza com que sempre me receberam. Sinto saudades de nossos agradáveis papos.*

*Às amigas MariângelaTorreglosa Ruiz e Elisa Helena Bauab, pela amizade, consideração e apoio demonstrados em momentos difíceis.*

*À Cláudia de Mattos Bellato (Centro de Energia Nuclear para Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP), pelas sugestões e conselhos valiosos relativos aos experimentos.*

*Ao Laboratório Nacional de Luz Sincrontron (Campinas, SP), especialmente ao Dr. Fábio Cesar Gozzo, por me possibilitar o uso do espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF, e à Luciana Rodrigues Camillo, pelo auxílio na utilização deste equipamento.*

*À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), pela contribuição valiosa na implantação do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica.*

*Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Flávia, Ulises, Alessandra Trovó, Alessandra Vidotto, Andréia Martins Selig, Rodrigo, Fernanda Carregaro e Fernanda Barbosa, pela amizade, companheirismo, colaboração e atenção sempre demonstrados. Em especial, me refiro às meninas da "Proteômica" Alessandra Trovó e Alessandra Vidotto, pois após inúmeras dificuldades, alcançamos os nossos objetivos.*

*À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, por seus bons conselhos e sugestões.*

*Às queridas amigas Alessandra Laranja, Ana Paula Balbino e Jucimara Colombo, pela grande e eterna amizade, carinho e apoio demonstrados.*

*À amiga Rosa Maria do Vale Bosso, pela sincera amizade, carinho e compreensão demonstrados em momentos de angústia. Sinto saudades de nossas agradáveis caminhadas pela represa.*

*Aos amigos Keity Souza Santos, Lucilene Delazari dos Santos, Maria Anita Mendes, Maurício Ribeiro Marques e Bibiana Monson de Souza do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP. Em especial, me refiro à Keity e à Lucilene, pela preocupação e disponibilidade, com que me ajudaram neste trabalho.*

*À FAPESP, à CAPES e ao CNPq, financiadores deste trabalho.*

*À Josefa Maria D. da Silva Fernandes Trento, pelo constante apoio, amizade, paciência e bons conselhos.*

*Às amigas Maria Luíza de Paula Vasconcelos e Simone Secco da Rocha, que mesmo distantes, vibram com as minhas conquistas.*

*Às minhas queridas tias Aracy Castagnetti e Mary Isabel Mussi, pelo apoio e carinho, com que acompanharam o meu crescimento.*

*Aos estimados primos José de Carvalho Sombra e Maria José Castagnetti Sombra, meus grandes amigos e incentivadores.*

*À Juliana Castagnetti Sombra, minha adorada priminha.*

*Aos meus amados pais Oswaldo e Marylene, pelo imenso amor, desprendimento e dedicação, com que sempre cuidaram de mim.*

*Aos meus irmãos Adriano e Gustavo, pela admiração e respeito.*

*À minha amada sobrinha Gabriela, que brincou em silêncio para que eu pudesse estudar.*

*E a Deus pela vida...por tudo.*

***"E ainda que tivesse o Dom da profecia, e conhecesse todos os Mistérios e toda a Ciência, e ainda que tivesse toda a Fé de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria".***

***I Coríntios 13:2***

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é um tumor agressivo e está relacionado com a exposição ao tabaco e ao álcool. A recorrência elevada, a variação na agressividade e as taxas baixas de sobrevivência dessa doença requerem nossos esforços para compreender a sua patogênese e para desenvolver melhores estratégias terapêuticas.

No presente estudo, foi investigado se a análise proteômica pode identificar diferenças na expressão protéica entre carcinomas de cabeça e pescoço de diferentes graus de estadiamento. Para alcançar este objetivo, foram otimizados protocolos para extração de proteínas e a técnica de eletroforese bidimensional (2D) foi implantada no laboratório. Os padrões de perfil protéico obtidos foram analisados em oito amostras de carcinoma oral e duas de orofaringe (oito procedentes de tumores com metástases em linfonodos regionais e dois sem metástases) e em 17 amostras aparentemente normais de margens cirúrgicas.

As variações qualitativas e quantitativas detectadas nos perfis protéicos de ambos os grupos foram consistentes e oito proteínas foram identificadas após análise por espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-TOF). Foram elas: albumina, alfa enolase, calgranulina B, galectina 7, mioglobina, miosina (cadeia leve 1), miosina (cadeia leve 2) e tropomiosina 2 (beta). Estas proteínas têm sido detectadas com expressão alterada por diferentes autores em carcinomas da cabeça e pescoço e também em outros tumores. Após validação, as proteínas identificadas podem revelar novos biomarcadores de prognóstico e alvos terapêuticos para tumores de cabeça e pescoço.

## ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma is an aggressive cancer. It is closely related to the practice of tobacco smoking and alcohol abuse. The high recurrence, heterogeneous biological aggressiveness and low survival rates of this group of cancer require our efforts to understand the pathogenesis of the disease and to develop better therapeutic strategies.

In the present study, we investigated whether proteome analysis can identify differences in protein expression between low and high stage head and neck carcinomas. To reach this aim we optimized protocols for protein extraction and established two-dimensional electrophoresis in the laboratory.

Proteome profiling patterns were analyzed in eight oral and two oropharyngeal tumor samples (eight from carcinomas presenting lymph node metastasis and two from carcinomas with no regional metastasis) and in 17 apparently normal surgical margins. Qualitative and quantitative variations in both groups were consistent and eight proteins were identified by matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight - time of flight (MALDI-TOF-TOF) mass spectrometry. These proteins were: albumin, alpha enolase, calgranulin B, galectin 7, myoglobin, myosin (light chain 1), myosin (light chain 2) and tropomyosin beta chain. These proteins have shown to be with altered expression by different studies in head and neck cancers and also in other tumors.

After validation, the proteins identified here could be novel biomarkers for prognosis and rational targets for head and neck tumors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| 2-DE | Eletroforese bidimensional |
| ASB 14 | Amido sulfobetaína 14 |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CHAPS | 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propano sulfonato |
| DTT | Ditiotreitol |
| DTE | Ditioeritreitol |
| IEF | Focalização isoelétrica |
| GI | Identificação da proteína |
| IPG | Gradiente de pH imobilizado |
| LMW | Marcador de baixa massa molecular |
| MALDI-TOF | Espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com base no tempo de vôo |
| MW | Massa molecular |
| $Na_2EDTA$ | Sal dissódico de ácido etileno-diamino-tetraacético |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| pI | Ponto isoelétrico |
| SB 3-10 | N-decil-N, N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS |
| TBP | Tributil fosfina |
| TFA | Ácido trifluoroacético |

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| **1.** | **Introdução** | 1 |
| **2.** | **Objetivos** | 10 |
| **3.** | **Material e Métodos** | 12 |
| 3.1. | Casuística | 12 |
| 3.2. | Métodos | 14 |
| 3.2.1. | Determinação da concentração de proteínas | 14 |
| 3.2.2. | Extração de proteínas com o kit ReadyPrep Sequential Extraction | 15 |
| 3.2.3. | Extração de proteínas com soluções de extração selecionadas da literatura | 18 |
| 3.2.4. | Eletroforese bidimensional (2D) | 20 |
| 3.2.6. | Testes para acondicionamento de géis SDS-PAGE 12,5 % | 24 |
| 3.2.6. | Protocolo de digestão de spots protéicos por tripsina e espectrometria de massa | 25 |
| 3.2.7. | Identificação de proteínas por bioinformática | 28 |
| **4.** | **Resultados** | 30 |
| 4.1. | Dados das amostras estudadas | 30 |
| 4.1.1. | Amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço | 30 |
| 4.1.2. | Amostras de margens cirúrgicas normais | 30 |
| 4.2. | Curvas de calibração para determinação da concentração de proteínas | 33 |
| 4.3. | Extração de proteínas com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction* | 34 |
| 4.4. | Extração de proteínas com soluções de extração selecionadas da literatura | 35 |
| 4.5. | Eletroforese Bidimensional (2D) de extratos protéicos obtidos com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction* | 40 |
| 4.6. | Eletroforese Bidimensional (2D) de extratos protéicos obtidos com soluções de extração selecionadas da literatura | 43 |
| 4.7. | Acondicionamento dos géis SDS-PAGE 12,5% | 56 |
| 4.8. | Análise de imagens dos géis 2D | 56 |
| 4.9. | Espectrometria de massa | 66 |
| **5.** | **Discussão** | 68 |
| **6.** | **Conclusões** | 77 |
| **7.** | **Referências Bibliográficas** | 78 |
| **I.** | **Anexo 1** | 92 |
| **II.** | **Apêndice A** | 1-11 |
| **III.** | **Apêndice B** | 1-10 |
| **V.** | **Apêndice C** | 1-20 |

## 1. Introdução

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de processos malignos comuns no homem. Segundo os dados de Parkin et al. (2001), considerando-se apenas os tumores de cavidade oral, a incidência mundial em ambos os sexos é de 267.000 novos casos anuais e a taxa de mortalidade atinge 128.000 pacientes. No Brasil, as estatísticas divulgadas para o câncer oral atingiram 10.635 novos casos (7.750, em homens; 2.885, em mulheres) e 3.245 óbitos (2.540, em homens; 705, em mulheres) para o ano de 2003 (Ministério da Saúde, 2003).

Entre as neoplasias de cabeça e pescoço, o carcinoma epidermóide ou de células escamosas é o mais freqüente, sendo o consumo de tabaco e álcool o seu fator de risco mais importante (Szyfter et al., 1999). Na verdade, esse risco é dependente do tipo de tabaco e de bebida utilizado. Por exemplo, Castellsagué et al. (2004) observaram que a exposição ao tabaco preto é mais nociva que ao tabaco amarelo. Os pesquisadores também verificaram que consumidores de bebidas com elevado teor alcoólico, como conhaque e whisky, apresentavam duas e três vezes, respectivamente, mais probabilidade de manifestarem carcinoma oral quando comparados aos consumidores de vinho ou cerveja. Além disso, a exposição simultânea a fumo e álcool aumenta o risco de desenvolvimento dessa neoplasia. Realmente, sua incidência em fumantes de cigarro, que é quatro a sete vezes maior em relação aos não fumantes, é multiplicada por 19 e 123 vezes quando ocorre também ingestão de álcool e hábito de mascar tabaco, respectivamente (dados revistos por Ko et al., 1995; Hasnis et al., 2004 e por Kulkarni & Saranath, 2004). Além do tabaco e do álcool, outros fatores de risco do câncer de cabeça e pescoço incluem dieta pobre em frutas e vegetais, história familial da doença e, em menor extensão, infecção pelo papiloma vírus humano (Foulkes et al., 1995;

Foulkes et al., 1996; Franceschi et al., 1996; Franceschi et al., 1999; Gillison et al., 2000; Mork et al., 2001; Tavani et al., 2001; Castellsagué et al., 2004).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as nitrosaminas são as principais substâncias carcinogênicas presentes na fumaça do cigarro e responsáveis pela formação de adutos no DNA após sua ativação metabólica por diferentes enzimas (Hecht, 1999). Considerando que o fumo e outros fatores de risco expõem toda a mucosa do trato aerodigestivo superior aos mesmos carcinógenos, várias alterações genéticas e morfológicas são esperadas em diferentes pontos desse epitélio. Tal fato está de acordo com os riscos elevados de ocorrência múltipla de tumores no pulmão, no esôfago e na região de cabeça e pescoço e com a proposta de Slaughter et al. (1953) conhecida como cancerização de campo.

Existem evidências de que um dos mecanismos utilizados pelo organismo para se defender das substâncias carcinogênicas às quais é exposto envolve a saliva. O potencial anticarcinogênico da saliva foi sugerido pelos estudos de Nishioka et al. (1981), Dayan et al. (1997) e Nagler et al. (2002). Dayan et al. (1997) mostraram, por exemplo, que a saliva bloqueou a iniciação e a progressão do câncer oral em um modelo animal submetido ao carcinógeno 4NQO. Nishioka et al. (1981), empregando o teste de AMES, verificaram que a saliva humana inibiu os efeitos mutagênicos de AF-2, MNNG, 4 NQO, aflatoxina B1, benzopireno, Trp-P-1 e de componentes carcinogênicos da fumaça do cigarro.

A saliva apresenta vários sistemas de defesa, tais como o imunológico, baseado na secreção da imunoglobulina IgA, e o enzimático-protéico, exemplificado pela enzima lisozima e outros componentes tais como histatina, lactoferrina, proteínas ricas em prolina, mucina, dentre outros. Recentemente, um outro mecanismo de defesa salivar tem sido estudado, o sistema antioxidante. Esse sistema inclui diversos componentes, sendo os mais importantes o ácido úrico, que contribui com aproximadamente 70% do potencial antioxidante salivar, e as enzimas peroxidases. Duas peroxidases são encontradas na saliva, a

peroxidase salivar e a mieloperoxidase, produzida por leucócitos em regiões inflamatórias da cavidade oral. A peroxidase salivar desempenha dupla função: controla o nível de peróxido de hidrogênio excretado por leucócitos de glândulas salivares e por bactérias, além de exercer atividade antibacteriana específica, inibindo o metabolismo e a proliferação de várias bactérias na cavidade oral (Morrison et al., 1965; Revis, 1977; Kowolik & Grant, 1983; Smith & Yang, 1984; Pruitt et al., 1990; Moore et al., 1994; Nagler et al., 2002; Nagler, 2003).

Hasnis et al. (2004) verificaram um rápido efeito sinergístico e letal em linfócitos periféricos expostos à fumaça de cigarro e à saliva, com morte de 44% dos linfócitos expostos apenas à fumaça e de 86% após a adição de saliva. A explicação para esse resultado pode ser dada pela transformação de radicais presentes em compostos da fumaça em espécimes altamente reativos, realizada por íons de ferro ativos da saliva. É possível, então, que os mecanismos envolvidos na indução do câncer oral dependam da atuação conjunta dos carcinógenos do cigarro e dos componentes da saliva.

O conhecimento dos principais fatores etiológicos dos tumores de cabeça e pescoço tem facilitado muito o seu estudo. Apesar disso e de todos os esforços em pesquisa para detecção precoce e para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, a predição de sua evolução tumoral é ainda limitada e a taxa de sobrevivência em cinco anos permanece baixa (Sciubba, 2001). Os pacientes com esses tumores em estágios iniciais freqüentemente manifestam poucos sintomas, resultando no atraso do diagnóstico e na diminuição do tempo de sobrevida. Mesmo em lesões histologicamente similares, o comportamento clínico é bastante variável, do mesmo modo que a sua resposta às diferentes terapias disponíveis.

Na busca de novos marcadores para diagnóstico e prognóstico nesse grupo de doenças, uma quantidade considerável de dados genéticos tem sido acumulada. Em 1996, Califano e colaboradores resumiram muitas das informações disponíveis na época e propôs um modelo no qual as deleções cromossômicas em 3p, 9p e 17p seriam características de estágios

precoces, enquanto alterações em 4q, 5q, 6p, 8p, 11q e 13q estariam relacionadas com a transformação maligna e com a invasividade ou com o tempo curto de sobrevida. Muitos dados publicados por diferentes autores concordam com esse modelo. Por exemplo, Bockmuhl et al. (1998) relataram deleções cromossômicas em 3p, 5q e 9p associadas a ganho de 3q em tumores altamente diferenciados, enquanto os pouco diferenciados exibiram deleções de 4q, 8p, 11q, 13q, 18q e 21q, e ganhos de 1p, 11q13, 19 e 22q (dados revistos por Williams, 2000; Bettendorf et al., 2004). Segundo Partridge et al. (1999), a perda de heterozigosidade nas regiões 3p24-26, 3p21, 3p13 e 9p21 está associada a sobrevivência reduzida e aumento da taxa de mortalidade (dados revistos por Williams, 2000; Bettendorf et al., 2004).

Garnis et al. (2003), utilizando a técnica de CGH (hibridização genômica comparativa), identificaram amplificação da região 8q22 em tumores orais. Além disso, observaram expressão elevada do gene *LRP12* (presente na região 8q22), mas não dos genes adjacentes *FOG2 e DPYS*. O mesmo grupo, em 2004, empregando o arranjo OCGR (*oral cancer genomic regional array*), observou deleções de 3p14, 3p24, 8p23, 9p22 e 13q21 e amplificações de 7p11 e 11q13, onde estão localizados os oncogenes *EGFR* e ciclina D1, respectivamente. A expressão aberrante de vários outros oncogenes, entre eles *ras*, *c-myc*, *int-2*, *hast-1* e *bcl-1*, também foram descritas por Todd et al. (1997) e Bettendorf et al. (2004).

Além da ativação de oncogenes, a inativação de genes supressores de tumor é crucial para a transformação de uma célula pré-maligna em maligna. Um dos mais conhecidos é o *TP53*, cujo produto participa do controle do ciclo celular, do reparo de DNA e da apoptose. Mutações nesse gene já foram observadas em muitos tumores de cabeça e pescoço (Ahomadegbe et al., 1995; Bettendorf et al., 2004). Segundo Vicente et al. (2004), a expressão reduzida desse gene mostra uma forte correlação com aumento de sobrevida de pacientes sem metástases regionais.

Recentemente, outras alterações gênicas têm sido associadas com os tumores de cabeça e pescoço. Entre elas estão as que afetam a expressão dos genes *HGF*, *c-met* (Chen et al., 2004), *TIMP-1*, *COL11A1*, *SERPINB2* (Schmalbach et al., 2004) e *GSTT1* (Evans et al., 2004).

Apesar do grande número de dados disponíveis na literatura, o papel de muitos dos eventos genéticos responsáveis por essa doença permanece obscuro e poucos marcadores citogenéticos ou moleculares são comumente utilizados na prática médica (Greenman et al., 2000). Esse fato é conseqüência da heterogeneidade molecular dos tumores e do grande número de alterações que ocorrem durante a progressão maligna.

Recentemente, algumas abordagens metodológicas que permitem a análise em larga escala de características das células malignas foram desenvolvidas, como os arranjos de cDNA (DeRisi et al., 1996), as análises seriadas de expressão gênica/SAGE (Velculescu et al., 1995) e o PCR em tempo real/RT–PCR (Wan et al., 1996; Diatchenko et al., 1996). O estudo da expressão gênica com tais técnicas permite delinear o perfil molecular dos tumores e fornece oportunidades para identificação de muitas alterações que ocorrem no nível de DNA e RNA e sua correlação com a evolução clínica (Golub et al., 1999; Alizadeh et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Stratowa et al., 2001). Entretanto, essas técnicas não fornecem uma avaliação precisa do que ocorre no nível das proteínas.

Por exemplo, alguns genes, por meio de *splicing* alternativo, codificam diferentes proteínas. Modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação, clivagem proteolítica e adição de oligossacarídeos ou lipídeos podem alterar a estrutura e a função de uma mesma proteína e determinar a mudança na sua localização intracelular (Fels et al., 2003). Por esse motivo, para o entendimento dos mecanismos envolvidos na tumorigênese é importante que, em paralelo com os dados derivados do genoma e com os dados clínicos,

sejam também obtidas informações sobre as diferenças protéicas entre a célula normal e a maligna.

A abordagem proteômica utiliza uma combinação de técnicas, como a eletroforese bidimensional (2D), a espectrometria de massa, o seqüenciamento de polipeptídeos e a bioinformática, para identificar e caracterizar as proteínas celulares (Chambers et al., 2000). A eletroforese 2D, por exemplo, é capaz de separar centenas de proteínas em um único gel e é mais sensível que as técnicas baseadas no estudo de ácidos nucléicos (Fey & Larsen, 2001). Suas principais desvantagens referem-se à dificuldade de detecção de certos tipos de proteínas, como as de baixa abundância (receptores, transdutores de sinal e reguladores), as muito básicas e hidrofóbicas, as de membrana e aquelas acima de 150 kDa ou abaixo de 10 kDa (Fey & Larsen, 2001).

Recentemente, uma modificação metodológica da eletroforese 2D (*differential in-gel electrophoresis*-DIGE) introduziu a marcação de amostras de interesse com diferentes corantes fluorescentes (Fels et al., 2003). Esse novo método aponta as variações entre dois tipos celulares em um único gel, evitando a superposição de imagens. A comparação entre células de carcinoma de esôfago e epiteliais normais (Zhou et al., 2002), utilizando essa técnica, resultou em mais de 1.000 spots protéicos em cada lisado e aproximadamente 150 spots apresentaram expressão diferencial nas células cancerosas (dados revistos por Fels et al., 2003).

A espectrometria de massa é outra metodologia muito sensível e específica que permite a identificação de polipeptídeos e o processamento de muitas amostras simultaneamente (Yates, 2000). O requisito básico para essa metodologia é a formação de íons livres em fase gasosa. As proteínas ou os peptídeos obtidos por digestão podem, por exemplo, ser ionizados por *electrospray* quando em meio líquido ou por laser assistido por uma matriz (MALDI), quando em meio sólido. Os íons, positivos ou negativos, são

acelerados em direção ao analisador de massa que os separa de acordo com sua relação massa-carga. Um tipo de analisador, o *time of flight* (TOF), mede o tempo gasto pelos íons para viajarem da fonte ao detector (James, 1997; Fenn et al., 1989; Karas & Hillenkamp, 1988; Banks et al., 2000). Esse último transforma a corrente de íons em sinais elétricos, que posteriormente são processados e analisados por modernos sistemas de computadores operados por usuários (Palma et al, 2003). Esses sinais, representando peptídeos, são comparados com massas peptídicas preditas de digestão teórica de seqüências protéicas contidas em bancos de dados e, finalmente, a proteína estudada pode ser identificada (Banks et al., 2000).

A **Figura 1** resume as principais etapas da análise proteômica por eletroforese 2D e espectrometria de massa.

Apesar de suas limitações, as técnicas de proteômica oferecem a possibilidade de identificação de padrões bioquímicos e de marcadores protéicos que podem auxiliar no diagnóstico ou no prognóstico de neoplasias e na seleção de alvos potenciais para terapia (Chambers et al., 2000; Banks et al., 2000; Lee, 2001). Ao contrário da análise de RNAm, essa abordagem é facilmente aplicada a amostras de fluidos corporais como soro, urina e líquido sinovial (Kennedy, 2001) e permite a avaliação de modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação, acetilação e metilação, que são muito importantes na determinação da função protéica (Pandey & Mann, 2000).

As estratégias empregadas incluem a análise de um conjunto de proteínas isoladas de diferentes tipos celulares ou extraídas após tratamento de células com drogas ou fatores de crescimento ou mesmo precipitadas por um dado anticorpo (Kobayashi, 2001). Wan et al. (2001), por exemplo, aplicaram as técnicas de proteômica para estudar a apoptose induzida por ácido retinóico em células de leucemia aguda promielocítica. Le Naour et al. (2001), com abordagem semelhante, identificaram um novo antígeno tumoral no soro de pacientes com

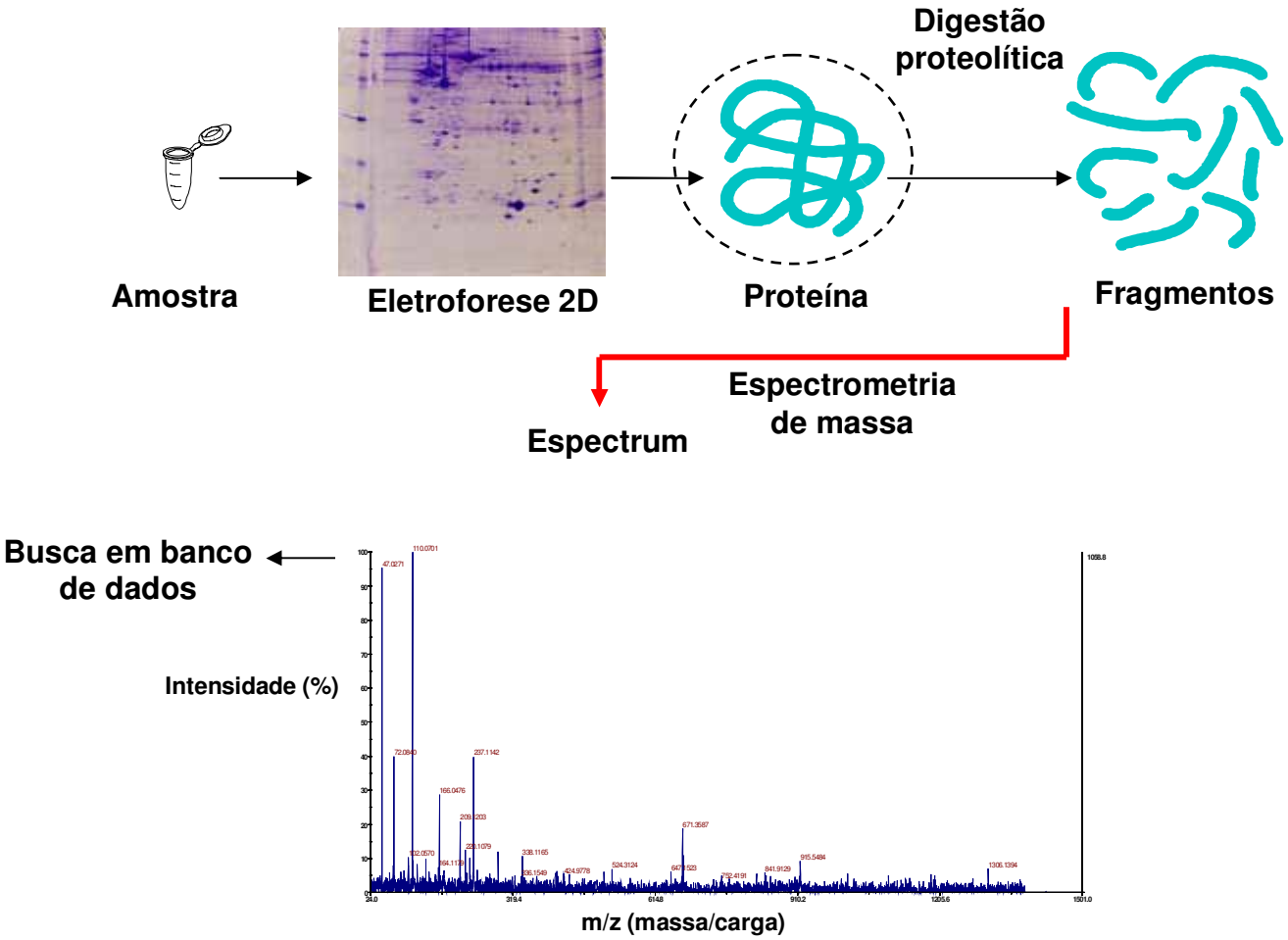



**Figura 1.** Ilustração das principais etapas da análise proteômica por eletroforese 2D e espectrometria de massa.

câncer de mama. Celis et al.(1999), após a avaliação de proteínas diferencialmente expressas em carcinoma espinocelular de bexiga e em epitélio normal, puderam definir alguns dos passos envolvidos no processo maligno desse tecido que, de forma similar à mucosa oral, também exibe cancerização de campo.

Alguns trabalhos recentes utilizando técnicas de proteômica para estudo do câncer incluem os de Yokoo e colaboradores que apresentaram, em 2004, seus resultados sobre a expressão de α fetoproteína em células cancerosas de fígado. Cheung et al. (2004) identificaram uma forma dimérica do fator 15 de diferenciação (*growth differentiation factor 15*, GDF15) em câncer de próstata. Zhang et al. (2004) encontraram três proteínas, apolipoproteina A1, uma forma truncada da transtiretina e um fragmento clivado da cadeia pesada H4 do inibidor inter-α-tripsina (*inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4*), como potenciais biomarcadores para a detecção de câncer de ovário em estágio precoce. Outros trabalhos interessantes foram apresentados por Huang et al. (2004), Hong et al. (2004), Young et al. (2004), Saghatelian et al. (2004), Wong et al. (2004) e Ahmed et al. (2004).

Esses exemplos compreendem apenas uma pequena parcela das publicações sobre análises protéicas em câncer. Uma pesquisa rápida no banco de dados PubMed mostra que o número de publicações com as palavras "*proteomics OR proteome AND cancer*" aumentou de 42 no ano de 2000 para 261 no ano de 2004, o que dá uma idéia do recente interesse e da importância crescente dessa metodologia no estudo do câncer. É provável, portanto, que seus resultados, associados aos da análise da expressão gênica e aos dados clínicos, forneçam elementos para o entendimento do processo tumorigênico e para o desenvolvimento de abordagens preventivas e terapêuticas do câncer.

## 2. Objetivos

Apesar da intensa pesquisa para identificação de marcadores de diagnóstico precoce, de prognóstico e de alvos terapêuticos, a predição da evolução tumoral é ainda limitada e a taxa de sobrevivência permanece baixa em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Várias abordagens para análise das diferenças entre células normais e tumorais estão disponíveis, tais como as técnicas de arranjos de cDNA, SAGE e RT-PCR. Entretanto, essas metodologias não fornecem uma avaliação sobre o produto final do genoma, o proteoma. Por esse motivo, para o entendimento dos mecanismos envolvidos na tumorigênese é importante que, em paralelo com os dados derivados do genoma e com os dados clínicos, sejam também obtidas informações sobre o conteúdo protéico das células normais e malignas.

O objetivo geral do presente trabalho foi a pesquisa de marcadores protéicos de diagnóstico e prognóstico do câncer de cabeça e pescoço. Os seus objetivos específicos compreenderam:

1. Implantar, no laboratório, a técnica de eletroforese bidimensional para análise do perfil protéico de amostras biológicas.
2. Investigar diferenças entre o perfil protéico do carcinoma epidermóide da cavidade oral ou de orofaringe e do tecido normal correspondente.
3. Avaliar, com base nos dados de literatura sobre tumores de cabeça e pescoço, o potencial das proteínas identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa para participação no processo neoplásico.

Para que esses objetivos fossem alcançados, amostras de células normais e neoplásicas de pacientes portadores desse grupo de tumores foram submetidas a protocolos de extração de

proteínas, eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Os resultados podem contribuir para o melhor entendimento dos eventos relacionados com o fenótipo invasivo e não-invasivo e para a identificação de alvos terapêuticos nesse grupo de carcinomas.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Casuística

No presente trabalho, foram estudadas dez amostras de carcinomas epidermóides orais e de orofaringe e 17 margens cirúrgicas aparentemente livres da doença, colhidas após ressecção cirúrgica pela equipe do Dr. José Francisco de Góis Filho (Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo, SP) e pela equipe do Dr. José Victor Maniglia (Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP). As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e submetidas à microdissecção pela médica patologista Dra. Patrícia Maluf Cury, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP. Todos os pacientes concordaram em participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética das Instituições participantes **(Anexo 1)**.

Os dados clínicos e laboratoriais referentes às dez amostras de tumores estão apresentados na **Tabela 1**. Da mesma forma, a **Tabela 2** descreve os dados clínicos e laboratoriais referentes às 17 margens cirúrgicas procedentes de cavidade oral e orofaringe, nove das quais coincidem com as amostras apresentadas na **Tabela 1**. As informações, sob responsabilidade dos médicos Dr. José Francisco de Góis Filho e Dr. José Victor Maniglia, incluem local da lesão (sítio primário), idade, sexo, etnia, exposição a agentes mutagênicos (tabaco e álcool) e estadiamento anátomo-clínico (tamanho da lesão, grau de infiltração, comprometimento de gânglios regionais ou distantes e comprometimento extra-ganglionar). Em relação ao estadiamento, a classificação empregada foi a TNM, que segue os critérios da *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), detalhada por Ambrosch et al. (1998) para carcinomas orofaríngeos. Segundo a classificação TNM, os tumores primários são definidos como T1 a T4, dependendo do seu tamanho, como N0 a N3, dependendo do comprometimento dos linfonodos, e como

**Tabela 1.** Dados clínicos e laboratoriais de 10 amostras tumorais procedentes de pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo local da lesão (sítio primário); idade (anos); sexo (M = masculino, F = feminino); etnia (C = caucasóide, N = negróide); exposição a tabaco e álcool (+ = exposição positiva, - = exposição negativa); classificação TNM segundo o laudo do patologista. A = amostra; Tu = tumor.

| A | Sítio Primário | Idade | Sexo | Etnia | Tabagismo | Etilismo | Classificação TNM patologista |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tu 1 | Retromolar/ Orofaringe | 54 | F | (*) | + | + | T4N2bM0 |
| Tu 2 | Pelve lingual | 67 | F | C | + | - | T3N2bM0 |
| Tu 3 | Pelve lingual | 52 | M | N | + | + | T4N1M0 |
| Tu 4 | Pelve lingual | 74 | F | C | + | - | T4N2BM0 |
| Tu 5 | Pelve lingual | 55 | M | C | + | - | T2N2cMX |
| Tu 6 | Pelve lingual | 51 | M | N | + | (*) | T2N0M0 |
| Tu 7 | Borda lingual | 45 | M | C | + | + | T4N1M0 |
| Tu 8 | Borda lingual | 80 | F | C | - | - | T3N2BM0 |
| Tu 9 | Amígdala lingual/ Loja tonsilar direita | 51 | M | C | (*) | + | T2N2AM1 |
| Tu 10 | Pelve lingual | 54 | M | C | + | + | T4N0M0 |

**(*): dados não disponíveis**

**Observação. As amostras assinaladas em vermelho (Tabelas 1 e 2) são, respectivamente, coincidentes, ou seja, provenientes dos mesmos pacientes.**

**Tabela 2.** Dados clínicos e laboratoriais de 17 amostras de margens cirúrgicas procedentes de pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo local de ressecção da mucosa aparentemente normal; idade (anos); sexo (M = masculino, F = feminino); etnia (C = caucasóide, N = negróide); exposição a tabaco e álcool (+ = exposição positiva, - = exposição negativa); classificação TNM segundo o laudo do patologista. A = amostra; Ma = margem cirúrgica.

| A | Local de ressecção | Idade | Sexo | Etnia | Tabagismo | Etilismo | Classificação TNM patologista |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ma 1 | Retromolar/ Orofaringe | 54 | F | (*) | + | + | T4N2bM0 |
| Ma 2 | Pelve lingual | 67 | F | C | + | - | T3N2bM0 |
| Ma 3 | Pelve lingual | 52 | M | N | + | + | T4N1M0 |
| Ma 4 | Pelve lingual | 74 | F | C | + | - | T4N2BM0 |
| Ma 5 | Pelve lingual | 55 | M | C | + | - | T2N2cMX |
| Ma 6 | Pelve lingual | 51 | M | N | + | (*) | T2N0M0 |
| Ma 7 | Borda lingual | 45 | M | C | + | + | T4N1M0 |
| Ma 8 | Borda lingual | 80 | F | C | - | - | T3N2BM0 |
| Ma 9 | Amígdala lingual/ Loja tonsilar direita | 51 | M | C | (*) | + | T2N2AM1 |
| Ma 10 | Úvula | 72 | M | C | + | + | T3N0M0 |
| Ma 11 | Pelve lingual | 73 | M | C | + | - | (*) |
| Ma 12 | Pelve lingual | 55 | M | C | + | + | T4N3M0 |
| Ma 13 | Borda lingual | 52 | M | C | + | + | T3N1M0 |
| Ma 14 | Língua | 64 | M | (*) | + | + | (*) |
| Ma 15 | Pelve lingual | 66 | M | (*) | (*) | (*) | T2N0MX |
| Ma 16 | Borda lingual | 62 | M | C | + | - | T4N0M0 |
| Ma 17 | Língua | 65 | F | C | - | - | T2N0MX |

**(*): dados não disponíveis**

**Observação. As amostras assinaladas em vermelho (Tabelas 1 e 2) são, respectivamente, coincidentes, ou seja, provenientes dos mesmos pacientes.**

M1 ou M0, caso tenham se desenvolvido metástases distantes ou não, respectivamente **(Tabela 3)**.

Além das amostras de tumores e margens cirúrgicas, uma amostra de linfonodo normal foi empregada em teste de solubilização protéica, utilizando-se seis diferentes soluções de extração.

**Tabela 3.** Classificação TNM para carcinomas de orofaringe, segundo os critérios da *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) de 1992, detalhados por Ambrosch et al. (1998).

| Classificação | Característica |
|---|---|
| **Tumor Primário (T)** | |
| T1 | Tumor de 2 cm ou menos na maior dimensão |
| T2 | Tumor de 2-4 cm na maior dimensão |
| T3 | Tumor maior que 4 cm na maior dimensão |
| T4 | Tumor que invade estruturas adjacentes |
| **Linfonodos (N)** | |
| N0 | Linfonodos regionais não comprometidos |
| N1 | Metástase em um único linfonodo ipsolateral ≤ 3 cm |
| N2a | Metástase em um único linfonodo ipsolateral de 3-6 cm |
| N2b | Metástases em linfonodos ipsolaterais múltiplos < 6 cm |
| N2c | Metástases em linfonodos bilaterais ou contralaterais < 6 cm |
| N3 | Metástases em linfonodos ≥ 6 cm |
| **Metástases (M)** | |
| M0 | Ausência de metástases distantes |
| M1 | Metástases distantes |

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Determinação da concentração de proteínas

O Coeficiente Angular foi obtido a partir de uma Curva Padrão [absorbância no comprimento de onda de 595 nm *versus* massa de proteína albumina sérica bovina/BSA(mg)], segundo o Método Experimental de Bradford. Esse método (Bradford, 1976) utiliza o corante

específico para proteínas, *coomassie brilliant blue G-250* PM 854,0 (*coomassie brilliant blue G-250* 10%, etanol 4,8%, ácido fosfórico 8,5%) que, sob as condições de pH do experimento, está presente na sua forma catiônica e absorve a luz no comprimento de onda de 465 nm. Quando o corante liga-se a uma proteína, há estabilização da sua forma aniônica, que absorve a luz na faixa de comprimento de onda de 595 nm. Essa ligação é um processo rápido e o complexo proteína-corante permanece disperso na solução por aproximadamente uma hora.

A Curva Padrão foi elaborada empregando-se uma solução estoque da proteína BSA (C=1 mg/mL), diluída em água para obter as concentrações finais de até 1,0 mg/mL. O volume de 2,5 mL da solução estoque de *coomassie* foi adicionado a cada uma dessas diluições. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro [*Cintra 10e – UV Visible Spectrophotometer* (duplo feixe)], no comprimento de onda de 595 nm, com o programa *Spectral 1.70*.

Para a confecção da Curva Padrão e obtenção do respectivo Coeficiente Angular foi utilizado o programa *Origin 6.0*, com os valores de absorbância (595 nm) no eixo Y e de massa da proteína BSA (mg), presente em cada solução, no eixo X. Sempre foi feita uma curva padrão imediatamente antes da avaliação da massa protéica de um lote de amostras.

Para posterior cálculo das massas protéicas, foi utilizada a fórmula:

| Massa de Proteínas (mg) = Absorbância (595 nm)/Coeficiente Angular (B) |
|---|

### 3.2.2. Extração de proteínas com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction* (BioRad 163-2100)

Uma amostra de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Tu 8) e sua margem cirúrgica (Ma 8) foram submetidas ao processo de extração protéica empregando-se o *ReadyPrep Sequential Extraction Kit* (BioRad 163-2100), que permite o pré-fracionamento de

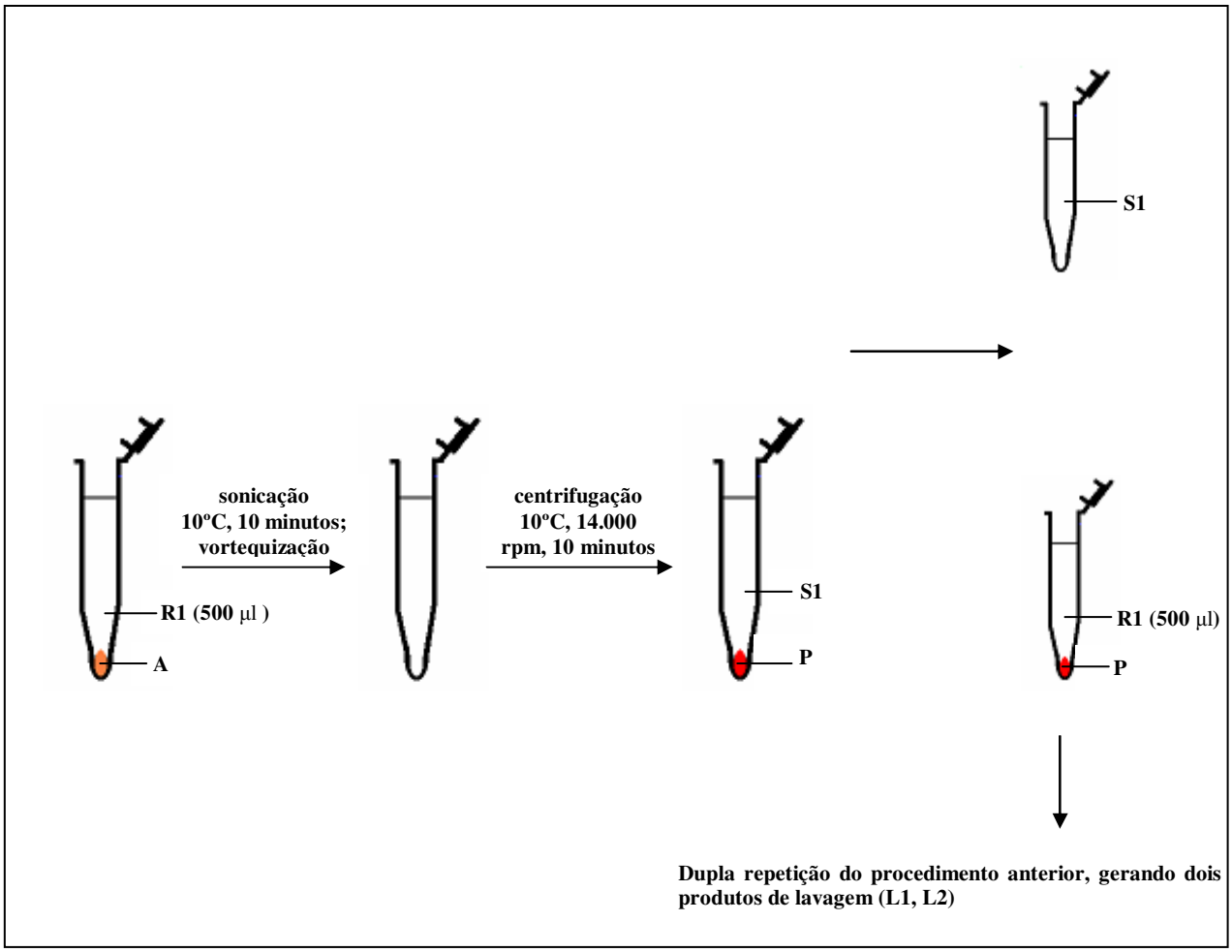
proteínas das amostras com base na sua solubilização diferencial. Cada uma das três soluções do kit solubiliza um diferente grupo de proteínas. O reagente 1 (Tris base 40 mM) extrai apenas as proteínas mais solúveis, tais como as proteínas citosólicas. O reagente 2 (Uréia 8M, CHAPS 4%, Tris 40 mM e *Bio-Lyte 3/10 ampholyte* 0,2%) é empregado para extrair as proteínas de solubilidade intermediária e o reagente 3 (Uréia 5M, Tiouréia 2M, CHAPS 2%, SB 3-10 2%, Tris 40 mM e *Bio-Lyte 3/10 ampholyte* 0,2%) extrai as proteínas insolúveis nos reagentes 1 e 2. O volume de 10 µl do agente redutor não carregado TBP 200 mM foi acrescentado a 1 mL dos reagentes 2 e 3 antes do seu uso. O TBP reduz as pontes dissulfeto, permitindo o completo desdobramento das proteínas (Herbert, 1999). Seguindo as instruções do kit, os três reagentes e o TBP foram reidratados com água ultrapura autoclavada. Em seguida, foram estocados a -20ºC (reagentes 1, 2 e 3) e -70ºC (TBP).

A amostra, em tubo vedado com parafilme, recebeu 500 µl do reagente 1 (R1) e foi sonicada a 10º C, durante 10 minutos. Posteriormente, o material foi agitado (*vortex*) e, em seguida, centrifugado a 10ºC a 14000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante (S1) foi transferido para tubo estéril. O sedimento recebeu, novamente, 500 µl do reagente 1 e foi submetido ao mesmo procedimento acima descrito, por mais duas vezes, resultando em dois sobrenadantes denominados produtos de lavagem (L1 e L2) **(Esquema 1)**. O mesmo protocolo foi utilizado para os sedimentos resultantes das etapas anteriores, empregando-se 250 µl dos reagentes 2 e 3.

O sedimento final sofreu uma quarta extração utilizando-se 100 µl de uma solução de SDS (SDS 1%; Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; DTT 50 mM; glicerol 25%), responsável pela solubilização de proteínas pouco solúveis (como as de membrana), a 98º C durante 5 minutos (Molloy et al., 1998).

Entre os intervalos dos passos de sonicação, agitação e centrifugação, o material foi mantido em gelo para minimizar a degradação protéica.

Dessa forma, de cada amostra foram obtidos 4 sobrenadantes (S1, S2, S3 e SSDS) e dois produtos de lavagem (L1 e L2) para cada reagente, que foram armazenados a -20ºC para posterior leitura de absorbância e quantificação de proteínas pelo Método Experimental de Bradford.




**Esquema 1.** Ilustração da extração protéica de amostras de tumor (Tu 8) e de sua margem cirúrgica (Ma 8) com o reagente 1 do kit *ReadyPrep Sequential Extraction*. O mesmo protocolo foi adotado empregando-se os reagentes 2 e 3 do kit. A = amostra; R1 = reagente 1; S1 = sobrenadante obtido com o reagente 1; L1, L2 = produtos de lavagens 1 e 2; P = sedimento.

### 3.2.3. Extração de proteínas com soluções de extração selecionadas da literatura

Com a finalidade de testar seis soluções de extração protéica (1 – 6) selecionadas da literatura **(Tabela 4)**, foi utilizada uma amostra de linfonodo normal, em função de sua homogeneidade tecidual, obtida do banco de amostras do laboratório.

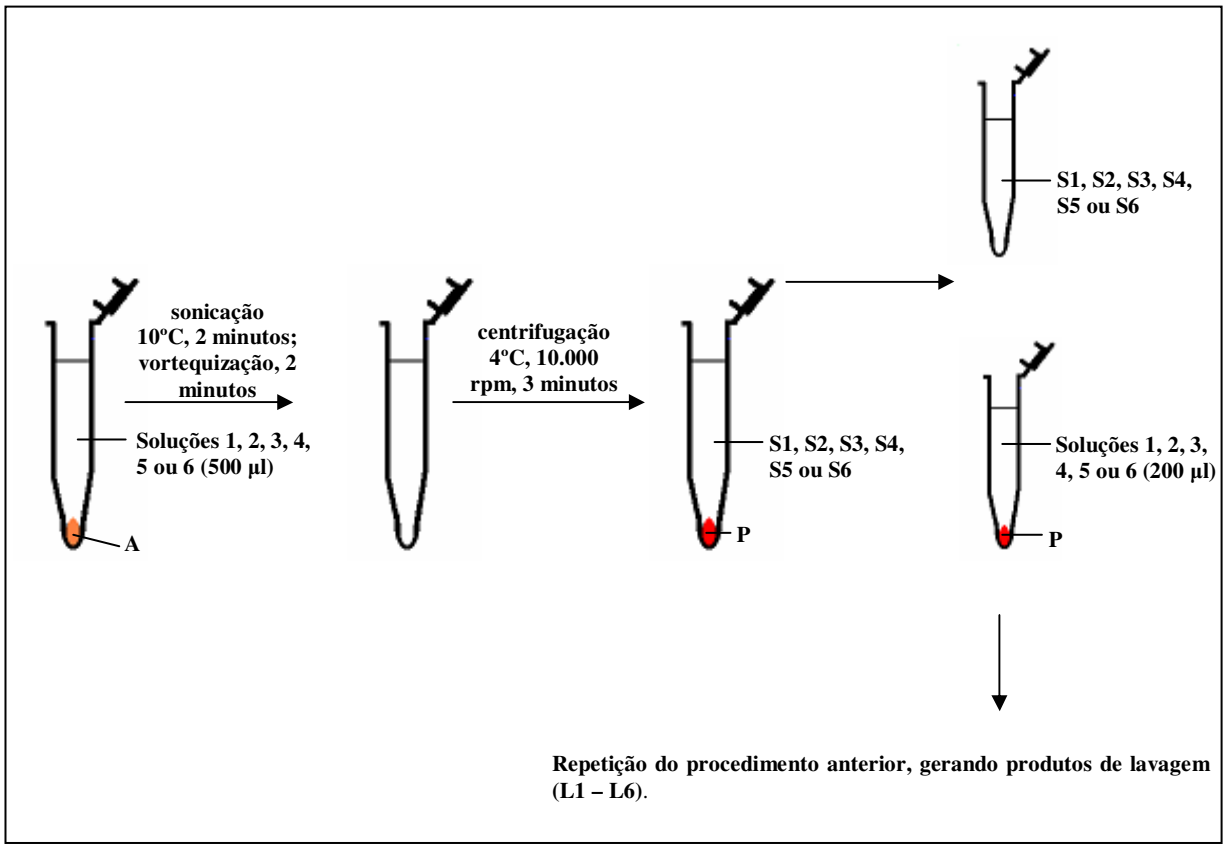
**Tabela 4.** Seis soluções de extração protéica selecionadas da literatura.

| Soluções de Extração | Composição * | Bibliografia |
|---|---|---|
| 1 | Uréia 8 M; CHAPS 4%; DTT* 65 mM; Tris base 40 mM; *Pharmalyte 3-10* 0,2% | Expasy (2003)<br>Herbert (1999)<br>Molloy et al. (1998) |
| 2 | Uréia 5 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2%; SB 3-10 2%; DTT* 65 mM; Tris base 40 mM; *Pharmalyte 3-10* 0,2% | Expasy (2003)<br>Rabilloud et al. (1997) |
| 3 | Uréia 5 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2%; SB 3-10 2%; TBP 2 mM; Tris base 40 mM; *Pharmalyte 3-10* 0,2% | Molloy et al. (1998)<br>Rabilloud et al. (1997)<br>Tachibana et al. (2003) |
| 4 | Uréia 7 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 4%; *Pharmalyte 3-10* 0,2%; DTT* 65 mM | Berkelman & Stenstedt (2002)<br>Görg et al. (2000)<br>Molloy (2000)<br>Rabilloud et al. (1997) |
| 5 | Uréia 5 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2%; ASB-14 1 %; SB 3-10 1 %; *Pharmalyte 3-10* 0,2%; TBP 2 mM | Garfin (2003) |
| 6 | Uréia 7 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2%; ASB 14 0,5 %; *Pharmalyte 3-10* 0,2%; DTT* 65 mM | Castellanos-Serra & Paz-Lago (2002) |

*** DTT: adicionado às soluções 1, 2, 4 e 6, momentos antes da extração protéica.**

Essa amostra foi dividida, empregando-se uma lâmina de bisturi estéril, em seis fragmentos de dimensões semelhantes entre si. As frações foram colocadas em tubos novos e receberam cada uma 500 µl de uma das seis soluções de solubilização protéica.

As frações do linfonodo, em tubos vedados com parafilme, foram sonicadas durante 2 minutos (doze ciclos de 10 segundos, com interrupções de 10 segundos entre cada ciclo), a 10ºC. Em seguida, o material foi agitado por 2 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados à temperatura de 4ºC a 10.000 rpm, durante 3 minutos. Os sobrenadantes (S1 – S6) foram transferidos para tubos estéreis e cada um dos sedimentos recebeu 200 µl de uma das soluções de extração protéica (1 - 6) e foram submetidos ao mesmo procedimento anterior, o que resultou em seis produtos de lavagem: L1 – L6 **(Esquema 2)**.




**Esquema 2.** Ilustração da extração protéica de frações de um linfonodo normal, com soluções de extração selecionadas da literatura. A = amostra; 1 – 6 = soluções de extração 1, 2, 3, 4, 5 ou 6; S1 - S6 = sobrenadantes da primeira lavagem; L1 – L6 = produtos da segunda lavagem; P = sedimento.

Considerando os resultados obtidos com o protocolo descrito acima para o linfonodo, as dez amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e 17 de margens cirúrgicas foram submetidas à solução de extração 4. Foram realizadas duas ou três lavagens com volumes variados de solução, dependendo das dimensões das amostras.

Deve-se ressaltar que, entre os intervalos dos passos de sonicação, agitação e centrifugação, o material foi mantido em gelo para minimizar degradação protéica.

A avaliação da concentração de proteínas dos extratos protéicos dos sobrenadantes e das lavagens, posteriormente armazenados a -70ºC, foi realizada segundo o Método Experimental de Bradford.

### 3.2.4. Eletroforese Bidimensional (2D)

A técnica de eletroforese 2D separa proteínas em duas etapas: a primeira dimensão (focalização isoelétrica) separa proteínas segundo o seu ponto isoelétrico (pI), pH específico no qual a carga total de uma proteína é zero; a segunda dimensão separa proteínas de acordo com seu peso molecular (PM). Milhares de diferentes proteínas são separadas por essa técnica e informações, tais como pI, peso molecular aparente e quantidade, são obtidas.

Os extratos protéicos obtidos com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction*, com a solução de SDS e com as seis soluções de extração selecionadas da literatura foram submetidos à eletroforese 2D.

Dependendo das concentrações de proteínas observadas, os sobrenadantes e os produtos de lavagens obtidos com o mesmo reagente foram reunidos em uma mesma solução.

a. Reidratação da tira de gradiente de pH imobilizado (IPG) e focalização isoelétrica (primeira dimensão)

As soluções protéicas foram adicionadas à solução de reidratação (uréia 8 M, CHAPS 2%, azul de bromofenol, *IPG Buffer* 0,5% e DTT 0,3% ou 0,6%, esses dois últimos acrescentados imediatamente antes do uso), de modo que os volumes finais atingissem 250 µl, quantidade indicada para ser colocada no centro do suporte e reidratar uma tira de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm de comprimento. Cada tira de IPG de pH 3-10 foi colocada sobre a solução presente no suporte e recebeu cerca de 2 mL de fluído de cobertura ou óleo mineral. Após reidratação por 12 h, as tiras foram submetidas a 500Vh (1 h), 1000 Vh (1 h), 16000 Vh (2 h) e, em seguida, 500 - 8000 Vh (1 - 5 h) ou 500 Vh (1 h), 1000 Vh (1 h) e 25000 Vh (4 – 10 h), em sistema *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing*. Esse sistema, os suportes, as tiras e o fluído de cobertura foram adquiridos da Amersham Biosciences.

b. Equilíbrio da tira de IPG e segunda dimensão da eletroforese

Após a corrida da primeira dimensão, as tiras de IPG foram incubadas separadamente por 30 minutos em 10 mL de solução de equilíbrio A (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol), que recebeu DTT 1% imediatamente antes de seu uso. Esse procedimento foi desenvolvido para amostras obtidas com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction*.

No caso de amostras obtidas com outras soluções de extração, as tiras foram imersas seqüencialmente em dois tipos de solução de equilíbrio durante 15 minutos cada: (a) solução de equilíbrio A e (b) solução de equilíbrio A, porém com 2,5% iodoacetamida colocada imediatamente antes do uso (agente alquilante de grupos tiol), em vez de DTT.

Conforme descrição abaixo, as proteínas foram, então, separadas na segunda dimensão da eletroforese, em géis de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE 12,5%; placas: 18 X 16 cm;

espessura: 1.5 mm), dispostos em cuba de eletroforese vertical modelo *SE 600 Ruby* (Amersham Biosciences). O tampão de corrida utilizado 1X ou 2X foi Tris base 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1%.

A tira de IPG da primeira dimensão foi colocada entre as placas de géis de poliacrilamida pré-montadas, juntamente com um marcador de peso molecular. Foram testados quatro marcadores: (a) marcador desenvolvido no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, IB, Rio Claro, UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Mario Sergio Palma, (b) *BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen), (c) *MultiMark® Multi-Colored Standard* (Invitrogen), (d) *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis, Protein Standard* (Amersham Biosciences) **(Tabela 5)**. O *BenchMark* e o *MultiMark* são adquiridos prontos para uso. O marcador LMW é ressuspendido em 100 µl de tampão de diluição (glicerol 100%, tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6.8, SDS 10%, β-mercaptoetanol 14,3 M). Em seguida, é diluído na concentração 1:1 no mesmo tampão e aquecido a 96º C, durante 5 minutos. Os marcadores foram aplicados em papel de filtro dobrado, que foi colocado na porção superior do gel de SDS-PAGE. A tira foi fixada no topo do gel com uma solução de selamento (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, agarose 0,5%, azul de bromofenol).

No caso de amostras obtidas com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction*, as condições eletroforéticas foram: 120 V, 30 mA e 25 W por 15 minutos (pré-corrida) e 120 V, 60 mA e 25 W, durante 8 horas (corrida), condições essas suficientes para dois géis, em fonte de eletroforese modelo *EPS 601* (Amersham Biosciences). As amostras obtidas com outras soluções de extração foram submetidas a 250 V, 30 mA e 50 W por 15 ou 30 minutos (pré-corrida) e 250 V, 60 mA e 50 W por 4 horas (corrida) ou 250 V, 90 mA e 50 W, durante 4 horas (corrida). Todos os géis foram feitos em duplicata, em corridas eletroforéticas simultâneas.

**Tabela 5.** Marcadores de peso molecular (em Daltons) de proteínas.

| **MP*** | ***BenchMark™*** | ***MultiMark®*** | ***LMW Calibration*** |
|---|---|---|---|
| 66.000 | 177.300 | 185.000 | 97.000 |
| 45.000 | 110.700 | 98.000 | 66.000 |
| 30.000 | 79.800 | 52.000 | 45.000 |
| 16.950 | 61.000 | 31.000 | 30.000 |
| 8.500 | 47.800 | 19.000 | 20.100 |
| | 35.900 | 17.000 | 14.400 |
| | 24.500 | 11.000 | |
| | 18.700 | 6.000 | |
| | 13.900 | 3.000 | |
| | 5.900 | | |

*** Marcador desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Mario Sergio Palma (IB, Rio Claro, UNESP).**

c. Coloração por *coomassie™brilliant blue R-250* (FW 825,99)

Os géis foram fixados em solução fixadora (etanol 50%, ácido acético glacial 10%) durante 30 minutos e, em seguida, mantidos em solução contendo etanol 50%, ácido acético glacial 5%, por 3 minutos. Posteriormente, foi realizada a coloração por solução de *coomassie™ brilliant blue R-250* (*coomassie™ brilliant blue R-250* PM 825,99 0,05%, etanol ou metanol 40%, ácido acético glacial 10%) por 90 minutos, em unidade de coloração automática *Hoefer Processor Plus* (Amersham Biosciences) ou manualmente. Para a retirada do excesso de *coomassie*, os géis foram submetidos seqüencialmente por quatro vezes à solução de descoloração (etanol 50%, ácido acético glacial 5%) por 15, 45, 120 e 120 minutos. Por fim, foram imersos em solução de preservação (ácido acético glacial 5%) durante 30 minutos ou mais. Após esse tratamento, foram mantidos em solução de metanol 10% durante 48 horas e, posteriormente, armazenados segundo protocolo 5 descrito no item 3.2.5.

d. Análise de imagem

Os géis corados por *coomassie* tiveram suas imagens capturadas em *scanner* modelo *ImmageScanner* (Amersham Biosciences) e foram analisados pelo *software* para análise de dados *ImageMaster 2D Elite* (Amersham Biosciences).

Após a captura de imagens, apenas uma das duplicatas de géis (com spots mais nítidos e definidos) foi selecionada visualmente para análise. Em seguida, todos os spots protéicos, presentes em cada gel selecionado, foram marcados manualmente e, em seguida, numerados pelo *software*. Posteriormente, a escala de pI e os marcadores de peso molecular foram ajustados para a realização de sobreposição dos géis a serem comparados. Em cada dupla de géis comparados, um deles foi tomado como referência (gel com maior número de spots).

A partir dessas análises, foram gerados vários dados como: pontos isoelétricos (pI) e pesos moleculares, presença, ausência e níveis de expressão dos spots protéicos nos tecidos tumorais e margens cirúrgicas.

### 3.2.5. Testes para acondicionamento de géis SDS-PAGE 12,5 %

Foram testados cinco protocolos para o armazenamento de géis SDS-PAGE.

**Protocolo 1**. O gel foi submetido a duas lavagens em etanol 30%, durante 30 minutos, seguida de mais uma lavagem em solução de etanol 30% e glicerol 4%, por 1 hora. Em seguida, folhas plásticas de celofane foram embebidas nesta última solução e, então, utilizadas para armazenar o gel.

**Protocolo 2**. O gel foi mantido, durante 5 minutos, em solução de glicerol 5%. Posteriormente, foi envolto em folhas plásticas de celofane úmidas.

**Protocolo 3**. O gel foi submetido a quatro lavagens (1 hora cada) em água mili-Q. Em seguida, folhas plásticas de celofane úmidas (água ultrapura) foram embebidas em solução de glicerol 10% e utilizadas para acondicionar o gel.

**Protocolo 4**. O gel foi mantido em solução de glicerol 10%, durante 1 hora. Em seguida, foi envolvido em folhas plásticas de celofane, previamente umedecidas na mesma solução, e seco em bastidor (Ceron et al, 1992).

**Protocolo 5.** O gel permaneceu em solução de metanol 10%, 15% ou 20%, durante 48 horas. Posteriormente, foi estocado em saco plástico contendo 2 mL de solução de glicerol 50%. O saco foi selado em seladora.

### 3.2.6. Protocolo de digestão de spots protéicos por tripsina e espectrometria de massa

Os spots protéicos, diferencialmente expressos nos tecidos tumorais e normais, foram retirados dos géis empregando-se o instrumento *BandPick*$^{TM}$ (Elchrom Scientific) e submetidos à digestão protéica por tripsina.

Os spots foram lavados quatro vezes, de 15-30 minutos cada, com 250 µL de solução bicarbonato de amônio 50mM/acetonitrila 50%. Duas outras lavagens, empregando a mesma solução, foram efetuadas por 16 horas sob agitação, de modo que os spots se tornassem incolores. Essa solução foi retirada e, então, foram adicionados 200 µL de acetonitrila 100%. Após 15 minutos, a acetonitrila (ACN) foi retirada. Os spots foram secos em centrífuga a vácuo por 30 minutos. Em seguida, foram hidratados em 15 µL de solução contendo 0,3 µg de tripsina e bicarbonato de amônio 50mM. Passados 20 minutos, foram adicionados 20-30 µL de bicarbonato de amônio 50mM. Os spots permaneceram nessa solução por 24 horas, a 37ºC. Para extração dos peptídeos, foram adicionados 50 µL de ácido trifluoroacético 1% (TFA). Após 16 horas, as soluções de peptídeos foram retiradas e armazenadas em tubos novos (sobrenadante 1). Uma segunda extração foi realizada com 50-100 µL de solução TFA

1%/ACN 50% por 2 horas. O segundo sobrenadante contendo peptídeos foi retirado e combinado ao respectivo sobrenadante 1. As soluções finais foram concentradas em centrífuga a vácuo até 5-10 µL. O volume de 1 µL de cada uma dessas soluções foi solubilizado a 1 µL de matriz *α-Cyano-4-hydroxycinamic acid* e, em seguida, 0,5 µL de solução peptídeos/matriz foi submetido à análise por espectrometria de massa empregando-se o equipamento MALDI-TOF/TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/time of flight*) no Laboratório Nacional de Luz Sincronton (Campinas, SP). Uma ilustração desse equipamento está apresentada na **Figura 2**. Na fonte de íons, os peptídeos obtidos por digestão proteolítica foram ionizados por laser assistido por uma matriz (MALDI). Os íons resultantes foram acelerados em direção ao primeiro analisador de massa *time of flight* (TOF 1), que separou os íons de acordo com o tempo que estes levaram para viajar dentro do tubo de vôo (Palma et al, 2003). Em seguida, um íon de interesse, previamente definido, foi selecionado pelo seletor de íons TIS (*timed ion selector*). Esse íon foi, então, fragmentado na câmara de colisão (*collision cell*) e os íons resultantes dessa fragmentação percorreram um segundo analisador de massa *time of flight* (TOF 2), atingindo, finalmente, o detector de sinais, quando suas massas foram determinadas. A partir dessas massas, foi realizada a identificação de proteínas por bioinformática.

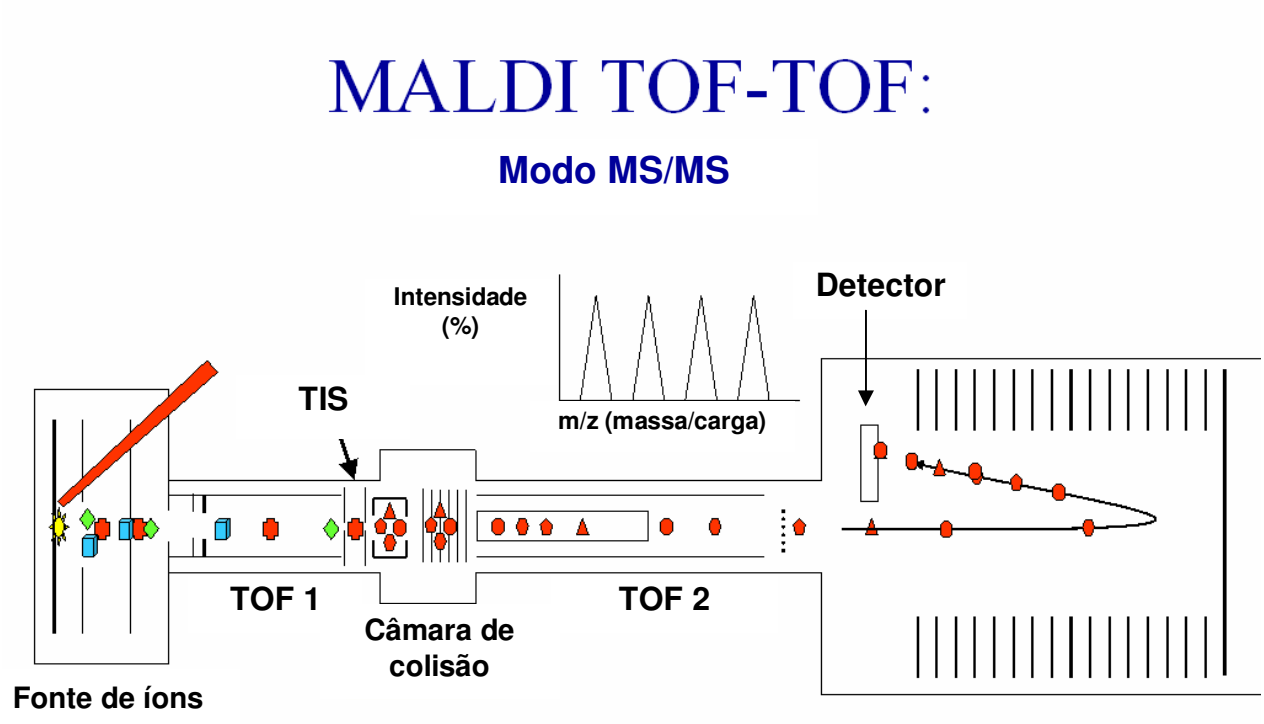



**Figura 2.** Ilustração do espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/time of flight*) utilizado para identificação de massas de peptídeos, modificada do *site*: http://images.google.com.br/images?q=MALDI+TOF%2FTOF&hl=pt BR&btnG=Pesquisa+Google. Nesta ilustração estão destacados os componentes: fonte de íons, dois analisadores de massa do tipo TOF (*time of flight*), um seletor de íons TIS (*timed ion selector*), uma câmara de colisão (*collision cell*) e um detector de sinais.

### 3.2.7. Identificação de proteínas por bioinformática

A identificação de proteínas foi realizada empregando-se o banco de dados *MASCOT* (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), em especial o *MS/MS Ion Search* (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)**,** endereços eletrônicos válidos em 20 de dezembro de 2004. Os parâmetros utilizados para identificação de proteínas estão apresentados na **Figura 3**. O banco de dados utilizado foi o MSDB (*non-identical protein sequence database*). A enzima tripsina foi utilizada para digestão de proteínas presentes nos spots e, deste modo, foi considerada como outro parâmetro. Os compostos DTT e iodoacetamida foram empregados nos experimentos realizados no presente trabalho. Caso presentes, esses compostos são responsáveis por modificações fixas - que certamente ocorrem – nas proteínas, como a *carbamidomethyl* (C). Outras modificações são variáveis, como, por exemplo, a oxidação da metionina, caso o peptídeo estudado apresente esse aminoácido em sua estrutura. Outros parâmetros importantes são: tolerâncias de erros para valores de massa de peptídeos experimentais (*peptide tol*.) e para valores de massa de íons fragmentos (*MS/MS tol.*). No presente estudo, as tolerâncias de erros selecionadas foram: ± 1 Da (*peptide tol*.) e ± 0.8 Da (*MS/MS tol.*). O parâmetro *peptide charge* refere-se à carga do peptídeo precursor. A carga considerada foi 1+. Deve-se ainda indicar o instrumento utilizado para as análises de espectrometria de massa. Neste trabalho, o instrumento empregado foi o MALDI TOF/TOF.

Apenas considerou-se a identificação de uma proteína quando o seu pI experimental (determinado, a partir do gel, pelo analisador de imagens) era próximo ao respectivo pI teórico (determinado pela seqüência de aminoácidos da proteína depositada no banco de dados) e, também, quando as massas moleculares experimental e teórica, determinadas da mesma maneira que os pIs, diferiam em até 20%.

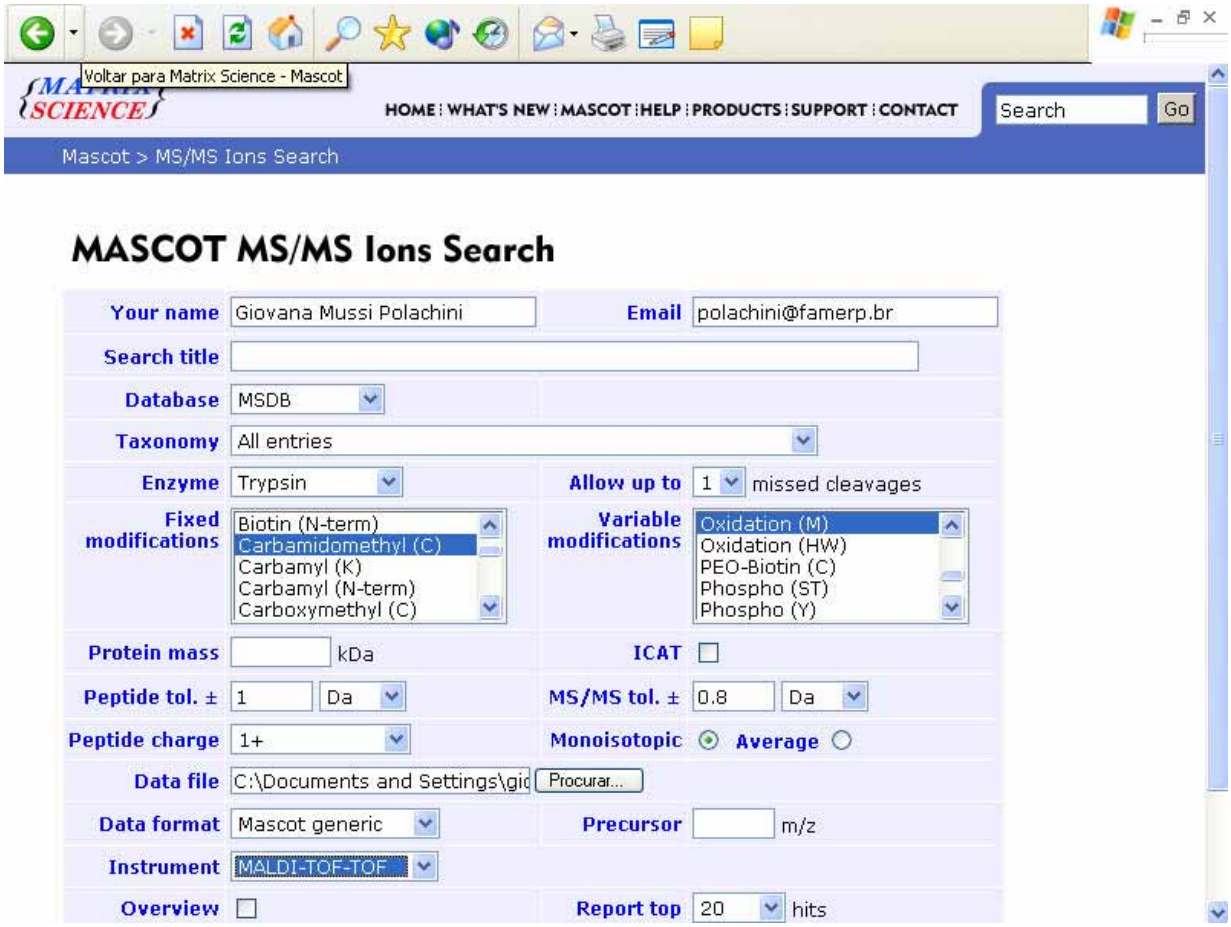



**Figura 3.** Ilustração da página do banco de dados *MASCOT MS/MS Íons Search* utilizado para identificação de proteínas. Alguns dos parâmetros empregados estão apresentados nesta ilustração (*site*: http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS).

# 4. Resultados

## 4.1. Dados das amostras estudadas

### 4.1.1. Amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

Foram analisadas dez amostras procedentes de pacientes portadores de carcinomas epidermóides orais e de orofaringe, quatro do sexo feminino e seis do sexo masculino, com idades variando de 45 a 80 anos (média = 58,3 anos). Oito pacientes referiram exposição ao tabaco e, entre eles, quatro também ao álcool. A região mais atingida foi a pelve lingual e, do ponto de vista anátomo-patológico, conforme classificação TNM para carcinomas de orofaringe (**Tabela 3**, página 14), foram mais freqüentemente observadas as lesões classificadas como T4N1-2M0 **(Tabela 6)**.

### 4.1.2. Amostras de margens cirúrgicas normais

Foram analisadas 17 amostras de margens cirúrgicas aparentemente normais (nove das quais foram obtidas dos pacientes citados no item 4.1.1), cinco provenientes de pacientes do sexo feminino e doze de pacientes do sexo masculino, com idades variando de 45 a 80 anos (média = 61 anos). Treze indivíduos referiram exposição ao tabaco e, entre eles, sete também ao álcool. Do mesmo modo que no grupo de tumores, o local predominante de ressecção foi a pelve lingual e as amostras procederam mais freqüentemente de pacientes com lesões classificadas como T4N1-3M0 **(Tabela 7)**, conforme classificação TNM para carcinomas de orofaringe apresentada na **Tabela 3**, página 14.

**Tabela 6.** Freqüência dos parâmetros sexo, idade, etnia, exposição a fumo e álcool, sítio primário e classificação das lesões em dez pacientes portadores de carcinomas orais ou de orofaringe.

| Parâmetros | Grupos | Total de pacientes (n/%) |
|---|---|---|
| Sexo | Masculino | 6 / 60% |
| | Feminino | 4 / 40% |
| Idade* | ≥ 58,3 | 3 / 30% |
| | < 58,3 | 7 / 70% |
| Etnia | Caucasóide | 7 / 77,8% |
| | Negróide | 2 / 22,2% |
| Fumante | Sim | 8 / 88,9% |
| | Não | 1 / 11,1% |
| Etilista | Sim | 5 / 55,6% |
| | Não | 4 / 44,4% |
| Sítio Primário | Pelve lingual | 6 / 60% |
| | Borda lingual | 2 / 20% |
| | Amígdala lingual / Loja tonsilar direita | 1 / 10% |
| | Retromolar / Orofaringe | 1 / 10% |
| Classificação | T1 | 0 / 0% |
| | T2 | 3 / 30% |
| | T3 | 2 / 20% |
| | T4 | 5 / 50% |
| | N0 | 2 / 20% |
| | N1 | 2 / 20% |
| | N2 | 6 / 60% |
| | N3 | 0 / 0% |
| | M0 | 8 / 80% |
| | M1-X | 2 / 20% |

* Idade média do grupo = 58,3 anos

**Tabela 7.** Freqüência dos parâmetros sexo, idade, etnia, exposição a fumo e álcool, local de ressecção das margens cirúrgicas e classificação das lesões em 17 pacientes portadores de carcinomas orais ou de orofaringe dos quais foram retiradas as margens cirúrgicas.

| Parâmetros | Grupos | Total de pacientes (n/%) |
|---|---|---|
| Sexo | Masculino | 12 / 70,6% |
| | Feminino | 5 / 29,4% |
| Idade* | ≥ 61 | 9 / 52,9% |
| | < 61 | 8 / 47,1% |
| Etnia | Caucasóide | 12 / 85,7% |
| | Negróide | 2 / 14,3% |
| Fumante | Sim | 13 / 86,7% |
| | Não | 2 / 13,3% |
| Etilista | Sim | 8 / 53,3% |
| | Não | 4 / 46,7% |
| Sítio Primário | Pelve lingual | 8 / 47,05% |
| | Borda lingual | 4 / 23,5% |
| | Língua | 2 / 11,75% |
| | Amígdala lingual / Loja tonsilar direita | 1 / 5,9% |
| | Retromolar / Orofaringe | 1 / 5,9% |
| | Úvula | 1 / 5,9% |
| Classificação | T1 | 0 / 0% |
| | T2 | 5 / 33,3% |
| | T3 | 4 / 26,7% |
| | T4 | 6 / 40% |
| | N0 | 5 / 33,3% |
| | N1 | 3 / 20% |
| | N2 | 6 / 40% |
| | N3 | 1 / 6,7% |
| | M0 | 11 / 73,3% |
| | M1-X | 4 / 26,7% |

* Idade média do grupo = 61 anos

## 4.2. Curvas de calibração para determinação da concentração de proteínas

Foram elaboradas três curvas padrões ou de calibração segundo o Método Experimental de Bradford Os coeficientes angulares obtidos a partir dessas três curvas padrões foram: 9,26633; 10,88279 e 13,37753. A curva padrão, referente ao segundo coeficiente angular (B) citado, pode ser observada na **Figura 4**.

Esses coeficientes angulares foram calculados imediatamente antes da avaliação das massas protéicas de três lotes de amostras analisadas no projeto.

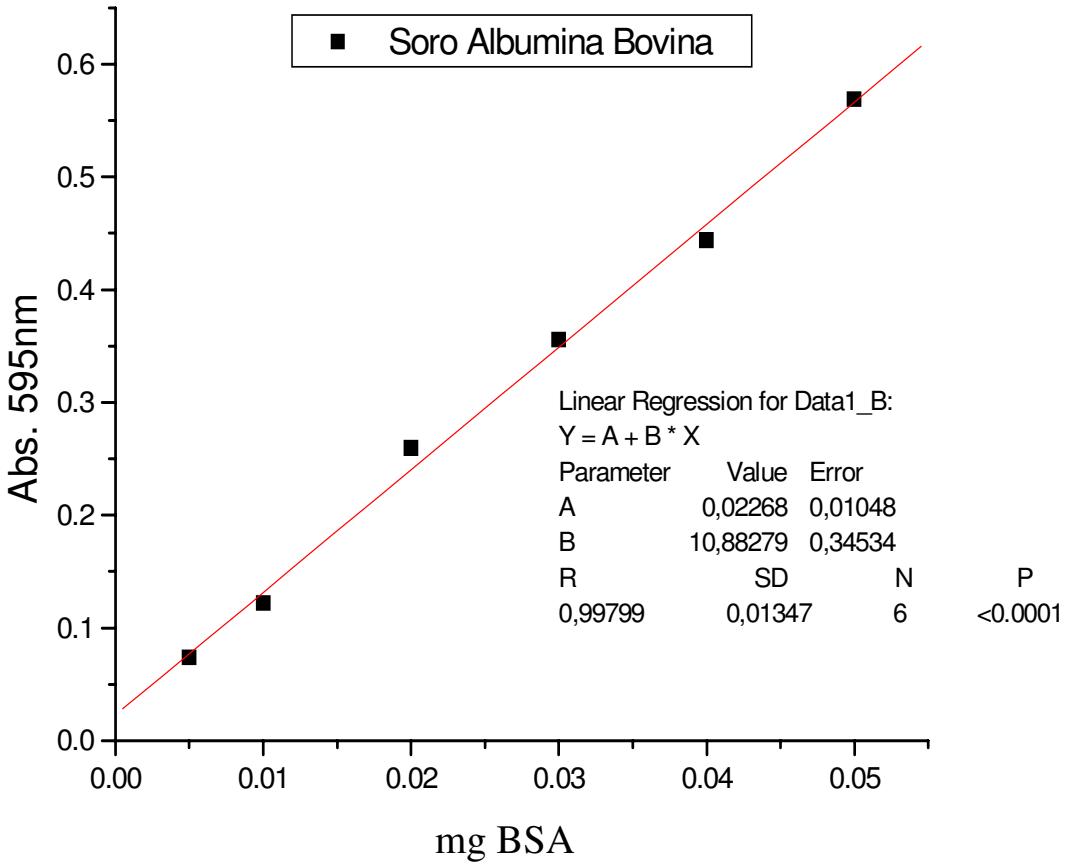



**Figura 4.** Curva Padrão construída pelo programa Origin 6.0, expondo a absorbância no comprimento de onda de 595 nm (eixo y) *versus* massa da proteína BSA (albumina sérica bovina) ($mg^{-1}$) (eixo x) e o respectivo valor do coeficiente angular (B = 10,88279).

## 4.3. Extração de proteínas com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction* (BioRad 163-2100)

### Valores de Absorbância e Concentração Protéica

Os valores de absorbância e concentração protéica dos 20 extratos obtidos de uma amostra de tumor (Tu 8) e sua margem cirúrgica (Ma 8) estão expostos na **Tabela 8**.

A concentração de proteínas diminuiu nos sobrenadantes S2 e S3 (obtidos com os reagentes 2 e 3 do kit) em relação a S1 (reagente 1). Os dados indicaram que as duas lavagens realizadas com os reagentes 1, 2 e 3 são necessárias para minimizar a perda de material, pois levaram à obtenção de massas protéicas significativas, embora menores em relação às massas dos respectivos sobrenadantes. A solubilização protéica do tumor e da margem cirúrgica com os reagentes 2 e 3 resultou em alguns sobrenadantes e lavagens com valores de absorbância negativos e conseqüente ausência de proteínas. As concentrações protéicas obtidas com os reagentes 1, 2 e 3, para a amostra de tumor, foram de 0,86 μg/μL, 0,65 μg/μL e 0,21 μg/μL, respectivamente, considerando a soma de valores de sobrenadantes e lavagens. Quanto à margem cirúrgica, as concentrações protéicas foram de 0,63 μg/μL (reagente 1), 0,32 μg/μL (reagente 2) e 0 (reagente 3), portanto, inferiores em relação às concentrações dos extratos protéicos do tumor.

O extrato obtido após tratamento da margem cirúrgica com a solução de SDS exibiu concentração baixa de proteínas (0,0651 μg/μL) em relação aos demais tratamentos com as soluções do kit.

**Tabela 8.** Valores de absorbâncias dos 20 extratos e suas respectivas concentrações protéicas, obtidos de uma amostra tumoral (Tu 8) e sua correspondente margem cirúrgica (Ma 8), empregando-se o ReadyPrep Sequential Extraction Kit - BioRad 163-2100 e uma solução de SDS. S = sobrenadante, L = produto de lavagem, R1-3 = reagentes 1-3.

| Extrato Protéico | | | Absorbância (595 nm) | Concentração Protéica |
|---|---|---|---|---|
| Tumor | R1 | S | 0,7976 | 733,100 µg/500 µL |
| | | L1 | 0,3435 | 315,720 µg/500 µL |
| | | L2 | 0,2681 | 246,415 µg/500 µL |
| | R2 | S | 0,7923 | 364,108 µg/250 µL |
| | | L1 | 0,2391 | 109,880 µg/250 µL |
| | | L2 | 0,0305 | 14,016 µg/250 µL |
| | R3 | S | 0,1625 | 74,680 µg/250 µL |
| | | L1 | 0 (*) | (*) |
| | | L2 | 0,0707 | 32,490 µg/250 µL |
| | SDS | S | 0,1058 | 19,450 µg/100 µL |
| Margem | R1 | S | 0,8466 | 778,125 µg/500 µL |
| | | L1 | 0,1419 | 130,423 µg/500 µL |
| | | L2 | 0,0454 | 41,730 µg/500 µL |
| | R2 | S | 0,2327 | 106,940 µg/250 µL |
| | | L1 | 0,1120 | 51,470 µg/250 µL |
| | | L2 | 0 (*) | (*) |
| | R3 | S | 0 (*) | (*) |
| | | L1 | 0 (*) | (*) |
| | | L2 | 0 (*) | (*) |
| | SDS | S | 0,0354 | 6,510 µg/100 µL |

**(*): absorbância não significativa**

## 4.4. Extração de proteínas com soluções de extração selecionadas da literatura

### Valores de Absorbância e Concentração Protéica

Os valores de absorbância e concentração protéica de 12 extratos obtidos de seis frações de uma amostra de linfonodo normal estão expressos na **Tabelas 9**. As maiores concentrações foram obtidas empregando-se as soluções 1 e 4 (9,66 µg/µL e 13,28 µg/µL, respectivamente).

Os valores de absorbância e concentração protéica de 31 extratos obtidos de nove amostras tumorais (Tu 1, Tu 2, Tu 3, Tu 4, Tu 5, Tu 6, Tu 7, Tu 9 e Tu 10), empregando-se a

solução de extração 4, estão expostos na **Tabela 10**. A média de concentração protéica foi 11,33 μg/μL (0,82 a 77,46 μg/μL).

As absorbâncias e as concentrações protéicas dos 54 extratos obtidos de 16 amostras de margens cirúrgicas (Ma 1, Ma 2, Ma 3, Ma 4, Ma 5, Ma 6, Ma 7, Ma 9, Ma 10, Ma 11, Ma 12, Ma 13, Ma 14, Ma 15, Ma 16 e Ma 17), empregando-se a solução de extração 4, estão apresentadas na **Tabela 11**. A média de concentração protéica foi 3,3 μg/μL (0,17 a 10,24 μg/μL).

Após a reunião dos sobrenadantes (S) às respectivas lavagens (L1, L2 e L3), as concentrações protéicas das soluções finais variaram de 1,80 a 30,31 μg/μL e de 0,55 a 7,75 μg/μL nas amostras tumorais e normais, respectivamente.

**Tabela 9.** Valores de absorbâncias dos 12 extratos e suas respectivas concentrações protéicas, obtidos de seis fragmentos de uma amostra de linfonodo normal, empregando-se seis soluções de extração (1 - 6). S = sobrenadante, L = produto de lavagem.

| Solução | Extrato Protéico | Absorbância (595 nm) | Concentração Protéica |
|---|---|---|---|
| 1 | S | 0,5777 | 5300 μg/500 μL |
| | L | 0,3970 | 1460 μg/200 μL |
| 2 | S | 0,4183 | 3845 μg/500 μL |
| | L | 0,5028 | 1850 μg/200 μL |
| 3 | S | 0,3950 | 3630 μg/500 μL |
| | L | 0,2576 | 947 μg/200 μL |
| 4 | S | 0,4649 | 4300 μg/500 μL |
| | L | 0,5468 | 5000 μg/200 μL |
| 5 | S | 0,1760 | 160 μg/500 μL |
| | L | 0,0915 | 33,6 μg/200 μL |
| 6 | S | 0,6583 | 600 μg/500 μL |
| | L | 0,7373 | 270 μg/200 μL |

**Tabela 10.** Valores de absorbância dos 31 extratos e suas respectivas concentrações protéicas, obtidos de nove amostras tumorais (**Tu 1, Tu 2, Tu 3, Tu 4, Tu 5, Tu 6, Tu 7, Tu 9** e **Tu 10**), empregando-se a solução de extração 4. S = sobrenadante, L = produto de lavagem.

| Extrato Protéico | Absorbância (595 nm) | Concentração Protéica |
|---|---|---|
| **Tu 1** S | 0,3143 | 1175,39 µg/500 µL |
| L1 | 0,1388 | 259,535 µg/250 µL |
| L2 | 0,1963 | 367,0525 µg/250 µL |
| **Tu 2** S | 0,5254 | 3929,69 µg/500 µL |
| L1 | 0,2680 | 501,12 µg/250 µL |
| L2 | 0,1094 | 204,56 µg/250 µL |
| **Tu 3** S | 0,6155 | 2301,795 µg/500 µL |
| L1 | 0,3208 | 599,85 µg/250 µL |
| L2 | 0,2029 | 379,3925 µg/250 µL |
| **Tu 4** S | 0,8528 | 6378,45 µg/500 µL |
| L1 | 0,7818 | 2923,705 µg/250 µL |
| L2 | 0,6296 | 1177,2625 µg/250 µL |
| **Tu 5** S | 0,5381 | 5804,74 µg/500 µL |
| L1 | 0,7339 | 9896,1625 µg/250 µL |
| L2 | 0,9698 | 5230,85 µg/250 µL |
| L3 | 0,6428 | 5200,6425 µg/150 µL |
| **Tu 6** S | 0,2274 | 1226,535 µg/500 µL |
| L1 | 0,6127 | 8261,8625 µg/250 µL |
| L2 | 0,7181 | 19366,225 µg/250 µL |
| L3 | 0,8310 | 4482,2 µg/100 µL |
| **Tu 7** S | 0,2511 | 1354,365 µg/500 µL |
| L1 | 0,7636 | 4118,66 µg/250 µL |
| L2 | 0,8877 | 4788,025 µg/250 µL |
| L3 | 0,6314 | 5108,4075 µg/150 µL |
| **Tu 9** S | 0,6191 | 3339,265 µg/500 µL |
| L1 | 0,5745 | 1549,3525 µg/250 µL |
| L2 | 0,2892 | 779,935 µg/250 µL |
| **Tu 10** S | 0,7801 | 10320,92 µg/1000 µL |
| L1 | 0,7071 | 2911,681 µg/450 µL |
| L2 | 0,5122 | 2742,692 µg/400 µL |
| L3 | 0,7330 | 1186,083 µg/150 µL |

**Tabela 11.** Valores de absorbância dos 54 extratos e suas respectivas concentrações protéicas, obtidos de 16 amostras de margens cirúrgicas **(Ma 1, Ma 2, Ma 3, Ma 4, Ma 5, Ma 6, Ma 7, Ma 9, Ma 10, Ma 11, Ma 12, Ma 13, Ma 14, Ma 15, Ma 16** e **Ma 17)**, empregando-se a solução de extração 4. S = sobrenadante, L = produto de lavagem.

| Extrato Protéico | Absorbância (595 nm) | Concentração Protéica |
|---|---|---|
| **Ma 1** S | 0,5041 | 1885,19 µg/500 µL |
| L1 | 0,2559 | 478,495 µg/250 µL |
| L2 | 0,1579 | 295,25 µg/250 µL |
| L3 | 0,2068 | 154,674 µg/100 µL |
| **Ma 2** S | 0,2752 | 1029,165 µg/500 µL |
| L1 | 0,1898 | 354,8975 µg/250 µL |
| L2 | 0,0291 | 54,4125 µg/250 µL |
| L3 | 0,1333 | 99,7 µg/100 µL |
| **Ma 3** S | 0,3832 | 4138,22 µg/1000 µL |
| L1 | 0,2526 | 1227,537 µg/450 µL |
| L2 | 0,2607 | 1126,132 µg/400 µL |
| L3 | 0,3053 | 823,3525 µg/250 µL |
| **Ma 4** S | 0,4416 | 330,291 µg/500 µL |
| L1 | 0,1672 | 41,6853 µg/100 µL |
| L2 | 0,0671 | 16,7286 µg/100 µL |
| **Ma 5** S | 0,5739 | 3095,465 µg/500 µL |
| L1 | 0,4475 | 965,48 µg/200 µL |
| L2 | 0,2856 | 462,135 µg/150 µL |
| **Ma 6** S | 0,1899 | 5121,35 µg/500 µL |
| L1 | 0,3759 | 811,002 µg/200 µL |
| L2 | 0,4034 | 652,7505 µg/150 µL |
| **Ma 7** S | 0,4747 | 2560,405 µg/500 µL |
| L1 | 0,4546 | 980,798 µg/200 µL |
| L2 | 0,3384 | 547,572 µg/150 µL |
| **Ma 9** S | 0,1766 | 952,535 µg/500 µL |
| L1 | 0,1101 | 237,54 µg/200 µL |
| L2 | 0,1246 | 201,618 µg/150 µL |
| **Ma 10** S | 0,2439 | 2439,86 µg/1000 µL |
| L1 | 0,1795 | 876,4575 µg/500 µL |
| L2 | 0,1842 | 928,355 µg/500 µL |
| L3 | 0,1802 | 485,975 µg/250 µL |
| **Ma 11** S | 0,2608 | 1406,685 µg/500 µL |
| L1 | 0,1504 | 324,486 µg/200 µL |
| L2 | 0,4990 | 807,4425 µg/150 µL |
| **Ma 12** S | 0,4105 | 767,575 µg/500 µL |
| L1 | 0,2169 | 121,671 µg/150 µL |
| L2 | 0,4318 | 161,4805 µg/150 µL |
| **Ma 13** S | 0,4788 | 1790,575 µg/500 µL |
| L1 | 0,3132 | 585,6375 µg/250 µL |
| L2 | 0,2341 | 291,8216 µg/250 µL |
| **Ma 14** S | 0,4841 | 2224,5 µg/500 µl |
| L1 | 0,5010 | 1150 µg/250 µl |
| L2 | 0,4118 | 567 µg/150 µl |
| **Ma 15** S | 0,6759 | 3645,63 µg/500 µL |
| L1 | 0,2069 | 446,386 µg/200 µL |
| L2 | 0,1915 | 309,87 µg/150 µL |
| **Ma 16** S | 02955 | 1593,85 µg/500 µL |
| L1 | 0,1994 | 430,204 µg/200 µL |
| L2 | 0,3459 | 559,7085 µg/150 µL |
| L3 | 0,3425 | 554,2065 µg/150 µL |
| **Ma 17** S | 0,3573 | 1927,18 µg/500 µL |
| L1 | 0,6014 | 1297,518 µg/200 µL |
| L2 | 0,6504 | 1052,427 µg/150 µL |
| L3 | 0,5325 | 861,6495 µg/150 µL |

As soluções protéicas finais de tumores e de margens cirúrgicas foram reunidas em sete pools ou conjuntos, conforme apresentado nos **Quadros 1 – 3.** O critério para confecção dos pools foi a presença ou ausência, nos pacientes, de linfonodos comprometidos por células neoplásicas. Apenas o pool **G Margem NX** não seguiu esse critério porque foi utilizado apenas para experimentos de padronização.

**Quadro 1.** Pools de extratos protéicos obtidos de amostras tumorais e margens cirúrgicas procedentes de pacientes com nódulos comprometidos por células neoplásicas (N+).

| |
|---|
| **Pool A Tumor N+** (concentração de proteínas 500 μg/146 μL) |
| **Amostras** Tu 1 |
| Tu 2 |
| Tu 3 |
| Tu 4 |
| **Pool B Tumor N+** (concentração de proteínas 500 μg/50 μL) |
| **Amostras** Tu 5 |
| Tu 7 |
| Tu 9 |
| **Pool C Margem N+** (concentração de proteínas 500 μg/206,2 μL) |
| **Amostras** Ma 1 |
| Ma 2 |
| Ma 12 |
| Ma 13 |
| **Pool D Margem N+** (concentração de proteínas 500 μg/240μL) |
| **Amostras** Ma 3 |
| Ma 4 |
| Ma 5 |
| Ma 7 |
| Ma 9 |

**Quadro 2.** Pools de extratos protéicos obtidos de amostras tumorais e margens cirúrgicas procedentes de pacientes com nódulos regionais não comprometidos (N0).

| |
|---|
| **Pool E Tumor N0** (concentração de proteínas 500 μg/98,5 μL) |
| **Amostras** Tu 6 |
| Tu 10 |
| **Pool F Margem N0** (concentração de proteínas 500 μg/104,25 μL) |
| **Amostras** Ma 6 |
| Ma 15 |
| Ma 16 |
| Ma 17 |

**Quadro 3.** Pool de extratos protéicos obtidos de margens cirúrgicas procedentes de pacientes com nódulos regionais comprometidos e não comprometidos.

| |
|---|
| **Pool G Margem NX** (concentração de proteínas 500 μg/172,6 μL) |
| **Amostras** Ma 10 |
| Ma 11 |
| Ma 14 |

## 4.5. Eletroforese Bidimensional (2D) de extratos protéicos obtidos com o kit ReadyPrep Sequential Extraction (BioRad 163-2100)

Cinco extratos provenientes do tumor (Tu 8) e da margem normal (Ma 8) foram submetidos à eletroforese 2D em géis SDS-PAGE 12,5%. Os extratos do tumor foram obtidos com os reagentes R1 **(Figura 5a)**, R2 **(Figura 5b)**, R3 **(Figura 6a)** e SDS **(Figura 6b)** enquanto os da margem cirúrgica foram obtidos com os reagentes R1 e R2, posteriormente reunidos em uma única solução **(Figura 5c)**. As massas de proteínas aplicadas em cada um dos cinco géis foram de 200 μg **(Figura 5a)**, 200 μg **(Figura 5b)**, 86 μg **(Figura 6a)**, 10 μg **(Figura 6b)** e 525 μg **(Figura 5c)**.

Algumas proteínas foram observadas apenas nos géis de extratos tumorais, mas não nos normais, e vice-versa, e outras foram comuns a ambos os tipos, com intensidade de expressão similar ou não. Em particular, foi verificada diferença de expressão de dois conjuntos protéicos correspondentes a proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 10 e 30 kD, o que pode ser melhor visualizado nas **Figuras 5a** e **5c**.

O gel da **Figura 6b** apresentou qualidade insatisfatória e, por esse motivo, a extração com solução de SDS não foi realizada em outras amostras. É evidente a diminuição de spots no caso do gel correspondente ao reagente 3 **(Figura 6a)**. Em ambos os géis, a massa de proteínas aplicada foi muito baixa (10 μg e 86 μg).

O marcador de peso molecular MSP não exibiu bandas bem definidas **(Figuras 5** e **6)**.

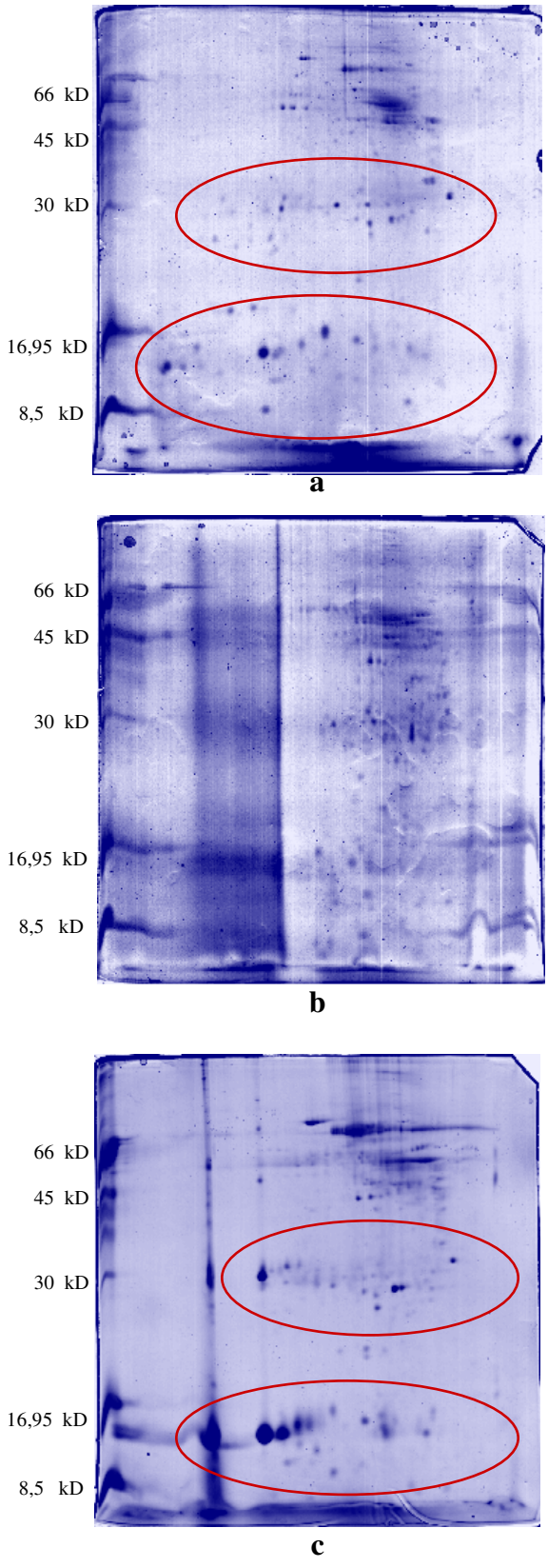
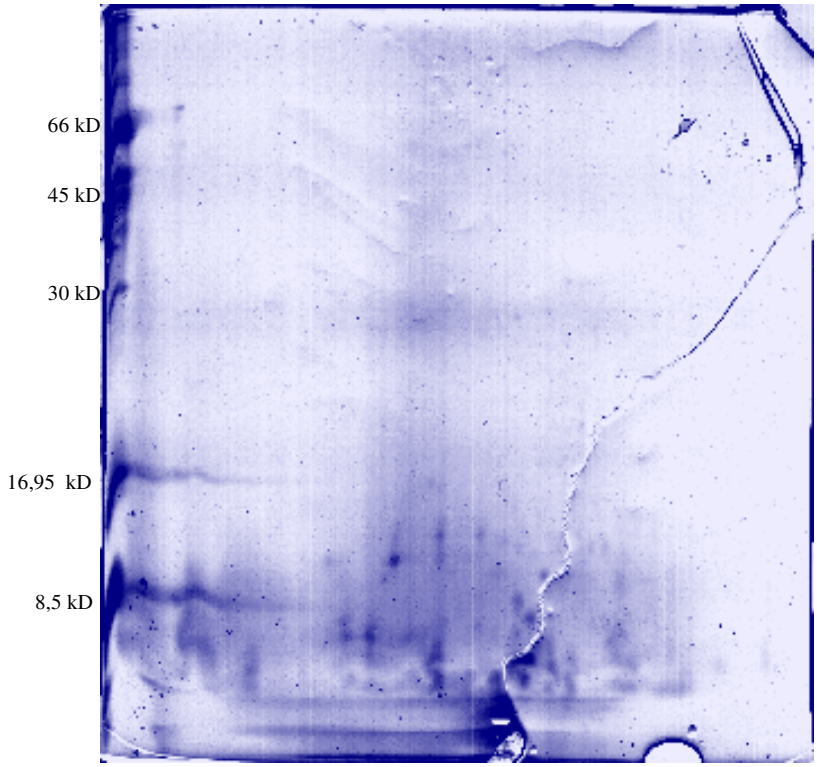
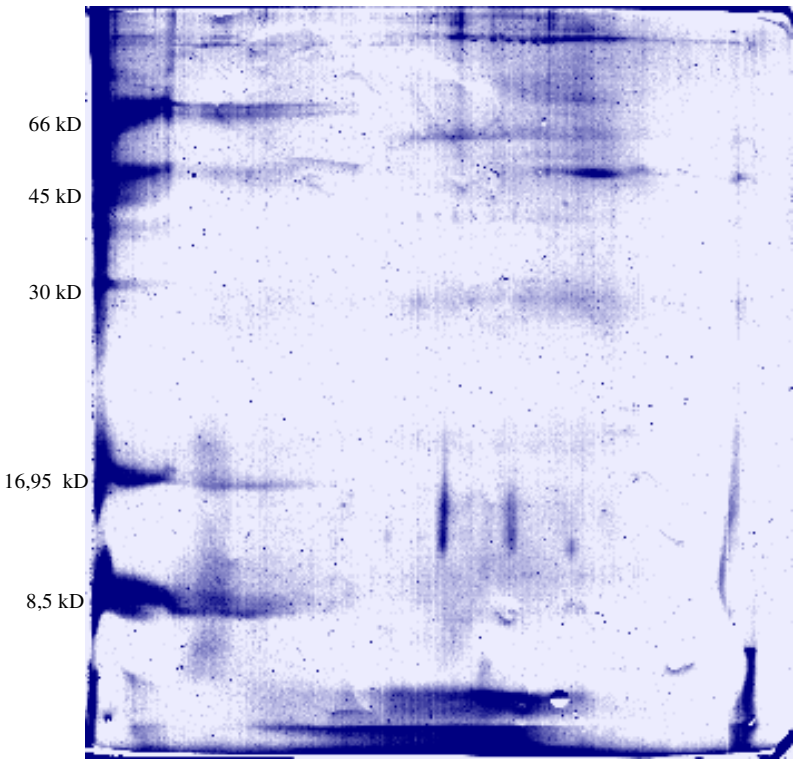



**Figura 5.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos dos extratos obtidos do tumor (Tu 8) com os reagentes 1 **(a)** e 2 **(b)** e da margem cirúrgica (Ma 8) com os reagentes 1 e 2 (extratos reunidos) **(c)**. Reagentes 1 e 2: kit ReadyPrep Sequential Extraction (BioRad 163-2100). M = marcador de peso molecular MSP (kD).




**a**




**b**

**Figura 6.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos dos extratos obtidos do tumor (Tu 8) com o reagente 3 **(a)** e com a solução de SDS (Molloy et al., 1998) **(b)**. Reagente 3: kit ReadyPrep Sequential Extraction (BioRad 163-2100). M = marcador de peso molecular MSP (kD).

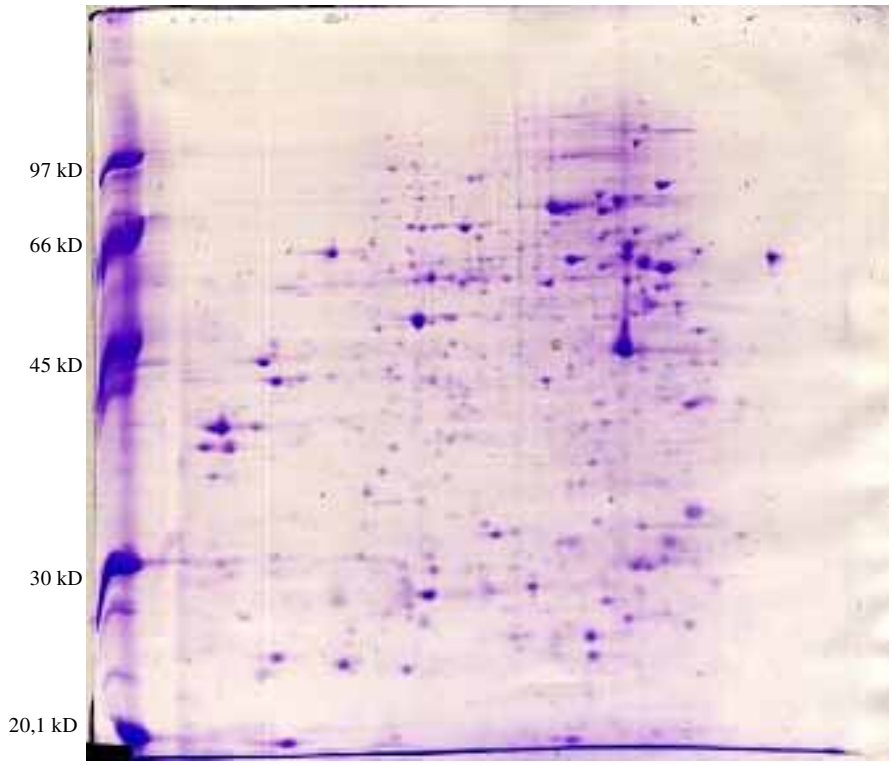
## 4.6. Eletroforese Bidimensional (2D) de extratos protéicos obtidos com soluções de extração selecionadas da literatura

As duplicatas dos géis SDS-PAGE 12,5% de 11 extratos protéicos de um linfonodo normal e de uma amostra de margem cirúrgica (Ma 14) obtidos com seis soluções de extração selecionadas da literatura estão expostos nas Figuras **7** a **11**. As duplicatas dos géis SDS-PAGE 12,5% de sete pools de extratos, três de tecidos tumorais e quatro de tecidos normais, obtidos com as mesmas soluções de extração, estão apresentados nas Figuras **12** a **18**.

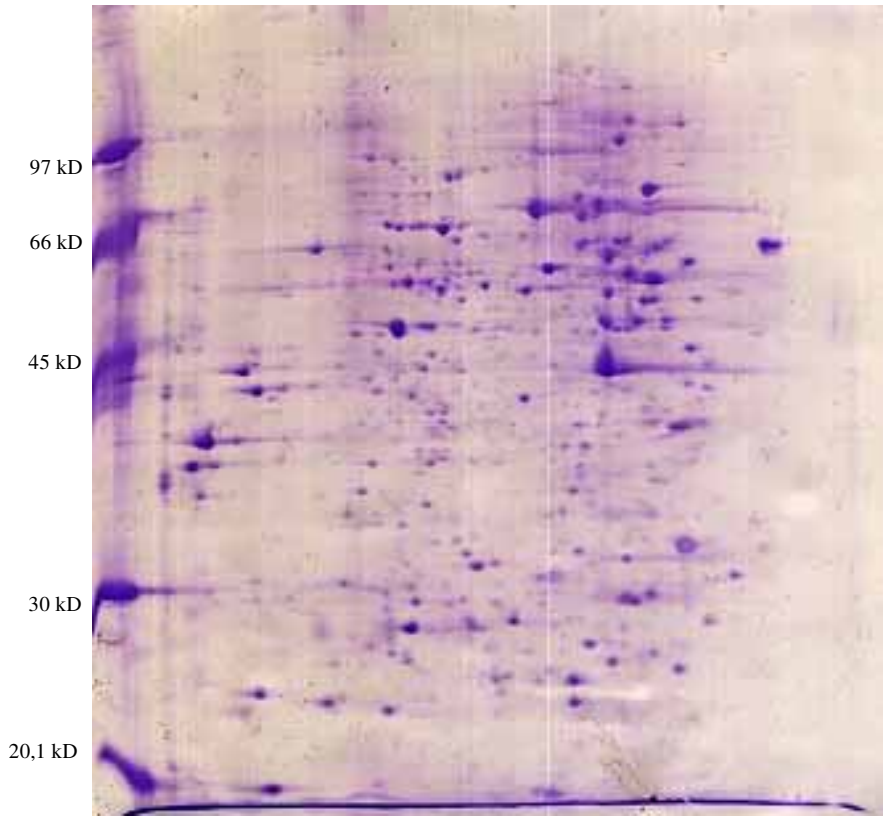
As soluções de extração que produziram spots protéicos mais nítidos e definidos, além de rastros reduzidos, foram a 1 **(Figura 7)** e a 4 **(Figuras 9**, **10**, **12** a **18)**. A utilização da solução 4 também parece ter resultado em maior número de spots em relação à solução 1, como pode ser observado nas **Figuras 7** e **9**. Por esse motivo, embora tais variações de número de spots possam ser decorrentes de diferenças nas massas de proteínas aplicadas, não detectadas pelo Método Experimental de Bradford, a solução de extração 4 foi selecionada para a extração de proteínas das amostras de tumores e margens cirúrgicas já descritas anteriormente **(Figuras 10, 12** a **18)**.

A massa protéica mais adequada, aplicada na focalização isoelétrica, foi a de 500 μg **(Figura 11)**, pois resultou em maior quantidade de spots nos géis SDS-PAGE. A reprodutibilidade foi elevada, como pode ser observado nas **Figuras 7** a **10** e **12** a **18**.

Assim como o marcador de peso molecular MSP **(Figuras 5** e **6)**, o *BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder* e o *MultiMark® Multi-Colored Standard* não exibiram bandas definidas **(Figuras 9b**, **10b**, **11a** e **11b)**. O marcador de peso molecular *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis, Protein Standard* (Amersham-Biosciences) apresentou perda da banda de 14,4 kD quando utilizado com a concentração de 0,86 μg/μL **(Figuras 7**, **8**, **9a**, **10a** e **11c)** mas não na concentração de 0,14 μg/μL **(Figuras 12** a **18)**.

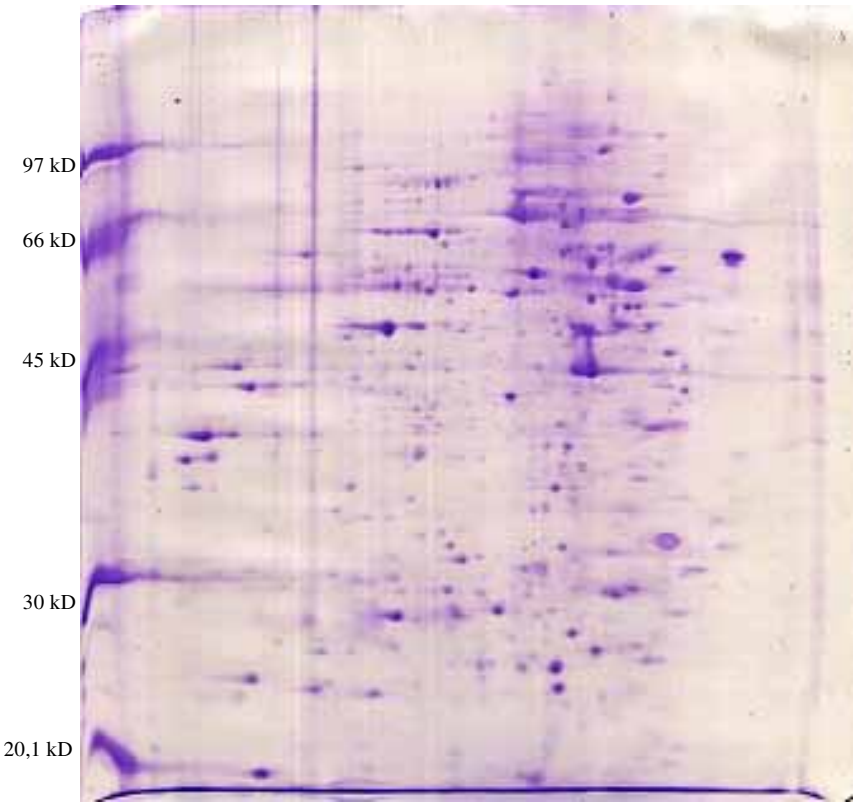



**a**

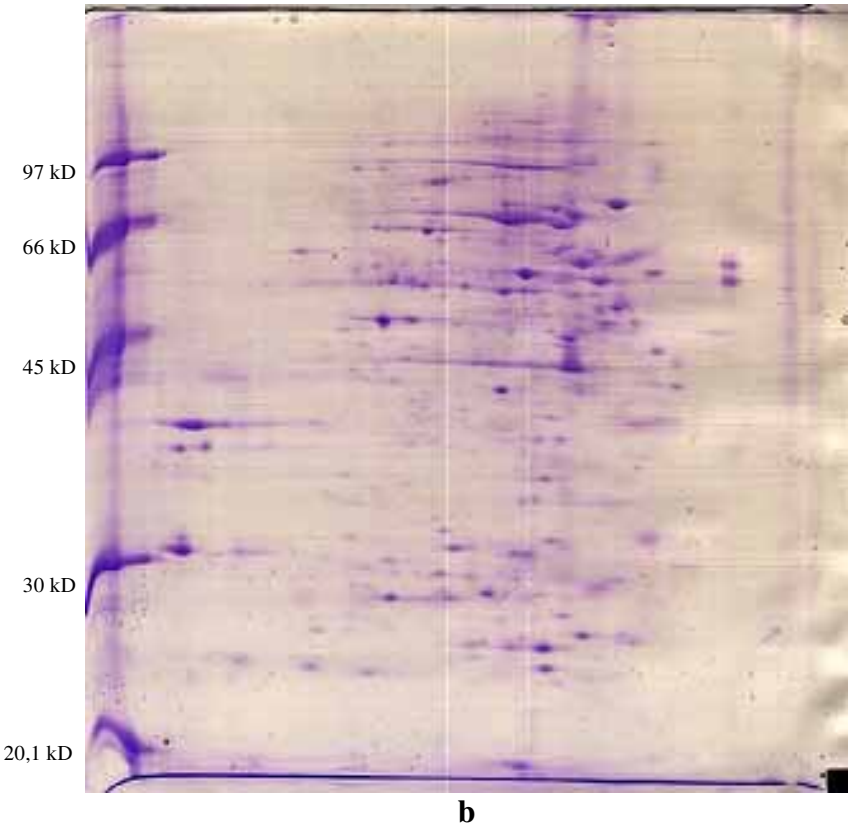



**b**

**Figura 7.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots de 500 μg de proteínas (por gel) obtidas a partir de fragmentos de um linfonodo normal tratados com a solução de extração 1. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

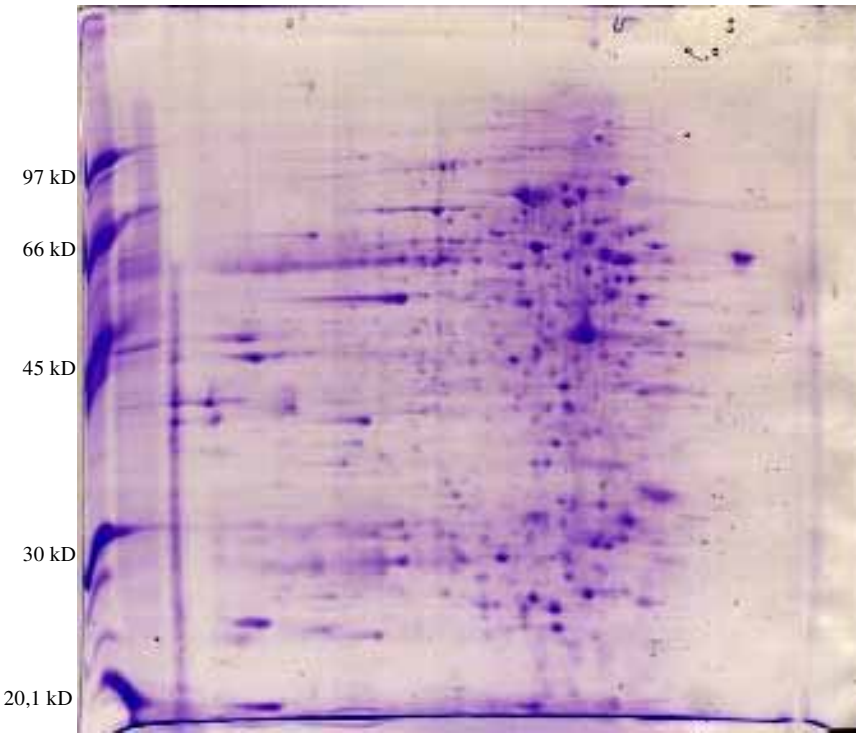



**a**

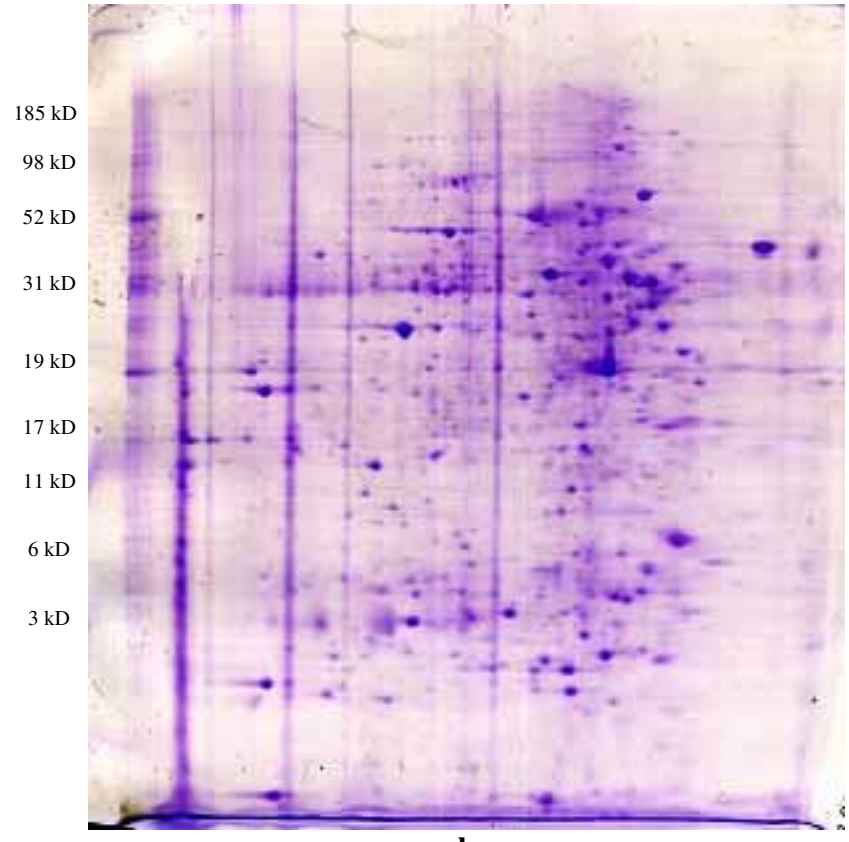



**b**

**Figura 8.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots de 500 µg de proteínas (por gel) obtidas a partir de fragmentos de um linfonodo normal tratados com as soluções de extração 2 **(a)** e 3 **(b)**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

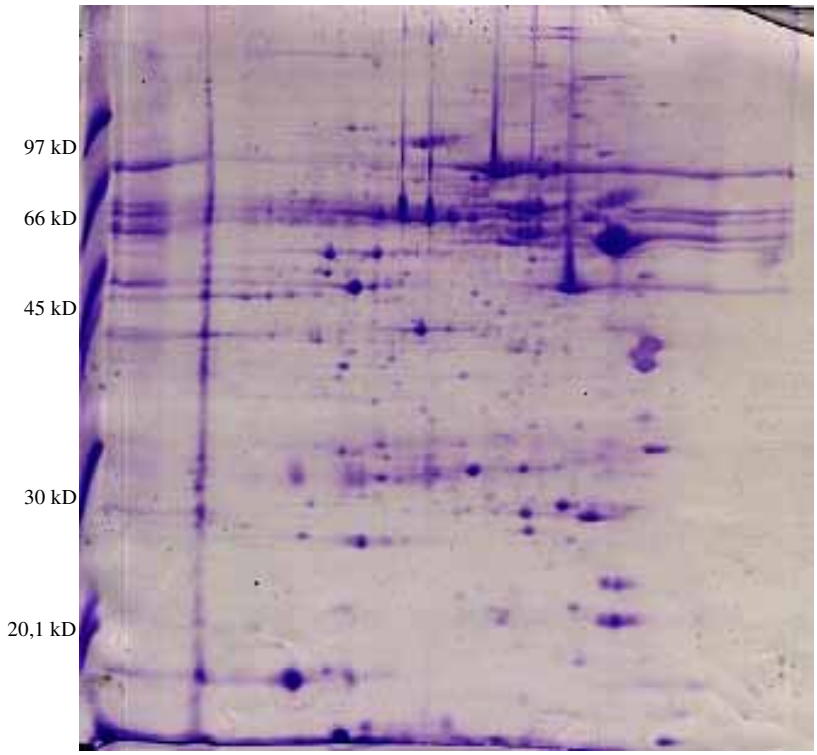



**a**

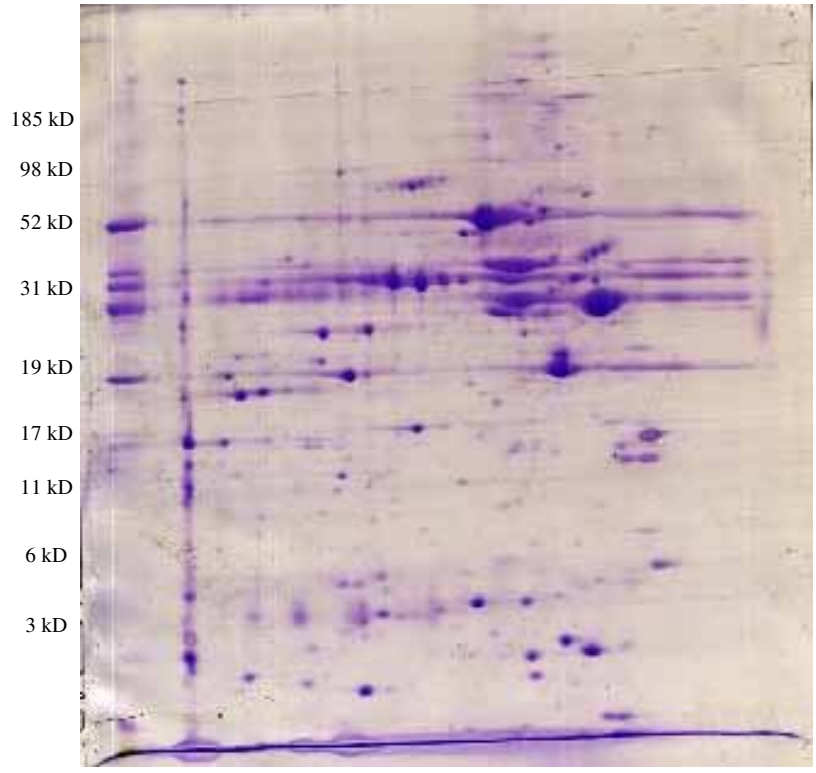



**b**

**Figura 9.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots de 500 µg de proteínas (por gel) obtidas a partir de fragmentos de um linfonodo normal tratados com a solução de extração 4. M = marcadores de peso molecular (kD) **(a)** *LMW Calibration* e **(b)** *MultiMark*.




**a**




**b**

**Figura 10.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com c*oomassie*, mostrando a disposição dos spots de 500 µg de proteínas (por gel) obtidas a partir de margem cirúrgica (Ma 14) tratada com a solução de extração 4. M = marcadores de peso molecular (kD) **(a)** *LMW Calibration* e **(b)** *MultiMark*.

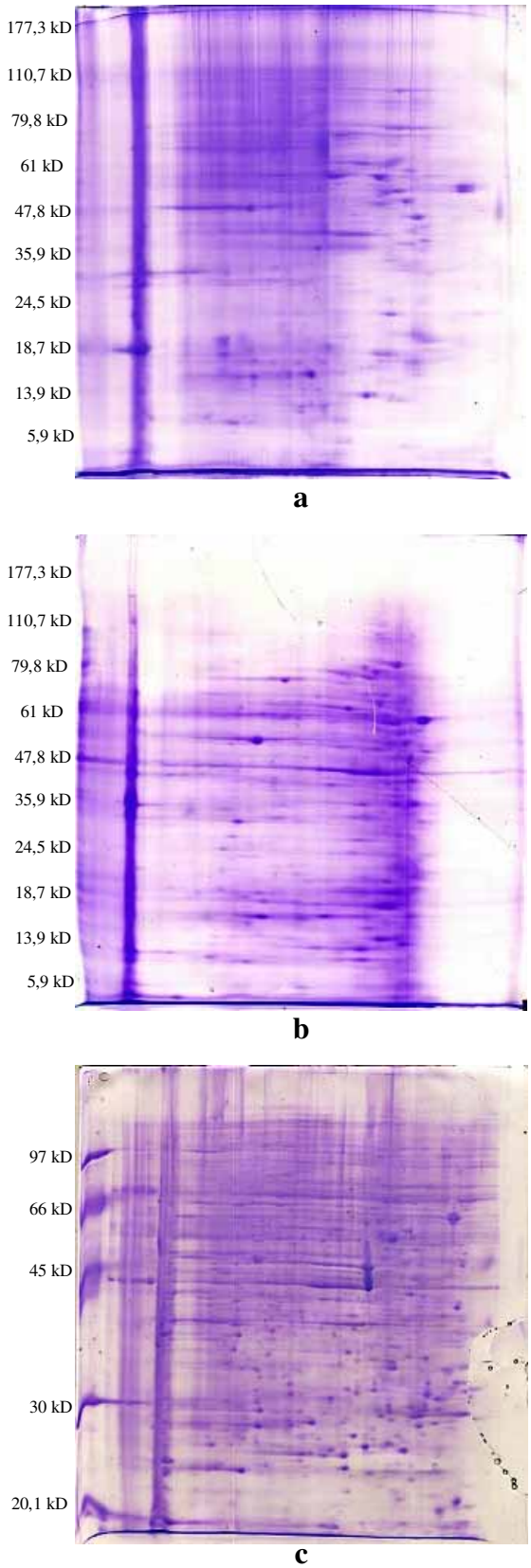



**Figura 11.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com c*oomassie*, mostrando a disposição dos spots de **(a)** 170 µg de proteínas obtidas com a solução 5, **(b)** 250 µg e **(c)** 500 µg de proteínas obtidas com a solução 6, a partir de fragmentos de um linfonodo normal. M = marcadores de peso molecular (kD) **(a)**, **(b)** *BenchMark* e **(c)** *LMW Calibration*.

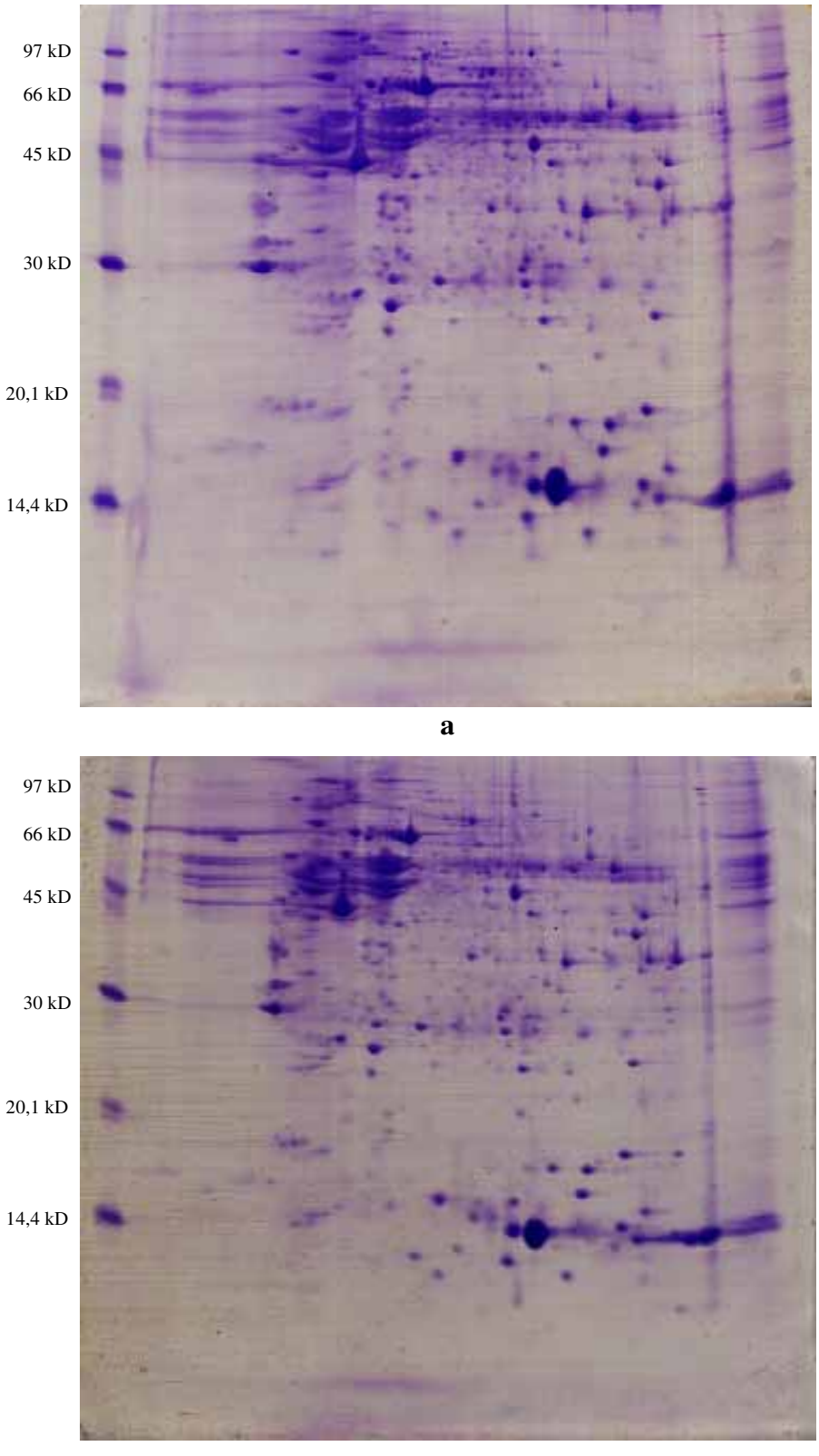
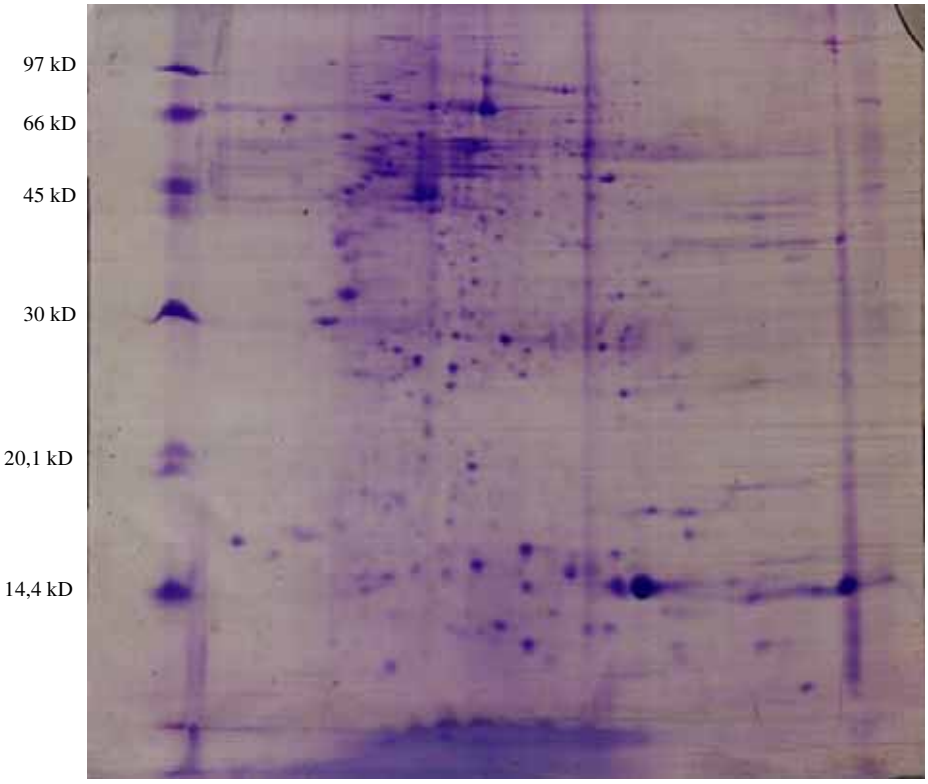
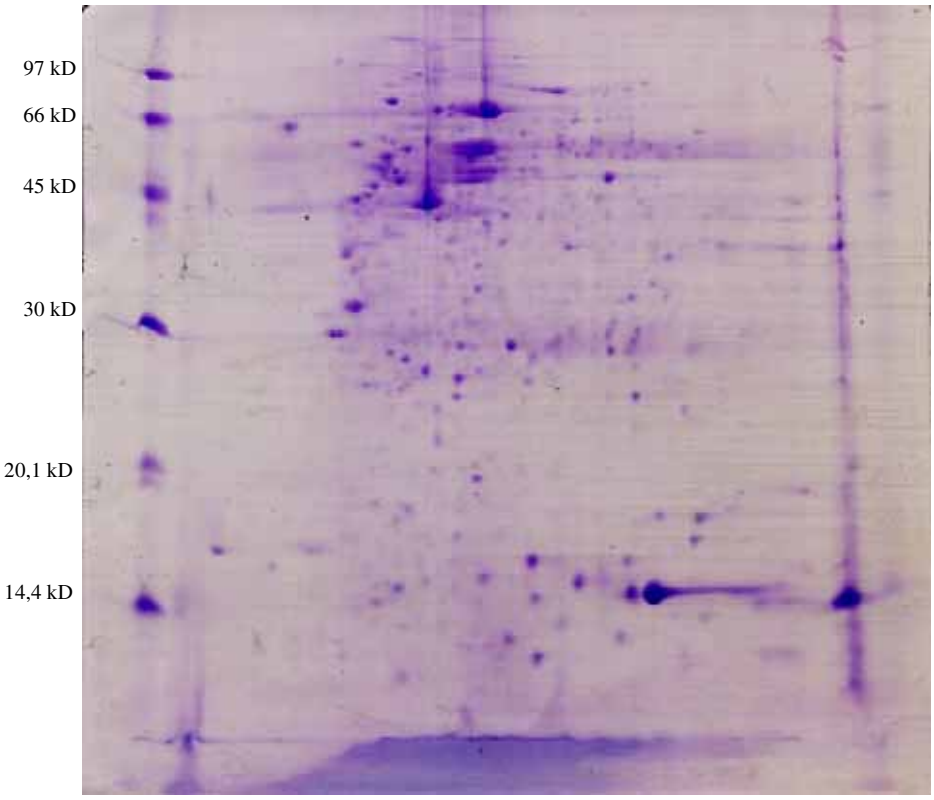



**Figura 12.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool A Tumor N+**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

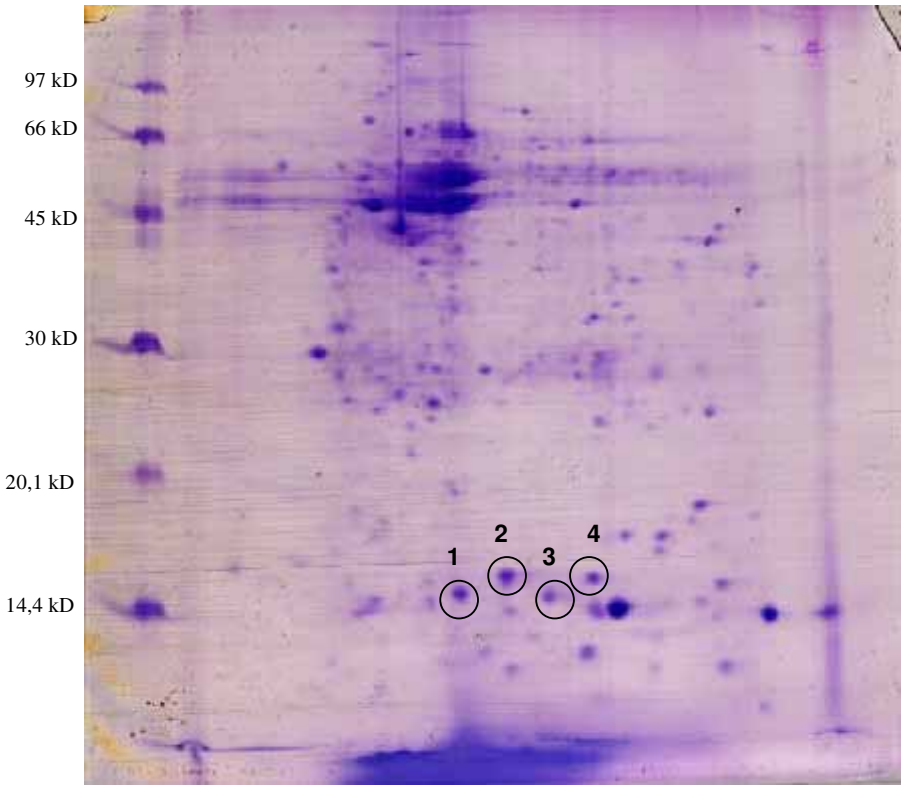



**a**

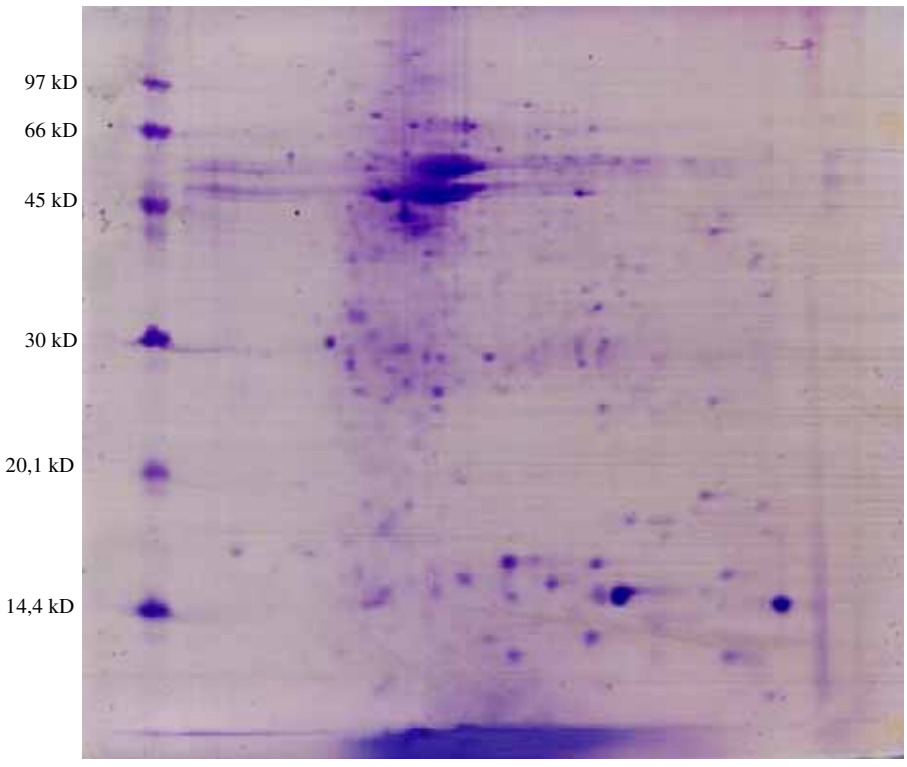



**b**

**Figura 13.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com c*oomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool B Tumor N+**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

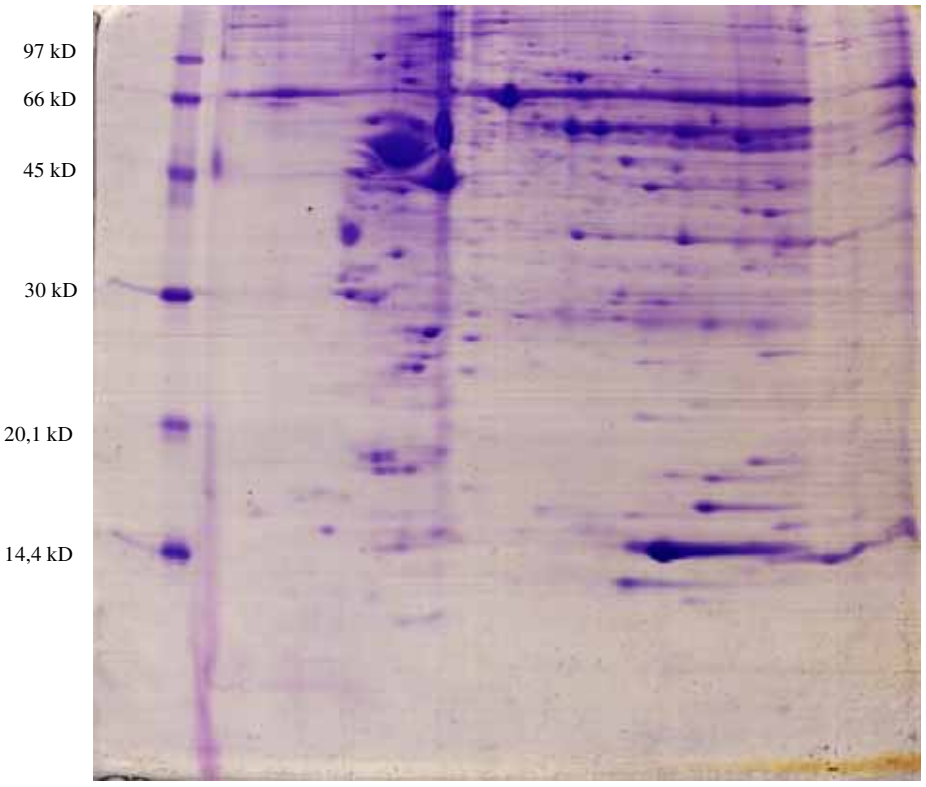



**a**

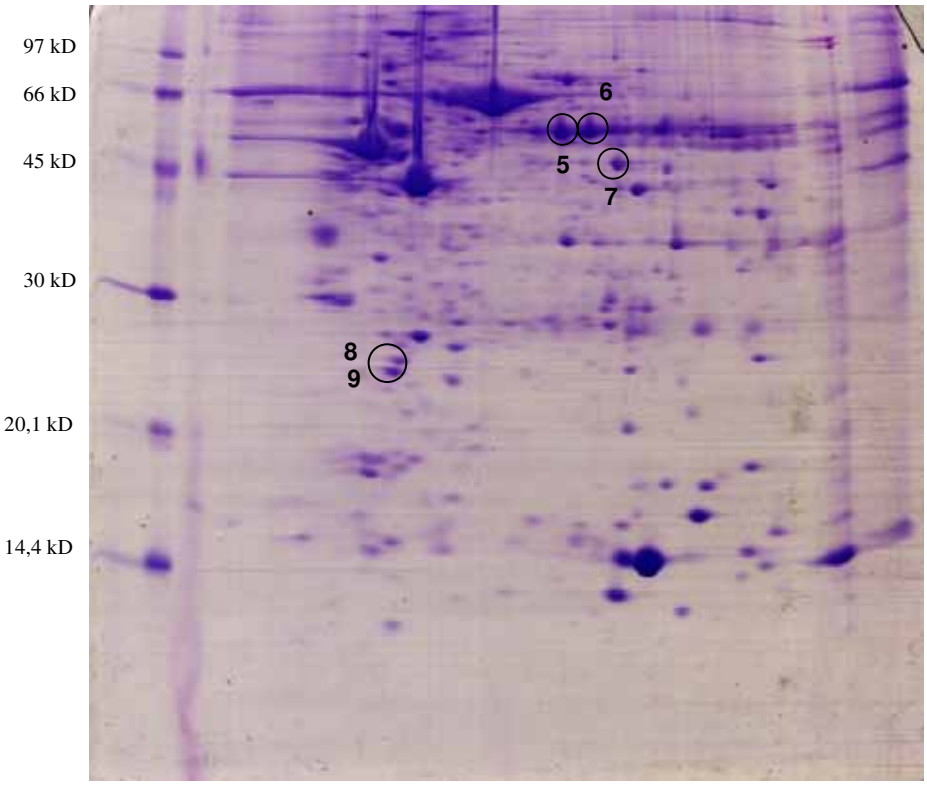



**b**

**Figura 14.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool E Tumor N0**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Em **(a)** estão assinalados os spots retirados para análise por espectrometria de massa.

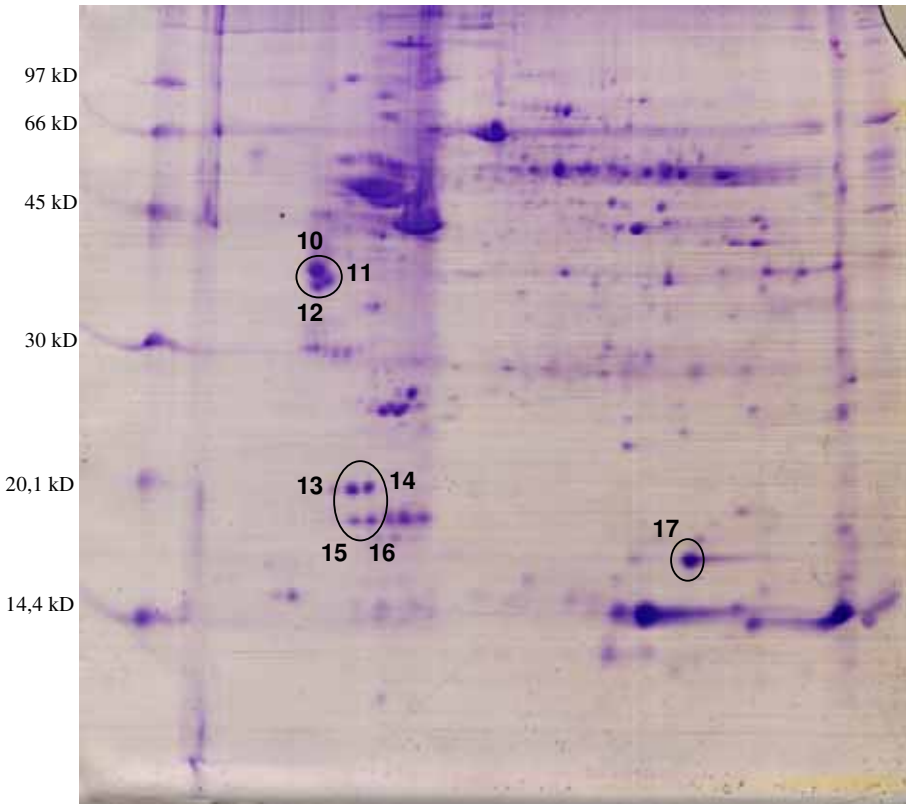



**a**

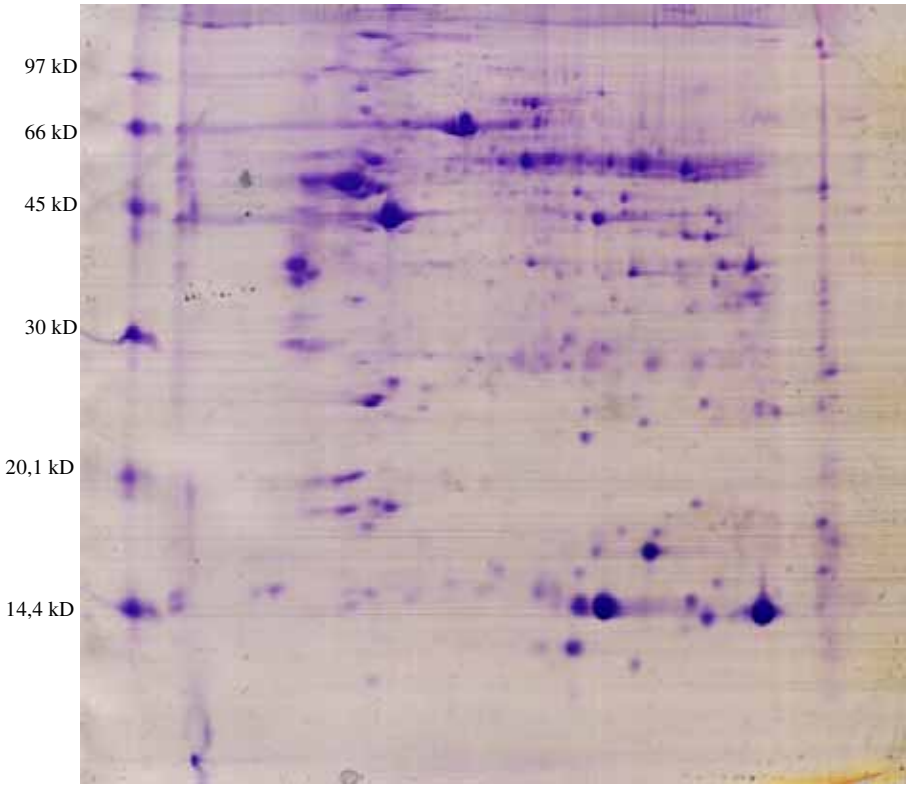



**b**

**Figura 15.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool C Margem N+**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Em **(b)** estão assinalados os spots retirados para análise por espectrometria de massa.




**a**




**b**

**Figura 16.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool D Margem N+**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Em **(a)** estão assinalados os spots retirados para análise por espectrometria de massa.

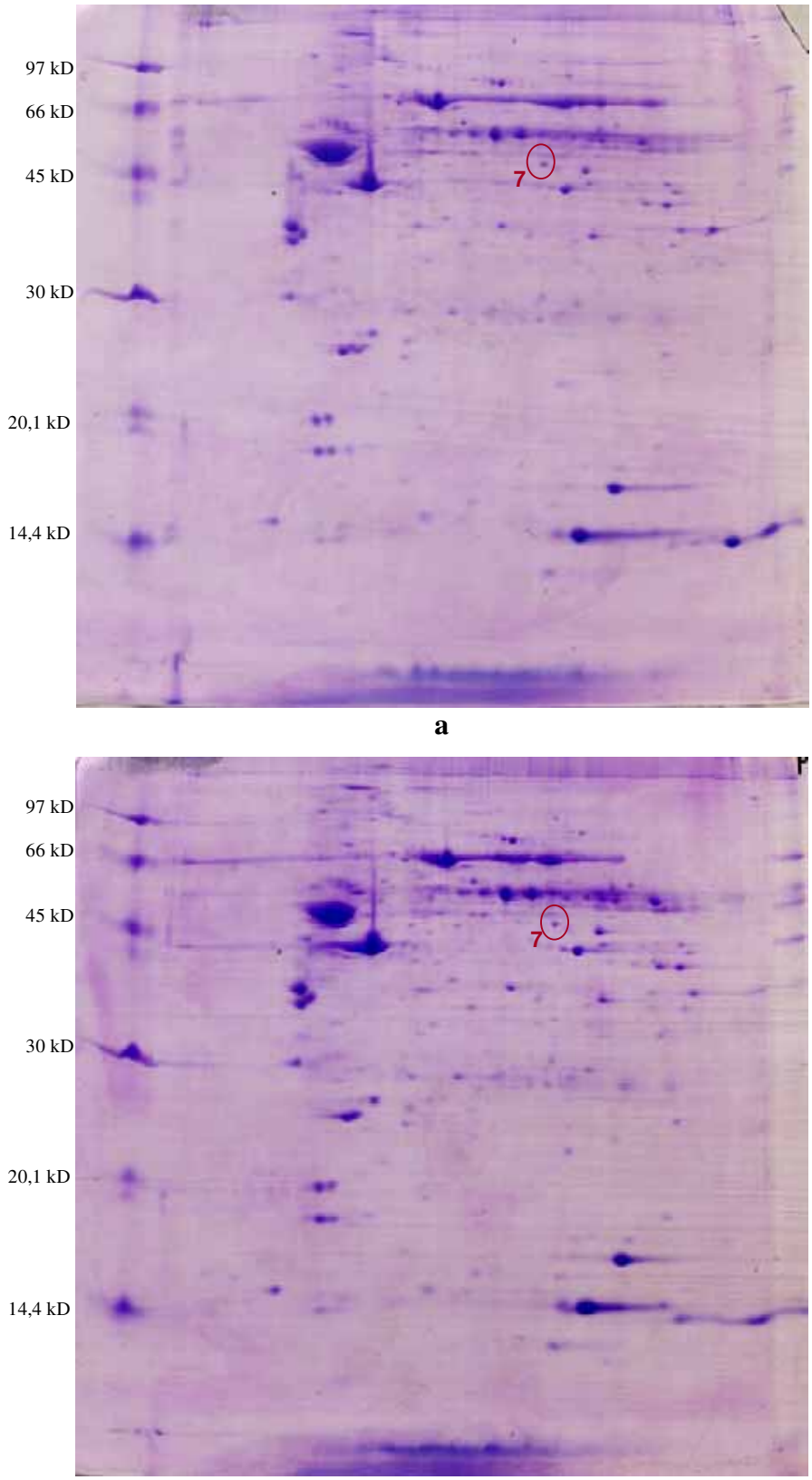
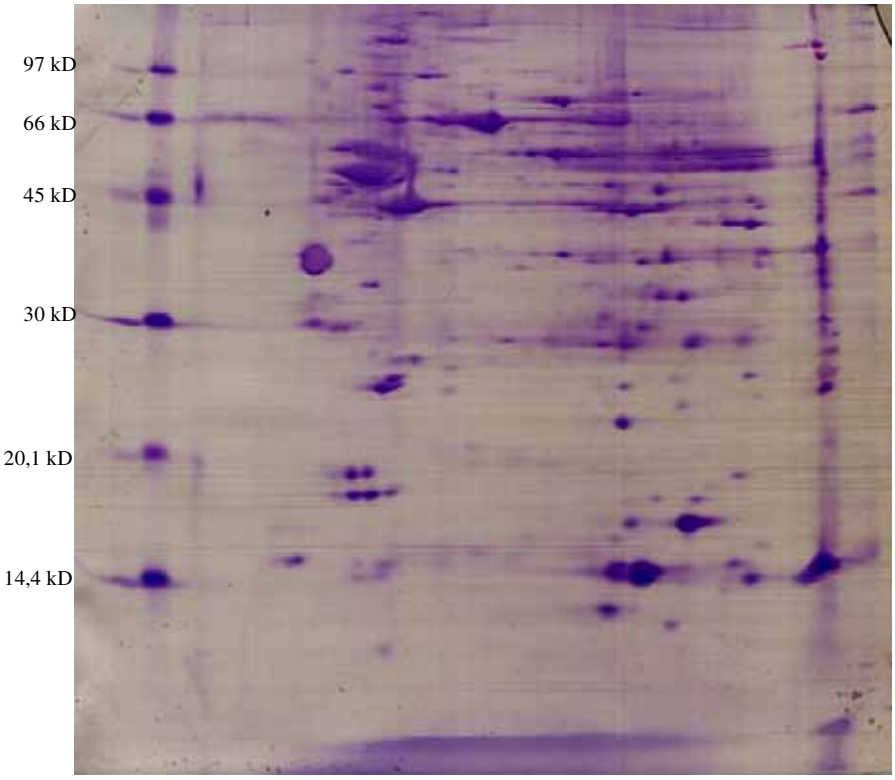
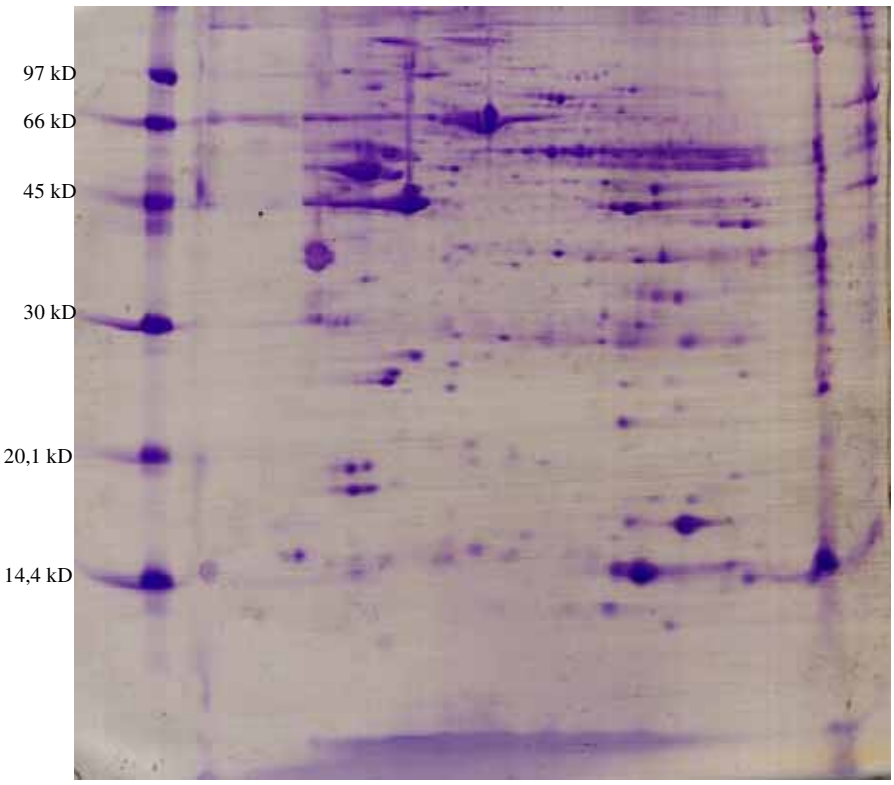



**Figura 17.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool F Margem N0**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). O spot 7 ou 114 **(Apêndice B)**, visivelmente expresso no pool F, revelou-se ausente nesse pool segundo a comparação pool C Margem N+ *versus* pool F Margem N0 **(Apêndice B)**, realizada pelo analisador de imagens *ImageMaster 2D Elite*.




**a**




**b**

**Figura 18.** Duplicatas de géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando a disposição dos spots protéicos de **pool G Margem NX**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

## 4.7. Acondicionamento dos géis SDS-PAGE 12,5 %

Apenas o protocolo 5 utilizado para acondicionamento de géis SDS-PAGE 12,5 % resultou em géis intactos e bem conservados. Em especial, a solução de metanol 10% foi considerada adequada e, deste modo, selecionada para o uso.

## 4.8. Análise de imagens dos géis 2D

Os géis, com spots mais nítidos e definidos, selecionados para participarem dos experimentos de análises pelo *software ImageMaster 2D Elite*, estão apresentados nas **Figuras 12a, 13a, 14b, 15b, 16a** e **17a**. Esses géis tiveram seus spots marcados manualmente e, em seguida, numerados pelo *software*. As quantidades de spots marcados nesses géis foram de 511, 482, 283, 330, 278 e 262, respectivamente **(Figuras 19 - 21)**. As médias de spots assinalados nos géis de pools de amostras tumorais e normais foram de 425 e 290, respectivamente. Os pontos isoelétricos (pI) e pesos moleculares (PM) de spots dispostos nos géis selecionados estão apresentados no **Apêndice A**.

As comparações realizadas entre os géis estão detalhadas no **Quadro 4**. As comparações ou sobreposições dos géis estão apresentadas nas **Figuras 22 - 25**. Em cada dupla de géis comparados, um deles foi tomado como referência (gel com maior número de spots), conforme referido no **Quadro 4**. Deve-se esclarecer que os spots assinalados com cor vermelha são do gel de referência e os marcados com cor preta são do outro gel participante da comparação. Os spots apenas contornados em vermelho ou preto (ligados entre si por linhas cor-de-rosa) são os correspondentes entre os dois géis, ou seja, são spots que apresentam os mesmos pontos isoelétricos (pI) e pesos moleculares (PM). Os spots inteiramente assinalados com cor vermelha ou preta não são correspondentes. Os resultados quanto à presença e à ausência (dados qualitativos) e à intensidade de expressão (dados

quantitativos) de cada spot dos géis participantes dos experimentos de comparação em relação ao spot correspondente do gel de referência estão apresentados no **Apêndice B**. Aos spots do gel de referência foi dado um mesmo valor padrão (por exemplo, 1.0) e os spots do outro gel participante da comparação apresentaram valores relativos (maiores, menores ou igual) a 1.0, conforme sua intensidade ou igual a 0 (-), caso ausentes.

O número absoluto e as porcentagens de spots protéicos equivalentes em cada comparação de géis estão citados no **Quadro 4**. Esses dados dão uma idéia qualitativa, mas não quantitativa, das diferenças e semelhanças obtidas. A maior semelhança foi observada entre o **pool A Tumor N+** e o **pool B Tumor N+** e as maiores diferenças entre o **pool A Tumor N+** e **pool E Tumor N0** ou **pool A Tumor N+** e **pool D Margem N+**.

Após a captura e análise de imagens dos géis e inspeção visual, 17 spots protéicos, destacados nas **Figuras 14a**, **15b** e **16a**, foram selecionados segundo critérios de presença, ausência e intensidade de expressão, para análise pelo espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF. A avaliação qualitativa visual desses 17 spots foi realizada nos pools A a F, como pode ser observada na **Tabela 14**. Tal avaliação nem sempre foi confirmada pelos dados obtidos por análise de imagens. Por exemplo, o spot 7 **(114, Apêndice B)**, visivelmente, expresso ou presente tanto no pool C Margem N+ **(Figura 15)** como no pool F Margem N0 **(Figura 17)**, revelou-se ausente no pool F segundo a comparação pool C Margem N+ *versus* pool F Margem N0 **(Apêndice B)**, realizada pelo analisador de imagens *ImageMaster 2D Elite*.

O gel do pool **G Margem NX (Figura 16a)** não foi incluído nas comparações porque não seguiu o critério adotado para a confecção de pools, ou seja, conter amostras de pacientes de um único tipo, com linfonodo comprometido por células neoplásicas ou não.

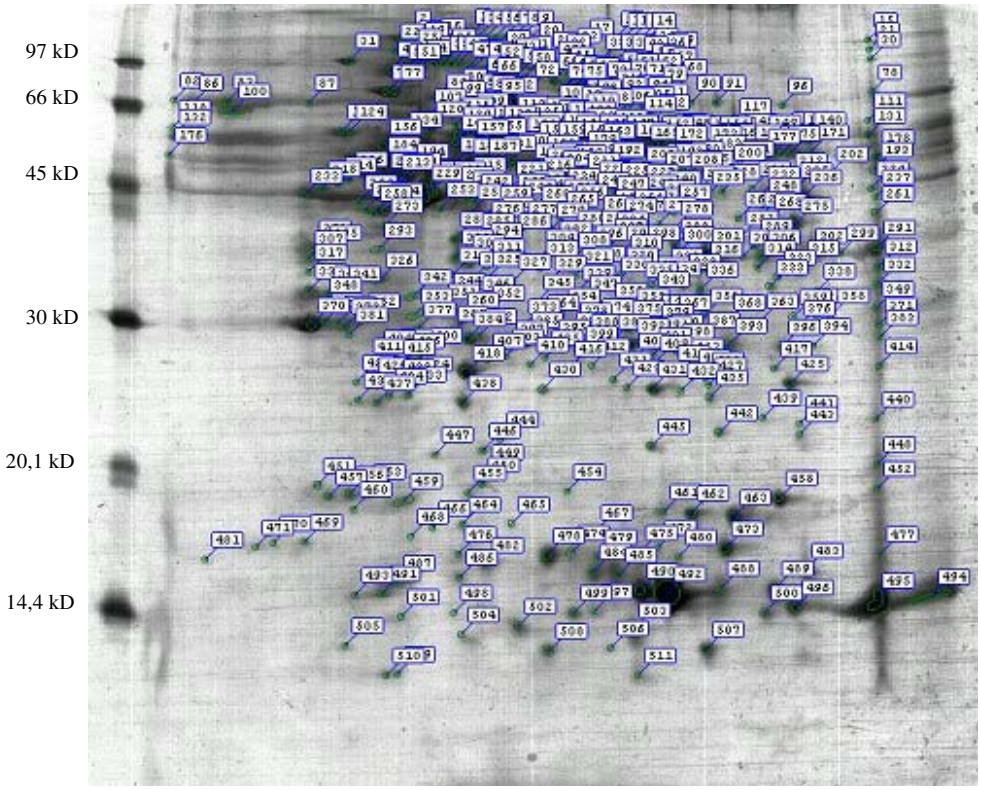
**Quadro 4.** Comparações realizadas entre géis SDS-PAGE de pools tumorais e de margens cirúrgicas, número e porcentagem de spots equivalentes.

| Comparações entre géis de pools | N/% |
|---|---|
| Pool **A Tumor N+** *versus* Pool B Tumor N+ | 267/52,2% |
| Pool **A Tumor N+** *versus* Pool E Tumor N0 | 176/34,4% |
| Pool **C Margem N+** *versus* Pool D Margem N+ | 146/44,2% |
| Pool **C Margem N+** *versus* Pool F Margem N0 | 138/41,8% |
| Pool **A Tumor N+** *versus* Pool C Margem N+ | 235/46% |
| Pool **A Tumor N+** *versus* Pool D Margem N+ | 186/36,4% |
| Pool **E Tumor N0** *versus* Pool F Margem N0 | 125/44,2% |

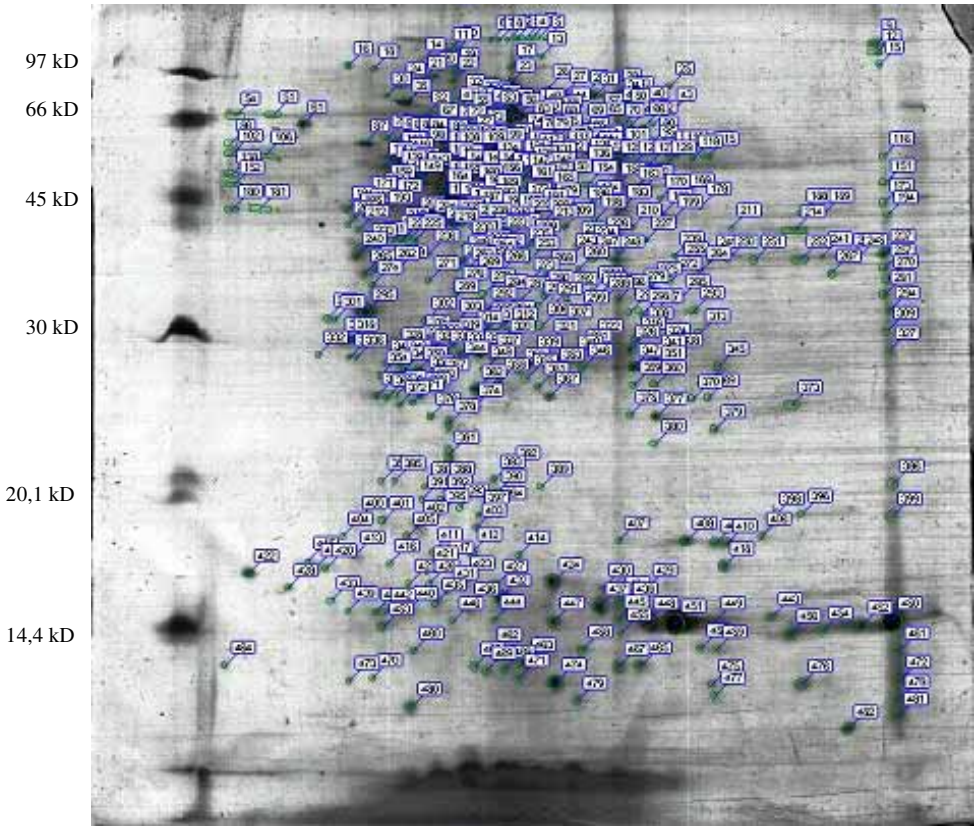
***O gel de referência está assinalado em negrito**

**Tabela 14.** Avaliação qualitativa visual dos 17 *spots* diferencialmente expressos nos pools A – F. +++, ++, +, + -: expressão elevada, média, baixa ou muito baixa, respectivamente. (-): ausência do spot.

| Spot | Tumor | | | Margem | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | E | C | D | F |
| 1 | + | + + + | + + + | + | + | + |
| 2 | + + | + + + | + + + | + | + | + |
| 3 | + + | + + + | + + + | + | + | + |
| 4 | + + | + | + + + | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + + + | + + + | + + + |
| 6 | + | + | + | + + + | + + | + + + |
| 7 | + + + | + + + | + + + | + + | + | + - |
| 8 | + - | + - | + | + + | + + | + + |
| 9 | + - | + - | - | + + + | + + + | + + + |
| 10 | + + | - | - | + + + | + + + | + + + |
| 11 | + + | - | - | + + + | + + + | + + + |
| 12 | + + | - | - | + + + | + + + | + + + |
| 13 | + | - | - | - | + + + | + + + |
| 14 | + | - | - | - | + + + | + + + |
| 15 | - | - | - | + + | + + | + + |
| 16 | - | - | - | + + | + + | + + |
| 17 | + | + - | + - | + + | + + + | + + + |




**a**




**b**

**Figura 19.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando spots protéicos, numerados pelo *software ImageMaster 2D Elite*, provenientes dos pools **(a) A Tumor N+** e **(b) B Tumor N+**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

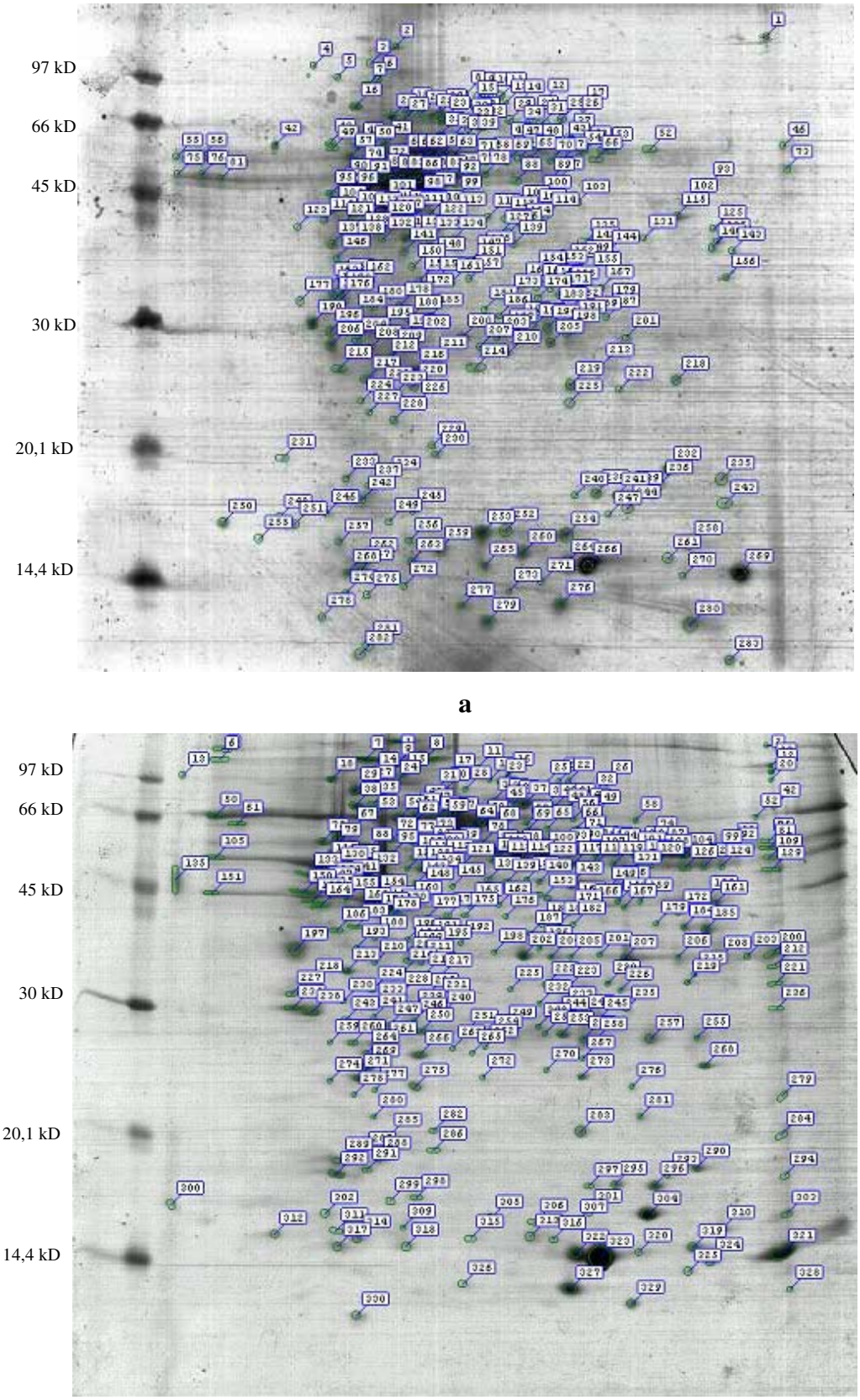
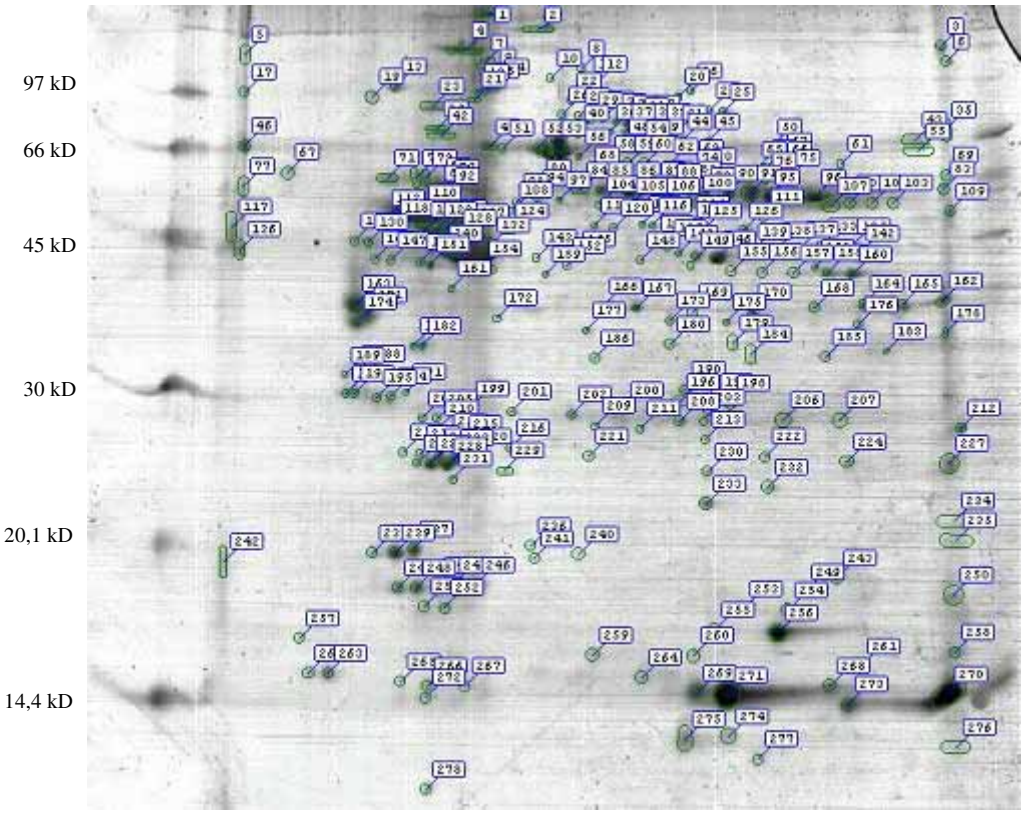
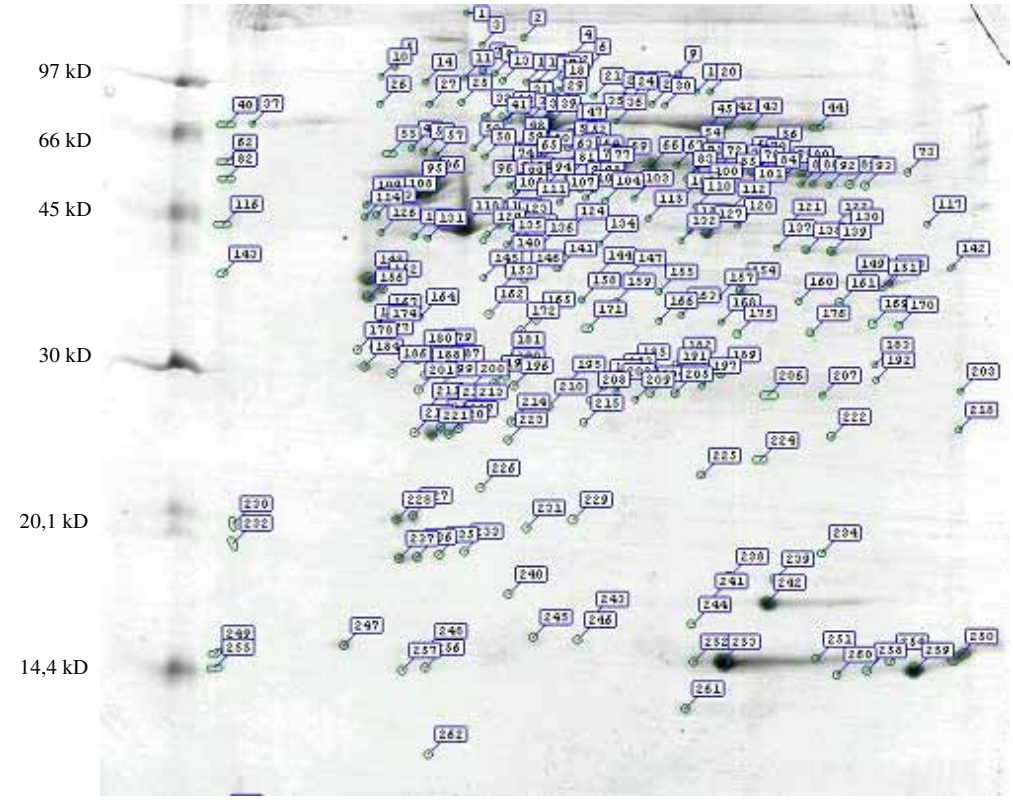



**Figura 20.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando spots protéicos, numerados pelo *software ImageMaster 2D Elite*, provenientes dos pools **(a) E Tumor N0** e **(b) C Margem N+**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).




**a**




**b**

**Figura 21.** Géis de SDS-poliacrilamida 12,5%, corados com *coomassie*, mostrando spots protéicos dos pools **(a) D Margem N+** e **(b) F Margem N0**. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD).

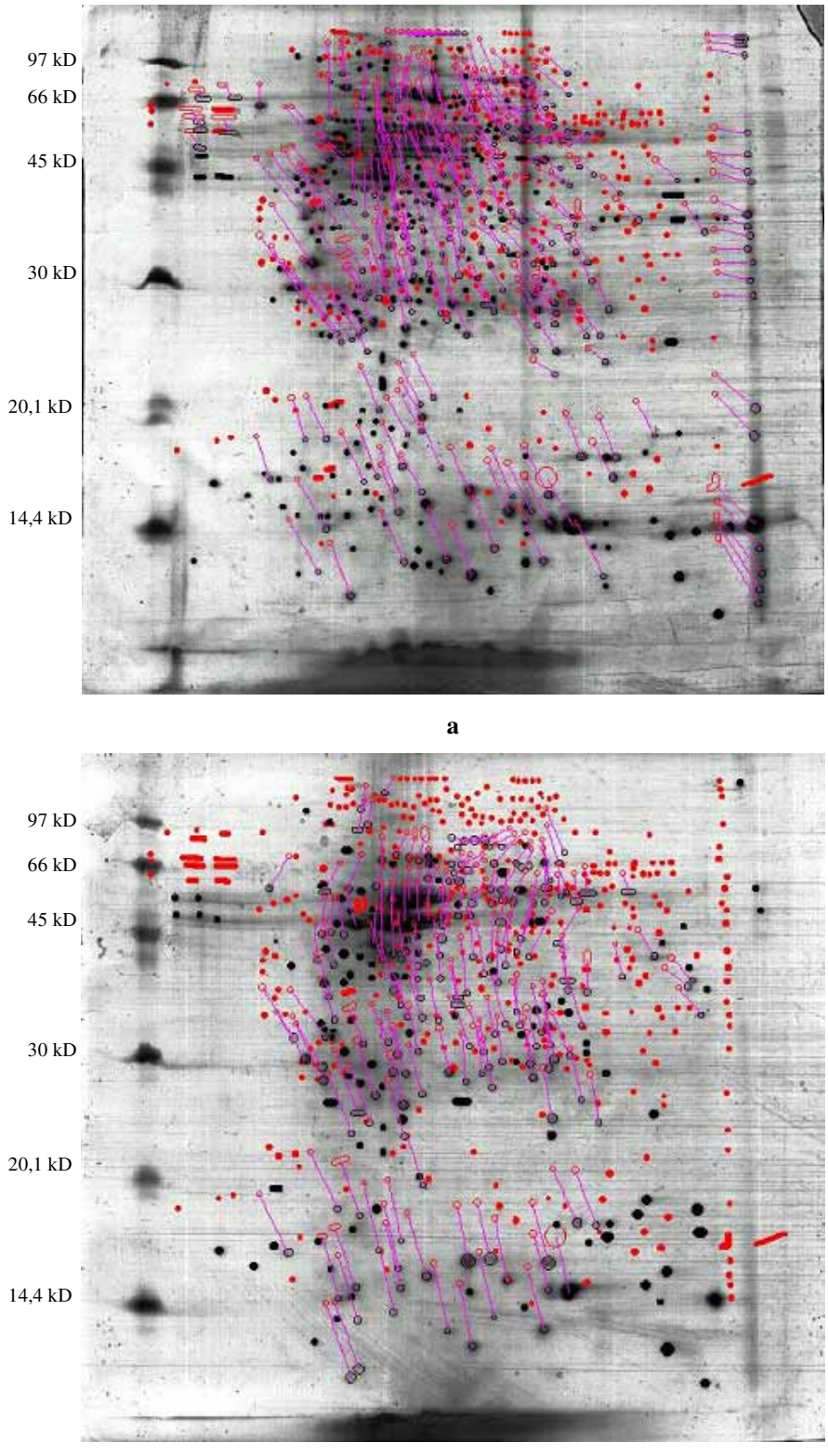
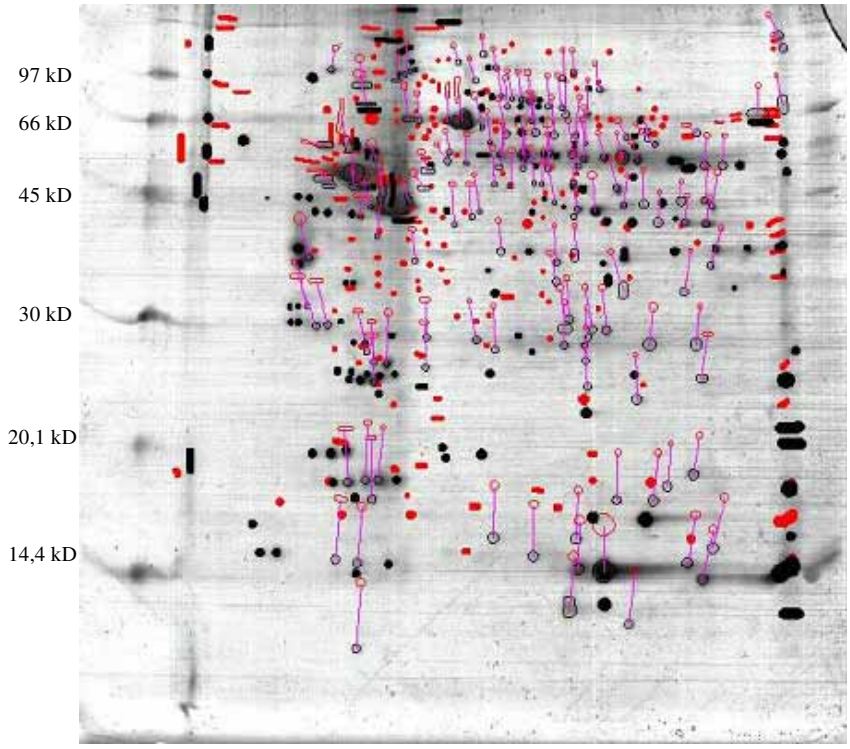
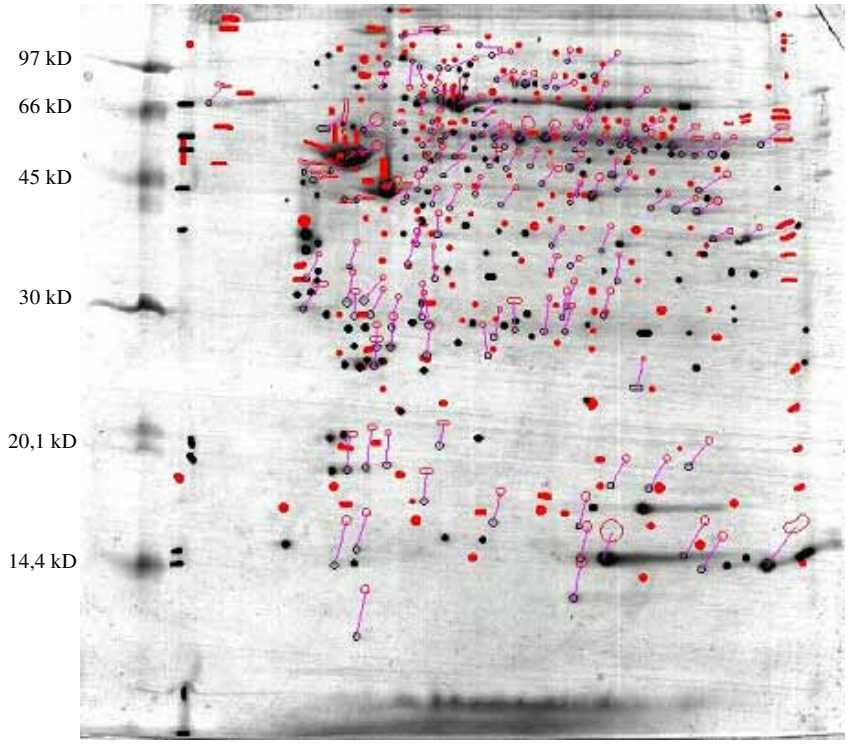



**Figura 22.** Representação de comparação entre géis de SDS-poliacrilamida 12,5% dos pools: **(a) A Tumor N+** *versus* B Tumor N+ e **(b) A Tumor N+** *versus* E Tumor N0. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Os spots assinalados com cor vermelha são do gel de referência **(negrito)** e os marcados com cor preta são do outro gel participante da comparação; os spots apenas contornados em vermelho ou preto (ligados entre si por linhas cor-de-rosa) são os correspondentes entre os dois géis (mesmos pontos isoelétricos e pesos moleculares); os spots inteiramente assinalados com cor vermelha ou preta não são correspondentes.

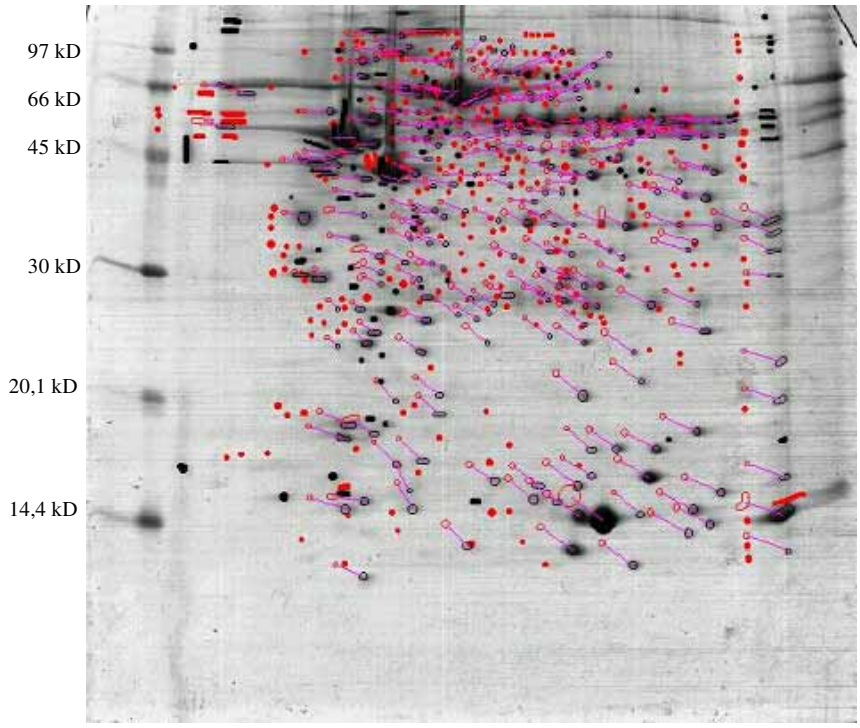



**a**

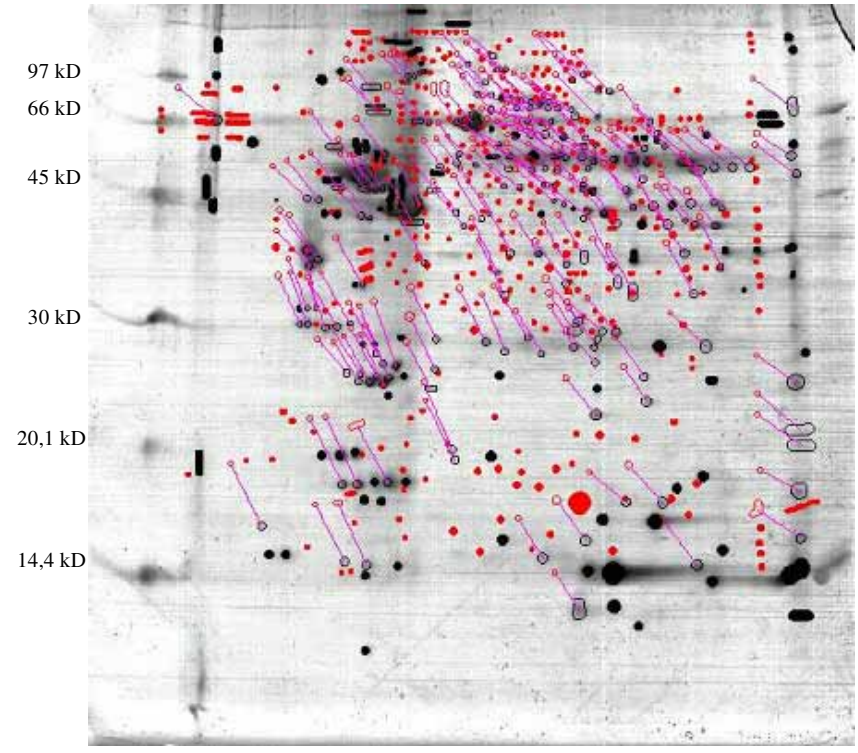



**b**

**Figura 23.** Representação de comparação entre géis de SDS-poliacrilamida 12,5% dos pools: **(a) C Margem N+** *versus* D Margem N+ e **(b) C Margem N+** *versus* F Margem N0. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Os spots assinalados com cor vermelha são do gel de referência **(negrito)** e os marcados com cor preta são do outro gel participante da comparação; os spots apenas contornados em vermelho ou preto (ligados entre si por linhas cor-de-rosa) são os correspondentes entre os dois géis (mesmos pontos isoelétricos e pesos moleculares); os spots inteiramente assinalados com cor vermelha ou preta não são correspondentes.




**a**




**b**

**Figura 24.** Representação de comparação entre géis de SDS-poliacrilamida 12,5% dos pools: **(a) A Tumor N+** *versus* C Margem N+ e **(b) A Tumor N+** *versus* D Margem N+. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Os spots assinalados com cor vermelha são do gel de referência **(negrito)** e os marcados com cor preta são do outro gel participante da comparação; os spots apenas contornados em vermelho ou preto (ligados entre si por linhas cor-de-rosa) são os correspondentes entre os dois géis (mesmos pontos isoelétricos e pesos moleculares); os spots inteiramente assinalados com cor vermelha ou preta não são correspondentes.

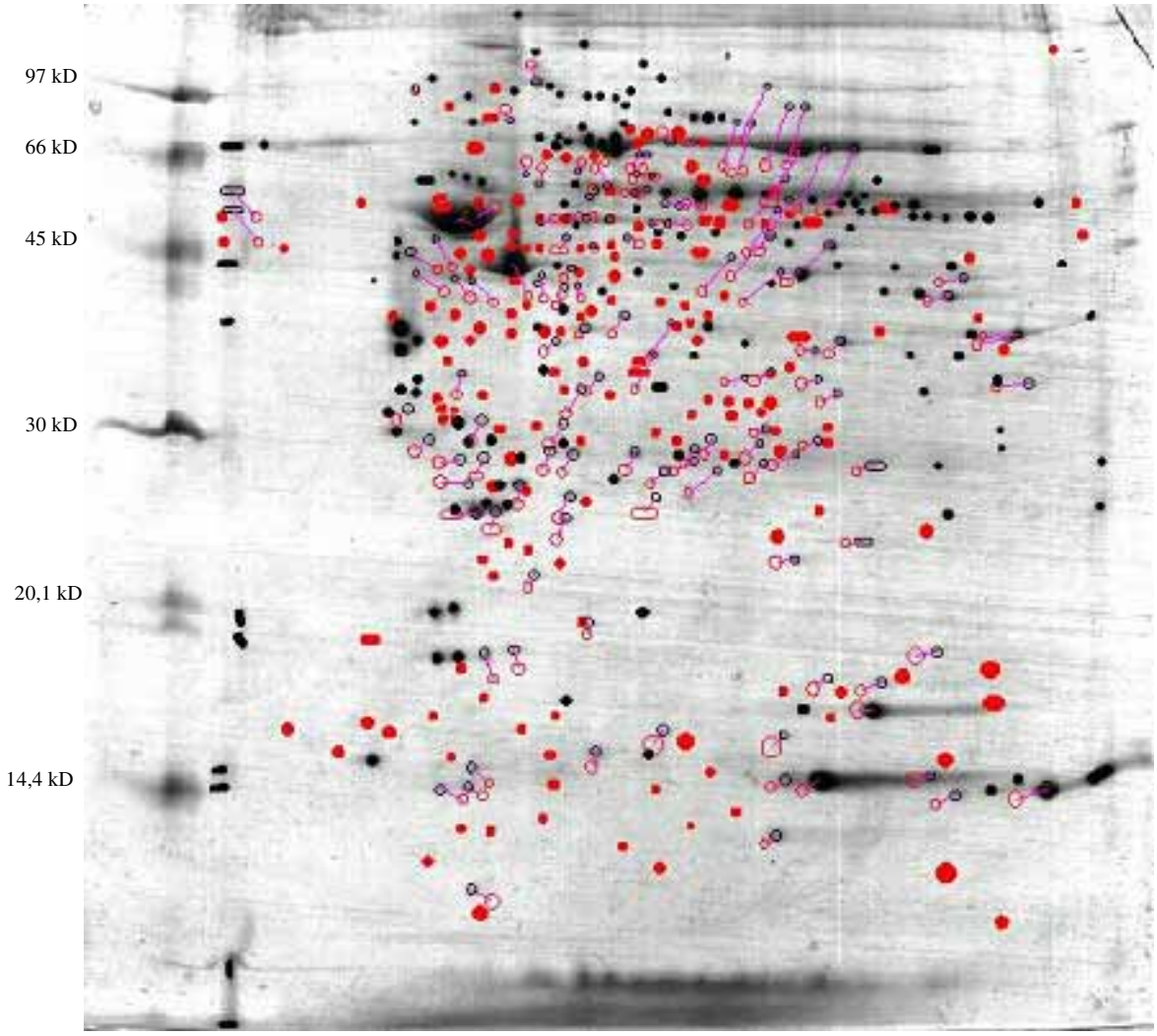



**Figura 25.** Representação de comparações entre géis de SDS-poliacrilamida 12,5% dos pools: **E Tumor N0** *versus* F Margem N0. M = marcador de peso molecular *LMW Calibration* (kD). Os spots assinalados com cor vermelha são do gel de referência **(negrito)** e os marcados com cor preta são do outro gel participante da comparação; os spots apenas contornados em vermelho ou preto (ligados entre si por linhas cor-de-rosa) são os correspondentes entre os dois géis (mesmos pontos isoelétricos e pesos moleculares); os spots inteiramente assinalados com cor vermelha ou preta não são correspondentes.

## 4.9. Espectrometria de massa

Entre os 17 spots analisados por espectrometria de massa, oito foram conclusivos com relação à identificação de proteínas (banco de dados *MASCOT*), que estão apresentadas na **Tabela 15**. São eles: 1, 3, 4 (Pool E), 7, 9 (Pool C), 10, 15 e 17 (Pool D). Quatro proteínas (calgranulina B, albumina, galectina-7, alfa enolase) mostraram expressão elevada e quatro (cadeia leve 1 da miosina, cadeia leve 2 da miosina, cadeia beta da tropomiosina, mioglobina) mostraram expressão reduzida nos carcinomas. Os processos biológicos e as categorias funcionais aos quais estão associadas foram obtidos de dados públicos presentes nos sites:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/LocusLink/ (*LocusLinK*);
- http://cgap.nci.nih.gov/ (*The Cancer Genome Anatomy Project*).

**Tabela 15.** Dados (es*core*, cobertura, massa molecular, ponto isoelétrico ou pI, nome, GI, localização do gene, processos biológicos e categoria funcional) sobre as proteínas identificadas após análise por espectrometria de massa (MALDI TOF/TOF) e pesquisa no banco de dados *MASCOT*, *LocusLink* e *CGAP*. Os spots assinalados em vermelho representam proteínas mais expressas no tecido tumoral e os spots assinalados em azul representam proteínas com expressão maior no tecido normal. *Escore*: índice de identidade ou homologia de um peptídeo em relação a uma seqüência protéica conhecida.

| Spot | *escore* | Cobertura (%) | Massa (kDa) | pI | Proteína | GI | Localização do gene | Processos biológicos | Categoria funcional |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 156 | 25 | 13,291 | 5,71 | calgranulina B | gi\|87005\|pir\|\|B31848 | 1q21 | Sinalização célula-célula; Morte celular | Sinalização célula-célula; Morte celular |
| **3** | 80 | 4 | 71,317 | 5,92 | albumina alfa-fetoproteina | gi\|2144898\|pir\|\|ABHUS | 4q11-q13 | Regulação negativa de morte celular programada não apoptótica; Transporte; Osmorregulação de fluídos corporais | Morte celular; Transporte; Homeostase |
| **4** | 258 | 37 | 14,692 | 7,52 | galectina 7 | gi\|4504985\|ref\|NP_002298.1\| | 19q13.2 | Apoptose; Crescimento celular e/ou manutenção; Adesão celular | Apoptose; Crescimento celular e/ou manutenção; Adesão celular |
| **7** | 138 | 10 | 47,35 | 6,99 | alfa enolase | gi\|119339\|sp\|P06733\|ENOA_HUMAN | 1p36.3-p36.2 | Regulação negativa do crescimento celular; Regulação de transcrição; Glicólise | Crescimento celular e manutenção; Regulação de transcrição; Metabolismo de monossacarídeos |
| **9** | 93 | 20 | 21,058 | 4,97 | miosina, cadeia leve 1 | gi\|127128\|sp\|P05976\|MLE1_HUMAN | 2q33-q34 | Desenvolvimento muscular | Morfogênese |
| **10** | 86 | 7 | 32,945 | 4,66 | tropomiosina 2 (beta) | gi\|88932\|pir\|\|S00922 | 9p13.2-p13.1 | Desenvolvimento muscular | Morfogênese |
| **15** | 83 | 26 | 19,102 | 4,89 | HUMMLC2B, miosina cadeia leve 2 | gi\|48146043\|emb\|CAG33244.1\| | 16p11.2 | Componente estrutural do músculo | Estrutura celular |
| **17** | 182<br>182 | 18<br>18 | 17,099<br>17,230 | 7,29<br>7,14 | mioglobina<br>mioglobina | gi\|127661\|sp\|P02144\|MYG_HUMAN<br>gi\|2144731\|pir\|\|MYHU | 22q13.1 | Desenvolvimento muscular; Transporte de oxigênio | Morfogênese; Transporte |

## 5. Discussão

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é uma doença maligna epitelial que se origina na mucosa do trato aerodigestivo superior (cavidade oral, laringe, orofaringe e hipofaringe). A ocorrência de lesões primárias múltiplas no mesmo paciente não é rara e está de acordo com a hipótese de cancerização de campo proposta por Slaughter, et al. (1953), segundo a qual a exposição prolongada do epitélio a agentes carcinogênicos pode induzir alterações celulares em vários pontos da mucosa, com formação de tumores múltiplos. Esses tumores primários originam-se principalmente no esôfago, pulmão e outras regiões do trato aerodigestivo superior (dados revistos por Nagai, 1999).

O risco relativo de desenvolvimento de câncer em indivíduos expostos a compostos carcinogênicos varia de pessoa para pessoa, dependendo em parte de componentes genéticos relacionados com a susceptibilidade ao câncer. No caso dos tumores de cabeça e pescoço, muitos dados já foram obtidos demonstrando que a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor participam do desenvolvimento da doença. Por exemplo, são observadas mutação e expressão elevada de *ras*, expressão elevada de ciclina D1 (*PRAD-1*), *myc*, *EGFR* e *TGFβ*, perda de heterozigosidade em 1p, 1q, 3p, 4q, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q, 14q, 17p e 18q e inativação de genes supressores de tumor, tais como o *TP53* e *CDKN2A*. Além disso, existem evidências do envolvimento de polimorfismos em genes codificadores de enzimas de destoxificação de drogas, como os da família do citocromo P450 e da glutationa S-transferase (Nagai, 1999) e do papiloma vírus humano (HPV) (Hafkamp et al., 2004).

Várias abordagens para análise das diferenças entre células normais e tumorais estão disponíveis incluindo aquelas que avaliam alterações no DNA, no transcrito ou na proteína.

No presente trabalho, foram investigados marcadores protéicos de diagnóstico e prognóstico do câncer de cabeça e pescoço com técnicas de proteômica.

Foram estudadas 18 amostras de carcinomas de células escamosas orais ou de orofaringe e suas margens cirúrgicas, 13 procedentes de indivíduos do sexo masculino (72,2%) e 5 do sexo feminino (27,8%). Embora o grupo seja pequeno, as freqüências obtidas refletem aquelas observadas no Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, SP (Carvalho et al, 2004) e divulgadas pelo Ministério da Saúde (2003) para o câncer oral no Brasil, que atingem valores de 79% e 73% no sexo masculino e 21% e 27% no feminino, respectivamente. A maioria dos pacientes referiu exposição ao tabaco e ao álcool, e 77,8% dos pacientes eram caucasóides com idade inferior a 58,3 anos. A região mais atingida foi a cavidade oral, o que está de acordo com a tendência mundial em relação a essa doença (Parkin et al., 2001). As amostras estudadas foram geralmente classificadas como T4N1-3M0, indicando que os pacientes procuraram o hospital em estágios avançados da doença.

Para avaliação do perfil protéico, as proteínas foram extraídas com diferentes soluções. Os extratos obtidos com o kit *ReadyPrep Sequential Extraction* apresentaram baixas concentrações protéicas segundo o Método de Bradford. De forma geral, os géis resultantes desses extratos exibiram pequeno número de spots. Esse fato pode ser decorrente do grande número de passos realizados durante a solubilização, levando a perdas significativas de material.

A extração com solução de SDS também resultou em concentrações baixas de proteínas, gel com poucos spots e qualidade insatisfatória. A utilização de detergentes iônicos, como o SDS, pode interferir na focalização isoelétrica, pois formam com as proteínas complexos negativamente carregados. Além disso, o aquecimento da amostra contendo uréia ou tiouréia, durante a solubilização com SDS, promove a carbamilação das proteínas, o que também resulta na mudança de seus pontos isoelétricos (Berkelman & Stenstedt, 2002). Por

esse motivo, o SDS deve ser utilizado na presença de detergentes não-iônicos ou zwiteriônicos (CHAPS, Triton X-100, NP-40) ou em baixas concentrações, tais como 0,25% ou menos (Ames & Nikaido, 1976; Harder et al., 1999). No caso das amostras estudadas, além dos problemas relacionados com o uso do SDS em si, um fator importante nas baixas concentrações de proteínas obtidas foi provavelmente o fato do SDS ser aplicado a soluções que já continham poucas proteínas, em decorrência da extração prévia com reagentes do kit.

No presente trabalho, foram testados seis tampões de extração de proteínas selecionados da literatura que diferiram em um ou mais componentes, como detergentes, agentes desnaturantes e redutores. Diferentes condições para a focalização isoelétrica, eletroforese em gel SDS-PAGE e estocagem de géis também foram testadas.

Os agentes desnaturantes, como a uréia e a tiouréia, quebram as pontes de hidrogênio das proteínas levando ao seu desenrolamento. A tiouréia foi introduzida por Rabilloud et al. (1997), em combinação com a uréia, para aumentar a solubilidade de proteínas, principalmente as de membrana. Segundo os autores, o uso desse componente inibe a adsorção de proteínas à matriz do gel, quando a IEF é conduzida em gradiente de pH imobilizado. A tiouréia também inibe a proteólise, contribuindo para a detecção de um maior número de spots em géis 2D (Castellanos-Serra & Paz-Lago, 2002). Esse agente desnaturante é pouco solúvel em água e requer altas concentrações de uréia para aumentar a sua solubilidade. Neste estudo, a mistura de uréia e tiouréia mostrou melhores resultados, com maior solubilidade protéica, quando comparada à solução contendo apenas a uréia como agente desnaturante.

Os detergentes adicionados aos tampões de extração auxiliam a solubilidade das proteínas e podem ser iônicos (SDS), zwiteriônicos (CHAPS, SB 3-10 e ASB-14) ou não-iônicos (NP-40, Triton X-100). Entre os detergentes zwiteriônicos, a sulfobetaína CHAPS, na presença de altas concentrações de uréia, é o mais utilizado (Görg & Weiss, 1999; Herbert,

1999). Os detergentes com longas cadeias lineares, como o SB 3-10 e o ASB-14, apresentam maior habilidade para solubilizar proteínas de membranas. Entretanto, o SB 3-10 é pouco solúvel em altas concentrações de uréia (Di Ciero et al., in *press*; Herbert, 1999). O ASB-14, ao contrário, é compatível com altas concentrações de uréia, mas resulta em muitos rastros horizontais (Carboni et al, 2002). Realmente, as amostras do presente trabalho extraídas com as soluções contendo ASB-14 geraram géis com muitos rastros.

Os agentes redutores, como o TBP (não carregado), o DTT, o DTE e o 2-mercaptoetanol (com grupos tiol livres), são comumente adicionados aos tampões de extração para quebrar pontes de dissulfeto. Quando são utilizados reagentes contendo tiol livre, o equilíbrio das fitas de IPG requer, além da redução, um passo de alquilação, que é realizado pela iodoacetamida e auxilia na diminuição de rastros e melhora a resolução do gel. O uso do TBP torna desnecessário o passo de alquilação. Esse composto, ao contrário do DTT, é neutro e não migra durante a focalização isoelétrica, mantendo as condições redutoras durante todo esse processo. Entretanto, possui outros inconvenientes, como baixa solubilidade, instabilidade e toxicidade (Rabilloud, 1996; Molloy et al., 1998; Herbert et al., 1998; Berkelman & Stenstedt, 2002). No presente estudo, a resolução de proteínas nos géis 2D foi significativamente melhor quando utilizado o DTT.

Os tampões de solubilização também contêm anfólitos carreadores, que minimizam a agregação de proteínas favorecendo sua solubilidade e produzem uma condutividade relativamente uniforme através do gradiente de pH (Garfin, 2003). Também podem conter compostos que aumentam o pH, como Tris base, quando condições básicas são necessárias para solubilização ou redução de proteólise (Rabilloud, 1996).

Os dois tampões testados mais efetivos para a solubilização protéica apresentavam composições similares quanto a detergentes, agentes redutores e anfólitos carreadores. As diferenças referiram-se aos componentes Tris base e tiouréia. A adição de tiouréia parece ter

resultado em spots protéicos mais nítidos e em maior número, confirmando os dados de Castellanos-Serra & Paz-Lago (2002) e Giavalisco et al. (2003).

As condições eletroforéticas mais adequadas para muitas amostras foram aquelas com acúmulo de 16.500 Vhrs a 26.500 Vhrs durante a focalização isoelétrica e uso de concentração dobrada de DTT na solução de reidratação da fita e de concentração dobrada de tampão SDS no reservatório catódico, na segunda dimensão. Em especial, essa última condição diminuiu os rastros no gel, que são geralmente causados por depleção do SDS do tampão durante a eletroforese (Hoving et al., 2002; Werner, 2003).

Um outro fator muito importante na qualidade do gel foi a quantidade de proteína utilizada. Realmente, a massa protéica aplicada na focalização isoelétrica de 500 μg resultou em maior número de spots em relação aos géis com 170 μg e 250 μg de proteínas.

A preservação dos géis foi fundamental para o presente estudo porque sua análise em espectrômetro de massa foi realizada em outro laboratório distante cerca de 300 Km. Por esse motivo, foram testados alguns protocolos cujos resultados mostraram que géis acomodados em sacos plásticos selados com solução de glicerol mantiveram-se intactos, sem fissuras ou rachaduras, mesmo após meses, ao contrário dos demais protocolos. Essas condições não interferiram na excisão e análise de spots, realizada semanas ou meses após a confecção dos géis (Trovó et al.: trabalho submetido para publicação na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* e apresentado no **Apêndice C**).

O número de spots equivalentes obtido após análise de imagens mostrou um resultado esperado na comparação de géis, ou seja, que os tumores provenientes de pacientes com linfonodos comprometidos são mais semelhantes entre si em relação aos tumores de pacientes sem metástases regionais ou em relação às margens cirúrgicas.

Um achado inesperado foi a aparente discrepância de resultados do pool A de tumores em relação aos outros pools de tumores no caso dos spots 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e

17. Seus dados foram mais próximos daqueles obtidos para tecidos normais. Algumas explicações podem ser dadas para esses achados. Uma delas seria que, na composição do pool A, foram utilizadas amostras de estágios precoces da doença, o que aparentemente não é verdade. Os quatro tumores desse conjunto foram classificados como T3 ou T4, N1 ou N2, da mesma forma que no pool B, embora falsos positivos e negativos possam ocorrer na análise patológica. A microdissecção também restringiu a contaminação do espécime por células normais. Como as discrepâncias foram observadas para a grande maioria dos spots, uma avaliação mais detalhada desse conjunto por outras técnicas seria aconselhável. Entretanto, os achados do pool A não impediram que alguns marcadores potenciais fossem selecionados, com identificação apoiada por dados da literatura. A análise de imagens por software específico mostrou menor poder de discriminação de géis que a análise visual, provavelmente em conseqüência da dificuldade de superposição de imagens obtidas a partir de géis de experimentos distintos. Recentemente, uma modificação metodológica da eletroforese 2D (*differential in-gel electrophoresis*-DIGE) introduziu a marcação de amostras de interesse com diferentes corantes fluorescentes (Fels et al., 2003). Esse novo método aponta as variações entre dois tipos celulares em um único gel, evitando a superposição de imagens.

Os resultados de espectrometria de massa de oito spots selecionados em géis 2D obtidos de amostras tumorais e margens cirúrgicas revelaram alguns dados interessantes. As proteínas com expressão elevada nos tecidos tumorais identificadas no presente trabalho incluíram calgranulina B, albumina, galectina-7 e alfa enolase, algumas das quais já foram citadas por outros autores (He et al., 2004; Melle et al., 2004; Chen et al., 2004; Shen et al., 2004) como tendo maior expressão em células neoplásicas em relação às normais.

A calgranulina B é um membro da família S100 ligadora de cálcio que está presente principalmente em granulócitos. Sua função biológica inclui a inibição da quinase da caseína II, o que resulta na regulação de transcrição e tradução e na atividade citotóxica contra

bactérias, fungos e células tumorais (Hessian et al, 1993; Kerkhoff et al., 1998). Melle et al. (2004) e He et al. (2004) também observaram expressão elevada de calgranulina B em tumores de cabeça e pescoço. Entretanto, uma expressão reduzida ou ausente de calgranulina B já foi relatada em carcinoma de células escamosas de esôfago (Kong et al., 2004). O mesmo foi observado por Fung et al. (2000) em análises imuno-histoquímicas de carcinomas de nasofaringe.

A albumina, também presente nos tecidos neoplásicos em maior quantidade que nos normais, deve refletir o elevado fluxo sanguíneo para a região do tumor, considerando que essa proteína domina o perfil de linfa e sangue (Leak et al., 2004).

A galectina 7 foi outra proteína identificada com expressão elevada nos carcinomas estudados. Essa proteína está envolvida em regulação de apoptose, crescimento, diferenciação e adesão celular e possui distribuição aparentemente restrita a epitélio escamoso estratificado e ao corpúsculo Hassal do timo (Kuwabara et al., 2002; Rorive et al., 2002; Moisan et al., 2003; Yang & Liu, 2003). A galectina 7 já foi detectada com expressão elevada em carcinoma oral (Chen et al., 2004), de mama (Lu et al., 1997), bexiga (Ostergaard et al., 1997) e em linfomas (Moisan et al., 2003). Um outro membro dessa família, a galectina 1, também apresentou expressão elevada em carcinoma de células escamosas de língua (He et al., 2004). É possível, portanto, que essa família de proteínas e seus ligantes desempenhem um papel crucial na progressão tumoral (Grassadonia et al., 2004). Por outro lado, os resultados de Ueda et al. (2004) sobre expressão ectópica da galectina 7 sugeriram seu papel na supressão tumoral e angiogênese.

A alfa enolase é uma enzima glicolítica que desempenha várias funções no organismo, tais como regulação negativa do crescimento celular e fator de transcrição (Pancholi, 2001). Li et al. (2004) e Lee et al. (2004) observaram expressão elevada de alfa enolase em carcinoma de pulmão e em linhagens celulares de câncer cervical. Stierum et al. (2003) e

Tomonaga et al. (2004), estudando o perfil protéico de câncer coloretal, também obtiveram resultados similares.

As proteínas com expressão reduzida nos tecidos tumorais compreenderam as cadeias leves 1 e 2 da miosina, a cadeia beta da tropomiosina e a mioglobina. A miosina é o componente estrutural do citoesqueleto muscular. Sua ausência nas células tumorais deve refletir, portanto, a destruição do músculo esquelético da língua durante a invasão neoplásica. Este achado também foi observado por He et al. (2004). A tropomiosina, do mesmo modo que a miosina, é uma proteína envolvida com o citoesqueleto e sua expressão tem sido associada com eventos de transformação celular. A supressão da cadeia beta da tropomiosina já foi observada em câncer colorretal (Tomonaga et al., 2004) e em câncer de cabeça e pescoço (He et al., 2004).

Alguns trabalhos na área da proteômica em tumores de cabeça e pescoço foram publicados em 2004. Wadsworth et al. (2004), empregando a técnica *SELDI-TOF*$^{TM}$, estudaram proteínas diferencialmente expressas presentes no soro de 99 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e 102 controles normais. Os autores identificaram um biomarcador já conhecido, denominado metalopanstimulina-1 (MPS-1). Outro trabalho interessante foi apresentado por He et al. (2004). Esses pesquisadores, utilizando as técnicas de eletroforese 2D e espectrometria de massa por MALDI-TOF MS, observaram proteínas com níveis de expressão alterados em carcinomas de células escamosas de língua, incluindo a calgranulina B, a galectina 1, as cadeias leves de miosina e a cadeia β de tropomiosina, além de cadeia pesada de miosina 1 (MHC1), isoforma $M_r$ de tropomiosina, proteínas *heat shock* (HSP 27 e HSP 60), proteína 1 que interage com a proteína nuclear de retardo mental do X frágil (FMRP), cadeia β de ATP sintase, cristalina αB e hemoglobina. Melle et al. (2004), utilizando várias metodologias como a de *ProteinChip arrays*, eletroforese 2D, espectrometria de massa, ensaio por imunodepleção e imunohistoquímica,

isolaram duas proteínas diferencialmente expressas em tumores de cabeça e pescoço, a calgranulina A e a calgranulina B. Os dados desses autores reforçam os achados do presente trabalho, concordando com a expressão elevada de calgranulina e baixa expressão de miosina e tropomiosina, indicando sua participação na tumorigênese de cabeça e pescoço.

Embora a validação dos potenciais marcadores obtidos no presente trabalho dependa de outras técnicas e de um número maior de amostras, os resultados apresentados constituem a base necessária para estudos funcionais, que podem levar ao desenvolvimento de testes preditivos ou de drogas eficazes para o controle do carcinoma oral.

## 6. Conclusões

O presente trabalho investigou as diferenças no perfil protéico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço com e sem metástases regionais.

As principais conclusões do presente trabalho foram:

1. A técnica de eletroforese bidimensional para análise do perfil protéico de amostras biológicas foi implantada no laboratório. Os protocolos de extração são críticos para a resolução de proteínas em géis de eletroforese bidimensional (2-DE).

2. Nas condições dos experimentos realizados, os protocolos de extração de proteínas desenvolvidos no laboratório mostraram maior eficiência que aqueles utilizando kit comercial, o que foi evidenciado pelo número e qualidade dos spots gerados em géis 2-DE.

3. Os perfis protéicos de tecidos neoplásicos e normais da boca e da orofaringe mostraram padrões similares, com diferenças consistentes na expressão de algumas proteínas.

4. A análise de imagens por software específico mostrou menor poder de discriminação de géis que a análise visual, provavelmente em conseqüência da dificuldade de superposição de imagens obtidas a partir de géis de experimentos distintos.

5. As proteínas diferencialmente expressas - albumina, alfa enolase, calgranulina B, galectina 7, mioglobina, miosina (cadeia leve 1), miosina (cadeia leve 2) e tropomiosina 2 (beta) - em carcinomas orais e orofaríngeos em relação aos tecidos normais correspondentes possuem funções relacionadas com sinalização celular, morte celular, transporte, osmorregulação de fluídos corporais, crescimento celular e/ou manutenção, adesão celular, regulação de transcrição e metabolismo de monossacarídeos e, após sua validação, podem revelar-se marcadores de diagnóstico e prognóstico da tumorigênese de cabeça e pescoço.

## 7. Referências


AHMED, N. et al. Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. **Br. J. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 129-40, 2004.

AHOMADEGBE, J. C. et al. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. **Oncogene**, v. 10, n. 6, p. 1217-27, 1995.

ALIZADEH, A. A.; STAUDT, L. M. Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 2, p. 219-225, 2000.

AMBROSH, P.; KRON, M.; FREUDENBERG, L. S. Clinical staging of oropharyngeal carcinoma: a critical evaluation of a new stage grouping proposal. **Cancer**, v. 82, p. 1613-1620, 1998.

AMES, G. F. L.; NIKAIDO, K. Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. **Biochemistr***y*, v. 15, p. 616-623, 1976.

BANKS, R. E. et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1749-1756, 2000.

BERKELMAN T.; STENSTEDT T. 2-**D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods (Amersham Biosciences).** Sweden: Uppsala. 2002. 100p.

BETTENDORF, O.; PIFFKO, J.; BANKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol.**, v.40, n. 2, p. 110-119, 2004.

BOCKMUHL, U. et al. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. **Head Neck.**, v. 20, n. 2, p. 145-151, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head neck cancer implications for field cancerization. **Cancer Res**., v. 56, p. 2488-2492, 1996.

CARBONI, L. et al. Proteomic analysis of rat brain tissue: Comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents. **Electrophoresis**, v. 23, p. 4132-4141, 2002.

CARVALHO, A. L. et al. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. **Head Neck**, v. 26, p. 31-38, 2004.

CASTELLANOS-SERRA L.; PAZ-LAGO, D. Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: Evaluation of its efficiency in challenge experiments. **Electrophoresis**, v. 23, p.1745-1753, 2002.

CASTELLSAGUE, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **Int J Cancer.,** v. 108, n. 5, p. 741-749, 2004.

CELIS, J.E. et al. Proteomics and immunohistochemistry define some of the steps involved in the squamous differentiation of the bladder transitional epithelium: a novel strategy for identifying metaplastic lesions. **Cancer Res**., v. 59, n. 12, p. 3003-3009, 1999.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; DE CAMPOS-BICUDO, H. E. M. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.**., v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.

CGAP (*The Cancer Genome Anatomy Project*). http://cgap.nci.nih.gov/

CHAMBERS, G. et al. Proteomics: a new approach to the study of disease. **J. Pathol.**, v. 192, n. 3, p. 280-288, 2000.

CHEN, J. et al. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. **Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 2465-75, 2004.

CHEUNG, P. K. et al. Protein profiling of microdissected prostate tissue links growth differentiation factor 15 to prostate carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 64, n. 17, p. 5929-5933, 2004.

DAYAN, D. et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncol**., v. 33, n. 2, p. 105-109, 1997.

DE VICENTE, J. C. et al. Prognostic significance of *P53* expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. **Head Neck**., v. 26, p. 22-30, 2004.

DERISI, J. et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. **Nat. Genet.**, v. 14, n. 4, p. 457-60, 1996.

DI CIERO, L. et al. Assessment of four different detergents used to extract membrane proteins from *Xylella fastidiosa* by two-dimensional electrophoresis. **Braz. J. Microbiol**. (in press).

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, n. 12, p. 6025-30, 1996.

ESPINA, V. et al. Use of proteomic analysis to monitor responses to biological therapies. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 4, n. 1, p. 83-93, 2004.

EVANS, A. J. et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. **Head Neck**, v. 26, n. 1, p. 63-70, 2004.

EXPASY HOME PAGE (2003). **Sample preparation (analytical gels).** http://us.expasy.org/ch2d/protocols/protocols.fm1.html.

FELS, L. M. et al. Proteome analysis for the identification of tumor-associated biomarkers in gastrointestinal cancer. **Dig. Dis.**, v. 21, n. 4, p. 292-298, 2003.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 5, n. 1, p. 26-33, 2001.

FOULKES, W. D. et al. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. **BMJ**., v. 313, n. 7059, p. 716-21 1996.

FOULKES, W. D. et al. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**., v. 63, n. 6, p.769-73, 1995.

FRANCESCHI, S. et al. Energy intake and dietary pattern in cancer of the oral cavity and pharynx. **Cancer Causes Control**., v. 10, n. 5, p.439-444, 1999.

FRANCESCHI, S. et al. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**., v. 5, n. 7, p. 567-575, 1996.

FUNG, L.F. et al. Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. **Life Sci.**, v. 67, n. 8, p. 923-36, 2000.

GARFIN, D.E. Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 263-272, 2003.

GARNIS, C. et al. Overexpression of LRP12, a gene contained within an 8q22 amplicon identified by high-resolution array CGH analysis of oral squamous cell carcinomas. **Oncogene,** v. 23, n. 14, p. 2582-2586, 2004.

GARNIS, C. et al. OCGR array: an oral cancer genomic regional array for comparative genomic hybridization analysis. **Oral Oncol.**, v. 40, n. 5, p. 511-519, 2004.

GIAVALISCO, P. et al. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis**. Electrophoresis**, v. 24, p. 207-216, 2003.

GILLISON, M. L. et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**., v. 92, n. 9, p. 709-20, 2000.

GOLUB, T. R. et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 531-537, 1999.

GOOGLE. http://images.google.com.br/images?q=MALDI+TOF%2FTOF&hl=ptBR&btnG=Pesquisa+Google.

GÖRG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis,** v. 21, p. 1037-1053, 2000.

GÖRG, A.; WEISS, W. Analytical IPG-Dalt. **Methods in Molecular Biology**, v. 112, p. 189-95, 1999.

GRASSADONIA, A. et al. 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. **Glycoconj J.**, v. 19, n. 7-9, p. 551-6, 2004.

GREENMAN, J.; HOMER, J. J.; STAFFORD, N. D. Markers in cancer of the larynx and pharynx. **Clin. Otolaryngol.**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2000.

HAFKAMP, H. C.; MANNI, J. J.; SPEEL, E. J. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. **Acta Otolaryngol**., v. 124, n. 4, p.520-526, 2004.

HARDER, A. et al. Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis,** v. 20, n. 4-5, p. 826-9, 1999.

HASNIS, E. et al. Synergistic effect of cigarette smoke and saliva on lymphocytes--the mediatory role of volatile aldehydes and redox active iron and the possible implications for oral cancer. **Int J Biochem Cell Biol**., v. 36, n. 5, p. 826-839, 2004.

HE, Q. Y. et al. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 271-278, 2004.

HECHT, S. S. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. **Mutat Res**., v. 424, n. 1-2, p. 127-142, 1999.

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis,** v. 20, p. 660-663, 1999.

HERBERT, B. R. et al. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. **Electrophoresis**, v. 19, p. 845-851, 1998.

HESSIAN, PA; EDGEWORTH, J; HOGG, N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. **J Leukoc Biol.**, v. 53, n. 2, p. 197-204, 1993.

HONG, S.H. et al. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. **Cancer Res**., v. 64, n. 15, p. 5504-5510, 2004.

HOVING, S. et al. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. **Proteomics,** v. 2, n. 2, p. 127-34, 2002.

HUANG, D. et al. Proteomic identification of 14-3-3 sigma as a common component of the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor signaling pathways of the human prostate epithelial cell line M12. **Oncogene**, v. 23, n. 41, p. 6881-6889, 2004.

JAMES, P. Of genomes and proteomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; v. 231, n. 1, p. 1-6, 1997.

JOHNSON, J. T. Selective neck dissection in patients with squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts: a lack of adequate data. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**.V. 12, n. 3, p. 353, 1998.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal. Chem.**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KENNEDY, S. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. **Toxicol Lett.**, v. 120, n. 1-3, p. 379-84, 2001.

KERKHOFF, C; KLEMPT, M; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochim Biophys Acta.**, v. 1448, n. 2, p. 200-11, 1998.

KO, Y.C. et al. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. **J Oral Pathol Med**., v. 24, n. 10, p. 450-3, 1995.

KOBAYASHI, R. A proteomics approach to find a new breast cancer-specific antigenic marker. **Clin Cancer Res**., v. 7, n. 11, p. 3325-3327, 2001.

KONG, J.P. et al. Loss of myeloid-related proteins 8 and myeloid-related proteins 14 expression in human esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor differentiation. **World J Gastroenterol.**, v. 10, n. 8, p. 1093-7, 2004.

KOWOLIK, M. J.; GRANT, M. Myeloperoxidase activity in human gingival crevicular neutrophils. **Arch Oral Biol**., v. 28, n. 4, p. 293-295, 1983.

KULKARNI, V.; SARANATH, D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. **Oral Oncol**., v. 40, n. 2, p. 145-53, 2004.

KUWABARA, I. et al. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation andmitochondrial cytochrome c release. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 5, p. 3487-97, 2002.

LEAK, L.V. et al. Proteomic analysis of lymph. **Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 753-65, 2004.

LE NAOUR, F. et al. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 7, n. 11, p. 3328-35, 2001.

LEE, K.A. et al. Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics. **Proteomics.**, v. 4, n. 3, p. 839-48, 2004.

LEE, K. H. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. **Trends Biotechnol**., v. 19, n. 6, p. 217-222, 2001.

LI, L.S. et al. Proteomic analysis distinguishes basaloid carcinoma as a distinct subtype of nonsmall cell lung carcinoma. **Proteomics.** v. 4, n. 11, p. 3394-400, 2004.

LU J., et al. Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. **Mol Carcinog.**, v. 20, n. 2, p. 204-15, 1997.

LOCUSLINK. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/LocusLink

MASCOT. http://www.matrixscience.com/search_form_select.html

MASCOT.
http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS

MELLE, C. et al. A technical triade for proteomic identification and characterization of cancer biomarkers. **Cancer Res**., v. 64, n. 12, p. 4099-4104, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2003). Instituto Nacional de Câncer/INCA. http://www.inca.gov.br.

MOISAN, S. et al. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated withprogression toward an aggressive phenotype. **Leukemia**, v. 17, n. 4, p. 751-9, 2003.

MOLLOY, M. P. et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 837-844, 1998.

MOLLOY, M. P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. **Anal. Biochem.**, v. 280, p. 1-10, 2000.

MOORE, S. et al. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. **Free Radic Res**., v. 21, n. 6, p. 417-425, 1994.

MORK, J. et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med**.,v. 344, n. 15, p. 1125-31, 2001.

MORRISON, M. et al. Identification and isolation of lactoperoxidase from salivary gland. **Arch. Biochem. Biophsy**., v. 111, p. 126-133, 1995.

NAGAI, M. A. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. **Braz J Med Biol Res**., v. 32, p. 897-904, 1999.

NAGLER, R. M. et al. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radic Biol Med.,** v. 32, n. 3, p. 268-277, 2002.

NAGLER, R. M. Oral cancer induced by cigarette smoke--the mediatory role of the salivary antioxidant system. **Anticancer Res**., v. 23, n. 6, p. 5125-8, 2003.

NISHIOKA, H.; NISHI, K.; KYOKANE, K. Human saliva inactivates mutagenicity of carcinogens. **Mutat Res**., v. 85, n. 5, p. 323-33, 1981.

OSTERGAARD, M. et al. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. **Cancer Res.**, v. 57, n. 18, p. 4111-7, 1997.

PALMA, M. P. et al. **Fundamentos de Análise Proteômica.** Rio Claro, 2003. 106p.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell Mol Life Sci**., v. 58, n. 7, p. 902-920, 2001.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer**, v. 37, p. S4-S66, 2001.

PARTRIDGE, M. et al. The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. **Br. J. Cancer.**, v. 79, n. 11-12, p. 1821-1827, 1999.

PRUITT, K. M. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase. **Anal Biochem**., v. 191, n. 2, p. 278-86, 1990.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. **Electrophoresis,** v. 17, p. 813-829, 1996.

RABILLOUD, T. et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-16, 1997.

RAI, A. J.; CHAN, D. W. Cancer proteomics: Serum diagnostics for tumor marker discovery. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1022, p. 286-294, 2004.

REVIS, G.J. Immunoelectrophoretic identification of peroxidase in human parotid saliva. **Arch Oral Biol**., v. 22, p. 155-158, 1977.

RORIVE, S. et al. Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. **Mod Pathol.**, v. 15, n. 12, p. 1294-301, 2002.

SAGHATELIAN, A. et al. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 27, p. 10000-5, 2004.

SCHMALBACH, C. E. et al. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 130, n. 3, p. 295-302, 2004.

SCIUBBA, J. J. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. **Am J Clin Dermatol**., v. 2, n. 4, p. 239-51, 2001.

SHEN, J. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Cancer Res.**, v. 64, n. 24, p. 9018-26, 2004.

SLAUGHTER, D.P.; SOUTHWICK, H.W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer**., v. 6, n. 5, p. 963-8, 1953.

SMITH, Q. T.; YANG, C. H. Salivary myeloproxidase of young adult humans. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,** v. 175, p. 468-475, 1984.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, 2001.

STIERUM, R. et al. Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1650, n. 1-2, p. 73-91, 2003.

STRATOWA, C. et al. cDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. **Int. J. Cancer**, v. 91, n. 4, p. 474-480, 2001.

SZYFTER, K. et al. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. **Mutat Res**. V. 445, n. 2, p. 259-74, 1999.

TACHIBANA, M. et al. Expression of apolipoprotein A1 in colonic adenocarcinoma. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 4161-4168, 2003.

TAVANI, A. et al. Diet and risk of oral and pharyngeal cancer. An Italian case-control study. **Eur J Cancer Prev**., v. 10, n. 2, p. 191-5, 2001.

TODD, R.; DONOFF, R. B.; WONG, D. T. W. The molecular biology of oral cancer: toward a tumor progression mode. **J. Oral. Maxillofac. Surg**., v. 55, p. 613-623, 1997.

TOMONAGA, T. et al. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. **Clin Cancer Res.**, v. 10, n. 6, p. 2007-14, 2004.

UEDA, S.; KUWABARA, I.; LIU, F.T. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer**. Cancer Res.**, v. 64, n. 16, p. 5672-6, 2004.

VELCULESCU, V. E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 484-7, 1995.

WADSWORTH, J. T. et al. Serum protein profiles to identify head and neck cancer. **Clin Cancer Res**., v. 10, n. 5, p.1625-1632, 2004

WAN, J. et al. Protemics analysis of apoptosis initiation induced by all-trans retinoic acid in human acute promyelocyt leukemia cells. **Electrophoresis**, v. 22, n. 14, p. 3026-3037, 2001.

WAN, J. S. et al. Cloning differentially expressed mRNAs. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, n. 13, p. 1685-91, 1996.

WERNER, W. E. Run parameters affecting protein patterns from second dimension electrophoresis gels. **Anal. Biochem.**, v. 317, p. 280-283, 2003.

WILLIAMS, H. K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Mol. Pathol**., v. 53, n. 4, p. 165-72, 2000.

WONG, Y. F. et al. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. **Cancer Lett**., v. 211, n. 2, p. 227-234, 2004.

YANG, R.Y.; LIU, F.T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cell Mol Life Sci.**, v. 60, n. 2, p. 267-76, 2003.

YATES, J. R. Mass spectrometry. From genomics to proteomics. **Trends Genet.**, v. 16, n. 1, p. 5-8, 2000.

YOKOO, H. et al. Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in livercancer cells. **Hepatology**, v. 40, n. 3, p. 609-17, 2004.

YOUNG, T. W. et al. Activation of antioxidant pathways in ras-mediated oncogenic transformation of human surface ovarian ephitelial cells revealed by functional proteomics and mass spectrometry. **Cancer Res**., v. 64, n. 13, p. 4577-4584, 2004.

ZHANG, Z. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 64, n. 16, p. 5882-90, 2004.

ZHOU, G. et al. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. **Mol. Cell Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 117-24, 2002.

**Anexo 1**

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, os médicos e pesquisadores desta Instituição estão desenvolvendo um projeto que deverá ajudar na obtenção de conhecimento sobre o câncer e, conseqüentemente, de oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento para essa doença. O projeto envolve o estudo de material genético e proteínas obtidas de tumores removidos em cirurgias ou de sangue e de outros materiais biológicos do paciente.

Você está sendo atendido(a) neste Hospital para o diagnóstico ou o tratamento de alguma forma de tumor. Para isso, há a necessidade de remoção do tumor e/ou de material biológico relacionado com a doença. É rotina nesse Hospital usar parte desse tumor ou do material biológico para exames laboratoriais que são importantes para o diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo descartado conforme Legislação Sanitária que regulamenta o assunto. Se você concordar, a parte não utilizada do tumor ou do material biológico será armazenada para estudos sobre as proteínas do câncer.

O material armazenado será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual publicação em revistas científicas dos resultados de pesquisa utilizando esse material será feita de modo a manter o anonimato dos participantes.

Se você concordar com o uso do tumor e do material biológico do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa ou decidir retirar seu consentimento em qualquer momento, sua decisão não influenciará, de modo nenhum, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este Termo se você consentir. Caso você tenha questões a fazer ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética, pelo telefone_____.

**DECLARAÇÃO**

**Declaro estar ciente das informações dadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor do presente Termo.**

_____

, de de .

Responsável ou Paciente
Nome:
RG

# APÊNDICE A

Pontos isoelétricos (pI) e pesos moleculares (PM) de spots protéicos de pools tumorais (A, B, E) e de margens cirúrgicas (C, D, F).

**Apêndice A.** Pontos isoelétricos (pI) e pesos moleculares (PM) de spots protéicos de pools tumorais (A, B, E) e de margens cirúrgicas (C, D, F).

| pool A | | | pool B | | | pool E | | | pool C | | | pool D | | | pool F | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Spot | pI | MW (d) | Spot | pI | MW (d) | Spot | pI | MW (d) | Spot | pI | MW (d) | Spot | pI | MW (d) | Spot | pI | MW (d) |
| 1 | 5.765 | 116,000.000 | 1 | 6.050 | 120,914.286 | 1 | 9.233 | 128,000.000 | 1 | 5.306 | 128,968.750 | 1 | 5.376 | 142,307.692 | 1 | 5.273 | 138,605.263 |
| 2 | 5.248 | 115,000.000 | 2 | 5.837 | 120,028.571 | 2 | 5.307 | 120,250.000 | 2 | 9.195 | 126,062.500 | 2 | 5.826 | 133,564.103 | 2 | 5.778 | 123,921.053 |
| 3 | 5.836 | 115,000.000 | 3 | 5.912 | 120,028.571 | 3 | 5.049 | 108,194.444 | 4 | 3.476 | 123,156.250 | 3 | 9.400 | 124,025.641 | 3 | 5.409 | 119,842.105 |
| 4 | 5.906 | 115,000.000 | 4 | 5.975 | 120,028.571 | 4 | 4.451 | 106,472.222 | 6 | 3.451 | 114,437.500 | 4 | 5.175 | 121,641.026 | 4 | 6.222 | 114,131.579 |
| 5 | 5.988 | 115,000.000 | 5 | 6.126 | 120,028.571 | 5 | 4.695 | 97,861.111 | 7 | 4.988 | 114,437.500 | 5 | 3.213 | 119,256.410 | 5 | 4.625 | 106,789.474 |
| 6 | 6.059 | 115,000.000 | 6 | 5.587 | 119,142.857 | 6 | 5.123 | 96,043.485 | 8 | 5.611 | 114,437.500 | 6 | 9.450 | 115,282.051 | 6 | 6.358 | 106,789.474 |
| 7 | 6.141 | 115,000.000 | 7 | 5.662 | 119,142.857 | 7 | 5.012 | 91,276.383 | 9 | 5.306 | 109,593.750 | 7 | 5.351 | 114,487.179 | 7 | 5.421 | 104,342.105 |
| 8 | 6.212 | 115,000.000 | 8 | 5.749 | 119,142.857 | 8 | 6.062 | 84,726.207 | 10 | 9.244 | 108,625.000 | 8 | 6.210 | 111,307.692 | 8 | 5.520 | 102,710.526 |
| 9 | 6.306 | 115,000.000 | 9 | 9.339 | 116,485.714 | 9 | 6.198 | 82,899.815 | 11 | 6.169 | 107,656.250 | 9 | 5.426 | 106,538.462 | 9 | 7.160 | 102,710.526 |
| 10 | 7.023 | 114,000.000 | 10 | 5.250 | 112,057.143 | 10 | 6.296 | 82,899.815 | 12 | 9.256 | 103,781.250 | 10 | 5.938 | 105,743.590 | 10 | 4.500 | 101,078.947 |
| 11 | 7.082 | 113,000.000 | 11 | 5.176 | 111,171.429 | 11 | 6.432 | 82,899.815 | 13 | 3.061 | 100,875.000 | 11 | 6.260 | 102,564.103 | 11 | 5.248 | 100,263.158 |
| 12 | 7.153 | 113,000.000 | 12 | 9.339 | 110,285.714 | 12 | 6.876 | 78,457.600 | 14 | 5.073 | 100,875.000 | 12 | 6.334 | 102,564.103 | 12 | 6.123 | 99,447.368 |
| 13 | 7.235 | 113,000.000 | 13 | 6.076 | 107,628.571 | 13 | 6.481 | 77,593.910 | 15 | 5.379 | 100,875.000 | 13 | 4.550 | 100,974.359 | 13 | 5.594 | 98,631.579 |
| 14 | 7.293 | 113,000.000 | 14 | 4.912 | 104,085.714 | 14 | 6.617 | 77,593.910 | 16 | 6.482 | 100,875.000 | 14 | 5.464 | 100,974.359 | 14 | 4.900 | 97,815.789 |
| 15 | 9.225 | 113,000.000 | 15 | 9.364 | 102,314.286 | 15 | 6.124 | 76,739.503 | 17 | 5.867 | 99,906.250 | 15 | 5.376 | 98,589.744 | 15 | 5.803 | 97,815.789 |
| 16 | 5.472 | 109,000.000 | 16 | 4.202 | 101,428.571 | 16 | 4.890 | 75,060.305 | 18 | 4.622 | 97,000.000 | 16 | 7.174 | 98,589.744 | 16 | 5.901 | 97,815.789 |
| 17 | 6.753 | 108,000.000 | 17 | 5.787 | 100,542.857 | 17 | 7.297 | 73,423.540 | 19 | 6.290 | 97,000.000 | 17 | 3.213 | 97,794.872 | 17 | 6.012 | 97,000.000 |
| 18 | 5.272 | 107,000.000 | 18 | 4.456 | 98,771.429 | 18 | 5.431 | 71,832.747 | 20 | 9.244 | 97,000.000 | 18 | 5.288 | 97,794.872 | 18 | 6.086 | 92,494.364 |
| 19 | 5.331 | 106,000.000 | 19 | 5.238 | 97,000.000 | 19 | 5.790 | 71,055.694 | 21 | 7.012 | 95,923.015 | 19 | 4.350 | 95,237.439 | 19 | 7.320 | 91,597.206 |
| 20 | 6.318 | 106,000.000 | 20 | 5.038 | 94,050.401 | 20 | 5.579 | 70,291.459 | 22 | 7.109 | 95,923.015 | 20 | 7.062 | 95,237.439 | 20 | 7.443 | 91,597.206 |
| 21 | 9.237 | 106,000.000 | 21 | 4.924 | 91,113.790 | 21 | 5.270 | 68,080.089 | 23 | 6.398 | 94,846.665 | 21 | 5.263 | 93,477.613 | 21 | 6.407 | 88,920.165 |
| 22 | 5.118 | 105,000.000 | 22 | 5.226 | 91,113.790 | 22 | 5.691 | 68,080.089 | 24 | 5.293 | 93,771.585 | 22 | 6.111 | 92,599.579 | 22 | 6.605 | 86,272.352 |
| 23 | 6.647 | 102,000.000 | 23 | 5.774 | 88,203.154 | 23 | 5.827 | 66,678.040 | 25 | 6.867 | 93,771.585 | 23 | 4.887 | 89,107.950 | 23 | 6.815 | 86,272.352 |
| 24 | 7.317 | 102,000.000 | 24 | 4.722 | 86,283.573 | 24 | 6.765 | 66,678.040 | 26 | 7.511 | 93,771.585 | 24 | 7.336 | 86,520.329 | 24 | 6.704 | 85,397.927 |
| 25 | 5.272 | 101,000.000 | 25 | 7.326 | 86,283.573 | 25 | 7.074 | 66,678.040 | 27 | 5.024 | 89,496.656 | 25 | 7.461 | 85,665.535 | 25 | 5.223 | 84,528.192 |
| 26 | 5.566 | 101,000.000 | 26 | 6.139 | 84,385.157 | 26 | 7.235 | 66,678.040 | 28 | 6.036 | 88,437.446 | 26 | 6.037 | 83,969.617 | 26 | 4.488 | 83,663.510 |
| 27 | 6.035 | 100,000.000 | 27 | 6.303 | 81,585.634 | 27 | 5.394 | 66,000.000 | 29 | 4.878 | 87,383.314 | 27 | 6.186 | 83,129.177 | 27 | 4.938 | 83,663.510 |
| 28 | 6.435 | 99,000.000 | 28 | 6.823 | 81,585.634 | 28 | 6.148 | 66,000.000 | 30 | 5.818 | 87,383.314 | 28 | 6.395 | 81,465.044 | 28 | 6.926 | 83,663.510 |
| 29 | 7.481 | 99,000.000 | 29 | 6.494 | 80,667.211 | 29 | 6.519 | 66,000.000 | 31 | 5.709 | 86,334.896 | 29 | 6.297 | 80,642.034 | 29 | 6.074 | 82,804.239 |
| 30 | 9.248 | 99,000.000 | 30 | 4.583 | 79,756.965 | 30 | 6.062 | 65,337.759 | 32 | 7.352 | 83,230.268 | 30 | 6.506 | 79,825.517 | 30 | 7.037 | 82,804.239 |
| 31 | 4.727 | 98,000.000 | 31 | 6.595 | 79,756.965 | 31 | 6.864 | 64,060.035 | 33 | 6.326 | 78,229.404 | 31 | 6.605 | 79,015.836 | 31 | 5.766 | 80,262.512 |
| 32 | 6.553 | 97,000.000 | 32 | 5.300 | 77,080.101 | 32 | 6.222 | 62,256.674 | 34 | 6.434 | 77,260.971 | 32 | 6.802 | 79,015.836 | 32 | 5.433 | 75,373.910 |
| 33 | 6.894 | 97,000.000 | 33 | 6.924 | 76,207.374 | 33 | 6.074 | 61,684.768 | 35 | 5.073 | 76,304.600 | 33 | 6.703 | 77,418.345 | 33 | 5.631 | 74,588.611 |
| 34 | 7.023 | 97,000.000 | 34 | 6.836 | 75,345.229 | 34 | 6.617 | 61,684.768 | 36 | 6.542 | 76,304.600 | 34 | 4.925 | 75,852.297 | 34 | 5.815 | 73,812.694 |
| 35 | 7.117 | 97,000.000 | 35 | 4.773 | 74,494.148 | 35 | 5.777 | 58,542.927 | 37 | 6.650 | 75,360.925 | 35 | 9.437 | 75,081.918 | 35 | 6.432 | 73,812.694 |
| 36 | 7.411 | 97,000.000 | 36 | 5.450 | 74,494.148 | 36 | 5.913 | 58,065.267 | 38 | 4.878 | 74,430.580 | 36 | 6.457 | 74,320.425 | 36 | 6.605 | 73,046.519 |
| 37 | 5.460 | 95,888.625 | 37 | 5.550 | 72,827.099 | 37 | 7.148 | 58,065.267 | 39 | 6.855 | 73,514.202 | 37 | 6.592 | 74,320.425 | 37 | 3.344 | 72,290.448 |
| 38 | 5.542 | 95,888.625 | 38 | 5.637 | 71,210.076 | 38 | 6.025 | 57,147.157 | 40 | 6.964 | 73,514.202 | 38 | 6.790 | 74,320.425 | 38 | 5.914 | 72,290.448 |
| 39 | 5.613 | 95,888.625 | 39 | 5.400 | 70,421.526 | 39 | 6.136 | 57,147.157 | 41 | 7.121 | 73,514.202 | 39 | 6.901 | 74,320.425 | 39 | 6.012 | 72,290.448 |
| 40 | 5.671 | 95,888.625 | 40 | 7.075 | 70,421.526 | 40 | 4.622 | 55,859.339 | 42 | 9.280 | 73,514.202 | 40 | 6.173 | 73,568.160 | 40 | 3.111 | 71,544.841 |
| 41 | 6.223 | 95,888.625 | 41 | 5.238 | 69,646.926 | 41 | 5.209 | 55,452.913 | 43 | 5.562 | 72,612.424 | 41 | 7.037 | 73,568.160 | 41 | 5.569 | 71,544.841 |
| 42 | 7.223 | 95,888.625 | 42 | 5.487 | 69,646.926 | 42 | 4.049 | 55,057.501 | 45 | 6.410 | 71,725.882 | 42 | 4.962 | 72,092.678 | 42 | 7.591 | 70,810.060 |
| 43 | 6.118 | 93,668.659 | 43 | 7.338 | 69,646.926 | 43 | 7.099 | 55,057.501 | 46 | 7.279 | 70,001.043 | 43 | 9.175 | 69,957.207 | 43 | 7.814 | 70,810.060 |
| 44 | 5.342 | 92,561.460 | 44 | 6.316 | 68,886.756 | 44 | 4.914 | 54,672.860 | 47 | 5.648 | 69,164.015 | 44 | 7.087 | 69,267.483 | 44 | 8.400 | 70,086.464 |
| 45 | 5.800 | 92,561.460 | 45 | 6.823 | 68,886.756 | 45 | 6.481 | 54,672.860 | 48 | 7.048 | 69,164.015 | 45 | 7.324 | 69,267.483 | 45 | 7.406 | 69,374.415 |
| 46 | 5.095 | 91,457.046 | 46 | 5.562 | 68,141.497 | 46 | 9.418 | 54,672.860 | 49 | 7.389 | 68,344.762 | 46 | 3.213 | 67,269.400 | 46 | 6.197 | 67,986.400 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | 5.742 | 91,457.046 | 47 | 5.762 | 68,141.497 | 47 | 6.605 | 54,298.744 | 50 | 3.403 | 66,762.120 | 47 | 5.389 | 66,628.206 | 47 | 6.247 | 67,986.400 |
| 48 | 5.883 | 91,457.046 | 48 | 6.013 | 68,141.497 | 48 | 6.815 | 54,298.744 | 51 | 5.501 | 66,762.120 | 48 | 6.568 | 66,628.206 | 48 | 5.729 | 61,829.198 |
| 49 | 6.482 | 91,457.046 | 49 | 6.063 | 68,141.497 | 49 | 4.646 | 53,934.908 | 52 | 9.085 | 66,000.000 | 49 | 6.827 | 66,628.206 | 49 | 4.775 | 60,750.878 |
| 50 | 5.189 | 89,259.355 | 50 | 6.899 | 68,141.497 | 50 | 5.037 | 53,934.908 | 53 | 5.061 | 65,258.031 | 50 | 7.887 | 66,628.206 | 50 | 5.335 | 60,750.878 |
| 51 | 5.260 | 89,259.355 | 51 | 3.486 | 67,411.631 | 51 | 7.334 | 53,581.108 | 54 | 5.342 | 65,258.031 | 51 | 5.514 | 66,000.000 | 51 | 6.173 | 60,750.878 |
| 52 | 5.977 | 89,259.355 | 52 | 4.962 | 67,411.631 | 52 | 8.012 | 53,581.108 | 55 | 5.721 | 64,536.035 | 52 | 5.814 | 66,000.000 | 52 | 6.284 | 60,229.559 |
| 53 | 7.293 | 89,259.355 | 53 | 5.625 | 67,411.631 | 53 | 7.557 | 53,237.098 | 56 | 7.158 | 64,536.035 | 53 | 5.975 | 66,000.000 | 53 | 4.888 | 59,719.854 |
| 54 | 7.376 | 88,167.471 | 54 | 3.112 | 66,697.638 | 54 | 7.260 | 52,261.364 | 57 | 5.903 | 63,833.669 | 54 | 6.716 | 66,000.000 | 54 | 7.296 | 59,221.554 |
| 55 | 6.588 | 87,081.155 | 55 | 5.363 | 66,000.000 | 55 | 3.000 | 51,655.337 | 58 | 7.817 | 63,833.669 | 55 | 9.200 | 64,783.194 | 55 | 4.575 | 58,734.448 |
| 56 | 6.176 | 86,001.104 | 56 | 5.837 | 66,000.000 | 56 | 3.260 | 51,655.337 | 59 | 5.806 | 63,150.593 | 56 | 6.186 | 62,503.161 | 56 | 7.988 | 58,734.448 |
| 57 | 7.470 | 86,001.104 | 57 | 6.633 | 66,000.000 | 57 | 4.829 | 51,655.337 | 60 | 6.217 | 62,486.465 | 57 | 7.975 | 60,921.252 | 57 | 5.000 | 58,258.327 |
| 58 | 6.247 | 84,928.014 | 58 | 6.227 | 65,319.072 | 58 | 5.678 | 51,655.337 | 61 | 3.634 | 61,840.943 | 58 | 6.445 | 59,924.669 | 58 | 5.433 | 57,792.982 |
| 59 | 7.035 | 82,805.501 | 59 | 6.113 | 64,654.707 | 59 | 5.777 | 51,655.337 | 62 | 5.489 | 61,840.943 | 59 | 6.617 | 59,924.669 | 59 | 5.717 | 57,792.982 |
| 60 | 6.482 | 81,757.471 | 60 | 6.038 | 63,374.583 | 60 | 5.382 | 51,364.928 | 63 | 6.674 | 61,840.943 | 60 | 6.765 | 59,924.669 | 60 | 5.951 | 57,338.201 |
| 61 | 7.153 | 81,757.471 | 61 | 3.761 | 62,758.281 | 61 | 5.493 | 51,364.928 | 64 | 6.097 | 60,012.603 | 61 | 8.513 | 59,924.669 | 61 | 6.247 | 56,459.498 |
| 62 | 7.340 | 81,757.471 | 62 | 7.163 | 62,758.281 | 62 | 5.579 | 51,364.928 | 65 | 6.891 | 59,438.092 | 62 | 6.963 | 58,972.648 | 62 | 3.111 | 56,035.156 |
| 63 | 6.624 | 80,719.185 | 63 | 5.962 | 62,157.456 | 63 | 5.901 | 51,364.928 | 66 | 7.194 | 59,438.092 | 63 | 7.186 | 58,512.851 | 63 | 6.160 | 55,620.540 |
| 64 | 5.871 | 79,691.342 | 64 | 6.950 | 62,157.456 | 64 | 6.630 | 51,364.928 | 67 | 4.841 | 58,880.481 | 64 | 7.837 | 58,512.851 | 64 | 6.395 | 55,620.540 |
| 65 | 6.706 | 79,691.342 | 65 | 6.646 | 61,571.836 | 65 | 6.741 | 51,082.595 | 68 | 6.338 | 58,880.481 | 65 | 7.749 | 58,063.598 | 65 | 5.840 | 55,215.440 |
| 66 | 5.953 | 78,674.635 | 66 | 7.075 | 61,571.836 | 66 | 7.445 | 51,082.595 | 69 | 6.686 | 58,880.481 | 66 | 7.975 | 58,063.598 | 66 | 6.926 | 55,215.440 |
| 67 | 6.800 | 78,674.635 | 67 | 5.038 | 61,001.151 | 67 | 7.074 | 50,808.094 | 71 | 7.231 | 54,986.988 | 67 | 3.600 | 57,195.927 | 67 | 7.148 | 55,215.440 |
| 68 | 7.564 | 77,669.763 | 68 | 6.215 | 61,001.151 | 68 | 6.284 | 50,541.179 | 72 | 5.257 | 54,566.104 | 68 | 6.272 | 56,368.044 | 68 | 7.764 | 55,215.440 |
| 69 | 7.000 | 76,677.420 | 69 | 6.481 | 61,001.151 | 69 | 6.494 | 50,541.179 | 73 | 5.672 | 54,566.104 | 69 | 9.450 | 56,368.044 | 69 | 6.642 | 54,819.648 |
| 70 | 7.106 | 76,677.420 | 70 | 6.849 | 61,001.151 | 70 | 6.951 | 50,541.179 | 74 | 7.988 | 54,566.104 | 70 | 7.299 | 55,968.526 | 70 | 7.888 | 54,819.648 |
| 71 | 7.235 | 76,677.420 | 71 | 5.226 | 60,445.128 | 71 | 6.124 | 50,281.606 | 75 | 4.536 | 54,158.704 | 71 | 4.487 | 55,578.358 | 71 | 7.320 | 53,686.014 |
| 72 | 6.282 | 75,698.303 | 72 | 5.313 | 60,445.128 | 72 | 5.184 | 49,085.294 | 76 | 9.219 | 54,158.704 | 72 | 4.737 | 55,578.358 | 72 | 7.493 | 53,686.014 |
| 73 | 6.906 | 75,698.303 | 73 | 5.500 | 58,862.320 | 73 | 9.455 | 49,085.294 | 77 | 5.477 | 53,764.447 | 73 | 4.825 | 55,578.358 | 73 | 9.224 | 53,325.351 |
| 74 | 6.565 | 74,733.107 | 74 | 5.887 | 57,401.697 | 74 | 4.927 | 48,864.628 | 78 | 6.217 | 53,764.447 | 74 | 7.174 | 55,578.358 | 74 | 5.631 | 52,972.947 |
| 75 | 6.694 | 74,733.107 | 75 | 6.227 | 57,401.697 | 75 | 3.012 | 48,035.788 | 79 | 4.670 | 52,657.121 | 75 | 8.050 | 55,578.358 | 75 | 6.383 | 52,972.947 |
| 76 | 5.047 | 73,782.530 | 76 | 4.583 | 56,940.707 | 76 | 3.273 | 48,035.788 | 80 | 8.842 | 52,657.121 | 76 | 7.837 | 54,825.277 | 76 | 7.715 | 52,972.947 |
| 77 | 5.118 | 73,782.530 | 77 | 5.388 | 56,940.707 | 77 | 6.124 | 48,035.788 | 81 | 9.232 | 52,312.022 | 77 | 3.200 | 53,422.564 | 77 | 6.494 | 52,628.591 |
| 78 | 9.260 | 73,782.530 | 78 | 6.025 | 56,492.207 | 78 | 6.259 | 48,035.788 | 83 | 5.648 | 51,655.789 | 78 | 4.950 | 53,422.564 | 78 | 7.826 | 52,628.591 |
| 79 | 7.387 | 72,847.267 | 79 | 6.139 | 56,492.207 | 79 | 5.926 | 47,650.235 | 84 | 7.377 | 51,655.789 | 79 | 5.025 | 53,092.278 | 79 | 8.125 | 52,628.591 |
| 80 | 5.660 | 71,025.467 | 80 | 7.176 | 56,492.207 | 80 | 5.172 | 47,463.818 | 85 | 7.866 | 51,655.789 | 80 | 5.838 | 53,092.278 | 80 | 8.275 | 52,628.591 |
| 81 | 6.988 | 70,140.323 | 81 | 4.672 | 56,055.925 | 81 | 3.471 | 47,281.314 | 86 | 7.963 | 51,655.789 | 81 | 6.913 | 52,769.750 | 81 | 6.173 | 51,963.185 |
| 82 | 3.199 | 68,425.026 | 82 | 4.760 | 55,631.590 | 82 | 5.283 | 47,281.314 | 87 | 8.098 | 51,655.789 | 82 | 7.162 | 52,769.750 | 82 | 3.111 | 51,641.715 |
| 83 | 3.657 | 67,596.265 | 83 | 4.849 | 55,631.590 | 83 | 5.382 | 47,281.314 | 88 | 5.000 | 51,343.973 | 83 | 9.425 | 52,769.750 | 83 | 7.234 | 51,641.715 |
| 84 | 5.519 | 67,596.265 | 84 | 4.937 | 55,631.590 | 84 | 5.691 | 47,281.314 | 89 | 5.927 | 51,343.973 | 84 | 6.198 | 52,454.782 | 84 | 7.975 | 51,327.455 |
| 85 | 5.824 | 67,596.265 | 85 | 6.494 | 55,631.590 | 85 | 5.790 | 47,281.314 | 90 | 7.218 | 51,343.973 | 85 | 6.383 | 52,454.782 | 85 | 7.616 | 51,020.194 |
| 86 | 3.363 | 66,787.691 | 86 | 3.075 | 55,218.929 | 86 | 5.530 | 47,102.478 | 91 | 7.523 | 51,343.973 | 86 | 6.629 | 52,454.782 | 86 | 4.975 | 50,425.833 |
| 87 | 4.369 | 66,787.691 | 87 | 4.367 | 55,218.929 | 87 | 7.037 | 47,102.478 | 92 | 8.842 | 51,343.973 | 87 | 6.851 | 52,454.782 | 87 | 8.262 | 50,425.833 |
| 88 | 5.906 | 66,787.691 | 88 | 5.125 | 55,218.929 | 88 | 6.593 | 46,927.066 | 93 | 7.073 | 51,042.568 | 88 | 6.988 | 52,147.176 | 88 | 8.362 | 50,425.833 |
| 89 | 7.153 | 66,787.691 | 89 | 5.313 | 54,048.281 | 89 | 6.938 | 46,927.066 | 94 | 7.597 | 51,042.568 | 89 | 4.937 | 51,846.731 | 89 | 8.700 | 50,425.833 |
| 90 | 7.681 | 66,787.691 | 90 | 5.762 | 54,048.281 | 90 | 4.780 | 46,754.832 | 95 | 5.269 | 50,751.233 | 90 | 7.499 | 51,846.731 | 90 | 5.655 | 50,138.312 |
| 91 | 7.893 | 66,787.691 | 91 | 6.417 | 54,048.281 | 91 | 4.988 | 46,585.532 | 96 | 5.794 | 50,751.233 | 91 | 7.699 | 51,846.731 | 91 | 5.791 | 50,138.312 |
| 92 | 6.094 | 66,000.000 | 92 | 5.226 | 53,679.604 | 92 | 5.938 | 46,585.532 | 97 | 6.314 | 50,751.233 | 92 | 5.025 | 51,266.532 | 92 | 8.512 | 50,138.312 |
| 93 | 7.035 | 66,000.000 | 93 | 5.462 | 53,679.604 | 93 | 8.622 | 46,254.753 | 98 | 6.578 | 50,751.233 | 93 | 7.286 | 51,266.532 | 93 | 8.838 | 50,138.312 |
| 94 | 7.258 | 66,000.000 | 94 | 6.633 | 53,679.604 | 94 | 4.719 | 45,461.999 | 99 | 8.671 | 50,751.233 | 94 | 5.814 | 50,986.380 | 94 | 5.963 | 49,856.952 |
| 95 | 5.988 | 65,233.709 | 95 | 7.176 | 53,679.604 | 95 | 4.622 | 45,153.434 | 100 | 6.855 | 50,469.626 | 95 | 7.862 | 50,986.380 | 95 | 4.813 | 49,581.543 |
| 96 | 8.476 | 65,233.709 | 96 | 5.575 | 53,321.244 | 96 | 4.853 | 45,153.434 | 101 | 7.792 | 50,197.407 | 96 | 8.275 | 50,986.380 | 96 | 5.446 | 49,581.543 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 97 | 6.730 | 64,488.621 | 97 | 6.303 | 53,321.244 | 97 | 5.678 | 45,000.000 | 102 | 5.672 | 49,934.232 | 97 | 6.012 | 50,444.976 | 97 | 6.284 | 49,311.875 |
| 98 | 6.824 | 64,488.621 | 98 | 4.937 | 52,972.929 | 98 | 5.555 | 44,541.269 | 103 | 6.386 | 49,934.232 | 98 | 5.639 | 50,183.326 | 98 | 6.407 | 49,311.875 |
| 99 | 5.648 | 63,764.360 | 99 | 5.674 | 52,972.929 | 99 | 5.951 | 44,541.269 | 104 | 8.317 | 49,934.232 | 99 | 6.765 | 49,927.446 | 99 | 5.717 | 49,047.738 |
| 100 | 3.704 | 62,376.814 | 100 | 6.506 | 52,972.929 | 100 | 6.827 | 44,541.269 | 105 | 3.403 | 49,679.762 | 100 | 7.224 | 49,927.446 | 100 | 7.382 | 49,047.738 |
| 101 | 7.329 | 62,376.814 | 101 | 6.849 | 52,972.929 | 101 | 5.184 | 44,084.745 | 106 | 5.489 | 49,679.762 | 101 | 8.588 | 49,927.446 | 101 | 7.777 | 48,535.219 |
| 102 | 6.494 | 61,712.777 | 102 | 3.087 | 52,634.388 | 102 | 8.378 | 44,084.745 | 107 | 7.401 | 49,679.762 | 102 | 8.788 | 49,927.446 | 102 | 6.333 | 47,802.681 |
| 103 | 6.682 | 61,068.063 | 103 | 5.325 | 52,305.348 | 103 | 7.235 | 43,933.070 | 108 | 8.073 | 49,679.762 | 103 | 8.975 | 49,927.446 | 103 | 6.766 | 47,802.681 |
| 104 | 7.106 | 61,068.063 | 104 | 6.392 | 52,305.348 | 104 | 4.658 | 43,178.521 | 109 | 9.232 | 49,679.762 | 104 | 6.371 | 49,677.137 | 104 | 6.506 | 47,336.036 |
| 105 | 7.211 | 61,068.063 | 105 | 7.326 | 52,305.348 | 105 | 6.605 | 43,178.521 | 110 | 6.314 | 48,965.161 | 105 | 6.629 | 49,432.199 | 105 | 7.172 | 47,336.036 |
| 106 | 7.035 | 60,442.295 | 106 | 3.398 | 51,985.539 | 106 | 5.283 | 42,728.919 | 111 | 5.611 | 48,742.092 | 106 | 6.901 | 49,432.199 | 106 | 5.643 | 47,108.598 |
| 107 | 5.413 | 59,835.098 | 107 | 5.138 | 51,985.539 | 107 | 6.778 | 42,728.919 | 112 | 5.782 | 48,742.092 | 107 | 8.425 | 49,432.199 | 107 | 6.099 | 47,108.598 |
| 108 | 6.847 | 59,835.098 | 108 | 5.226 | 51,985.539 | 108 | 4.853 | 42,579.585 | 113 | 6.422 | 48,526.020 | 108 | 5.601 | 48,727.627 | 108 | 4.650 | 46,884.804 |
| 109 | 5.777 | 58,121.169 | 109 | 5.462 | 51,985.539 | 109 | 5.406 | 42,579.585 | 114 | 6.626 | 48,526.020 | 109 | 9.475 | 48,502.187 | 109 | 4.362 | 46,664.443 |
| 110 | 6.730 | 58,121.169 | 110 | 5.900 | 51,985.539 | 110 | 5.678 | 42,579.585 | 115 | 7.866 | 48,526.020 | 110 | 4.787 | 48,281.124 | 110 | 7.320 | 46,447.306 |
| 111 | 9.225 | 58,121.169 | 111 | 6.291 | 51,985.539 | 111 | 5.517 | 42,430.519 | 116 | 4.573 | 48,316.603 | 111 | 7.825 | 47,642.209 | 111 | 5.840 | 46,021.866 |
| 112 | 7.340 | 57,584.493 | 112 | 7.400 | 51,985.539 | 112 | 5.037 | 42,281.725 | 117 | 7.158 | 48,316.603 | 112 | 4.462 | 47,436.666 | 112 | 7.628 | 46,021.866 |
| 113 | 6.129 | 57,064.508 | 113 | 4.672 | 51,674.689 | 113 | 5.926 | 42,281.725 | 118 | 7.389 | 48,316.603 | 113 | 6.740 | 46,646.328 | 113 | 4.463 | 45,200.442 |
| 114 | 7.223 | 57,064.508 | 114 | 6.583 | 51,674.689 | 114 | 6.913 | 42,281.725 | 119 | 7.584 | 48,316.603 | 114 | 7.162 | 46,646.328 | 114 | 4.350 | 44,801.136 |
| 115 | 5.648 | 56,560.837 | 115 | 7.700 | 51,674.689 | 115 | 8.293 | 42,281.725 | 120 | 7.988 | 48,316.603 | 115 | 6.321 | 46,455.707 | 115 | 6.889 | 44,603.806 |
| 116 | 6.376 | 56,560.837 | 116 | 9.402 | 51,674.689 | 116 | 6.296 | 42,133.204 | 121 | 6.000 | 48,113.500 | 116 | 6.827 | 46,455.707 | 116 | 3.086 | 43,829.562 |
| 117 | 8.047 | 56,073.104 | 117 | 6.000 | 51,372.526 | 117 | 5.270 | 41,836.988 | 122 | 6.855 | 48,113.500 | 117 | 3.100 | 46,267.475 | 117 | 9.397 | 43,829.562 |
| 118 | 3.187 | 55,600.933 | 118 | 7.550 | 51,078.779 | 118 | 6.481 | 41,836.988 | 123 | 8.537 | 47,916.369 | 118 | 4.537 | 46,081.432 | 118 | 5.248 | 43,639.707 |
| 119 | 6.482 | 55,600.933 | 119 | 4.748 | 50,515.444 | 119 | 4.561 | 41,689.297 | 124 | 8.720 | 47,916.369 | 119 | 5.013 | 46,081.432 | 119 | 5.569 | 43,639.707 |
| 120 | 5.425 | 55,143.948 | 120 | 6.494 | 50,515.444 | 120 | 5.172 | 41,247.913 | 125 | 4.792 | 47,724.869 | 120 | 6.494 | 46,081.432 | 120 | 7.690 | 43,639.707 |
| 121 | 6.577 | 55,143.948 | 121 | 5.862 | 50,245.314 | 121 | 4.743 | 41,101.354 | 126 | 8.342 | 47,724.869 | 121 | 4.812 | 45,897.378 | 121 | 8.125 | 43,451.309 |
| 122 | 6.706 | 55,143.948 | 122 | 6.240 | 50,245.314 | 122 | 5.728 | 41,101.354 | 127 | 5.428 | 47,538.658 | 122 | 4.925 | 45,897.378 | 122 | 8.550 | 43,451.309 |
| 123 | 4.655 | 54,274.031 | 123 | 6.684 | 50,245.314 | 123 | 4.281 | 40,955.083 | 128 | 5.574 | 47,538.658 | 123 | 7.162 | 45,897.378 | 123 | 5.680 | 43,264.355 |
| 124 | 4.727 | 54,274.031 | 124 | 5.600 | 49,982.513 | 124 | 6.642 | 40,955.083 | 129 | 9.256 | 47,538.658 | 124 | 5.564 | 45,715.116 | 124 | 6.185 | 42,894.729 |
| 125 | 6.247 | 54,274.031 | 125 | 6.811 | 49,982.513 | 125 | 8.683 | 40,663.412 | 130 | 4.670 | 47,357.395 | 125 | 7.274 | 45,715.116 | 125 | 7.259 | 42,894.729 |
| 126 | 5.777 | 53,860.348 | 126 | 6.975 | 49,982.513 | 126 | 6.519 | 40,228.110 | 131 | 7.743 | 46,839.879 | 126 | 7.637 | 45,715.116 | 126 | 4.500 | 42,712.031 |
| 127 | 5.918 | 53,860.348 | 127 | 7.126 | 49,982.513 | 127 | 6.420 | 40,083.604 | 132 | 5.000 | 46,674.993 | 127 | 5.213 | 45,534.446 | 127 | 7.419 | 42,530.727 |
| 128 | 6.012 | 53,860.348 | 128 | 7.288 | 49,982.513 | 128 | 4.927 | 39,795.497 | 133 | 4.390 | 46,513.347 | 128 | 5.100 | 44,823.742 | 128 | 4.800 | 42,172.247 |
| 129 | 5.660 | 53,460.347 | 129 | 4.545 | 49,726.769 | 129 | 5.419 | 39,508.607 | 134 | 5.684 | 46,513.347 | 129 | 4.187 | 44,473.603 | 129 | 5.446 | 42,172.247 |
| 130 | 6.730 | 53,073.651 | 130 | 5.125 | 49,726.769 | 130 | 5.530 | 39,508.607 | 135 | 2.988 | 46,044.439 | 130 | 4.312 | 44,299.716 | 130 | 8.650 | 42,172.247 |
| 131 | 9.225 | 53,073.651 | 131 | 6.126 | 49,726.769 | 131 | 7.951 | 39,508.607 | 136 | 6.278 | 46,044.439 | 131 | 6.851 | 44,126.612 | 131 | 4.925 | 41,995.047 |
| 132 | 3.187 | 52,699.885 | 132 | 4.621 | 49,235.368 | 132 | 5.172 | 39,365.623 | 137 | 6.674 | 46,044.439 | 132 | 5.401 | 43,954.288 | 132 | 7.185 | 41,644.660 |
| 133 | 6.977 | 52,699.885 | 133 | 4.697 | 49,235.368 | 133 | 5.678 | 39,365.623 | 139 | 6.470 | 45,741.777 | 133 | 8.338 | 43,782.742 | 133 | 5.729 | 41,471.449 |
| 134 | 5.201 | 51,989.638 | 134 | 5.226 | 49,235.368 | 134 | 5.926 | 39,365.623 | 140 | 6.807 | 45,741.777 | 134 | 8.600 | 43,782.742 | 134 | 6.457 | 41,299.542 |
| 135 | 6.141 | 51,989.638 | 135 | 5.937 | 48,999.168 | 135 | 7.334 | 39,080.587 | 141 | 4.792 | 45,592.404 | 135 | 6.963 | 43,611.969 | 135 | 5.631 | 41,128.927 |
| 136 | 6.318 | 51,989.638 | 136 | 6.481 | 48,999.168 | 136 | 8.719 | 39,080.587 | 142 | 5.526 | 45,592.404 | 136 | 3.175 | 43,441.968 | 136 | 5.914 | 40,791.520 |
| 137 | 6.529 | 51,989.638 | 137 | 4.798 | 48,544.408 | 137 | 4.646 | 38,796.805 | 143 | 7.133 | 45,443.881 | 137 | 8.138 | 43,441.968 | 137 | 8.037 | 40,791.520 |
| 138 | 8.512 | 51,989.638 | 138 | 3.075 | 48,111.360 | 138 | 4.853 | 38,796.805 | 144 | 4.622 | 45,295.867 | 138 | 7.925 | 43,272.733 | 138 | 8.312 | 40,459.128 |
| 139 | 8.607 | 51,989.638 | 139 | 4.672 | 48,111.360 | 139 | 6.568 | 38,796.805 | 145 | 5.903 | 45,148.021 | 139 | 7.712 | 43,104.264 | 139 | 8.537 | 40,294.780 |
| 140 | 8.703 | 51,989.638 | 140 | 5.300 | 48,111.360 | 140 | 8.671 | 38,373.517 | 146 | 7.621 | 44,851.523 | 140 | 4.975 | 42,936.555 | 140 | 5.618 | 39,022.682 |
| 141 | 7.493 | 51,652.405 | 141 | 5.462 | 48,111.360 | 141 | 5.406 | 37,953.134 | 147 | 4.536 | 44,702.545 | 141 | 7.062 | 42,936.555 | 141 | 6.086 | 38,413.768 |
| 142 | 8.036 | 51,652.405 | 142 | 5.612 | 48,111.360 | 142 | 7.346 | 37,953.134 | 148 | 5.574 | 44,702.545 | 142 | 8.675 | 42,936.555 | 142 | 9.606 | 38,413.768 |
| 143 | 8.107 | 51,652.405 | 143 | 4.924 | 47,902.299 | 143 | 8.878 | 37,953.134 | 149 | 7.511 | 44,702.545 | 143 | 5.814 | 42,437.963 | 143 | 3.074 | 37,821.858 |
| 144 | 5.648 | 51,326.598 | 144 | 5.749 | 47,902.299 | 144 | 7.557 | 37,674.517 | 150 | 4.329 | 44,403.143 | 144 | 4.375 | 42,273.266 | 144 | 6.432 | 37,676.443 |
| 145 | 6.635 | 51,326.598 | 145 | 6.126 | 47,902.299 | 145 | 6.222 | 37,535.706 | 151 | 3.366 | 44,252.748 | 145 | 6.161 | 42,273.266 | 145 | 5.421 | 37,388.596 |
| 146 | 6.835 | 51,326.598 | 146 | 5.837 | 47,697.850 | 146 | 4.695 | 37,121.284 | 152 | 4.622 | 43,798.959 | 146 | 7.399 | 42,273.266 | 146 | 5.791 | 37,388.596 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 147 | 7.070 | 51,326.598 | 147 | 5.900 | 47,697.850 | 147 | 6.124 | 36,983.819 | 153 | 6.855 | 43,798.959 | 147 | 4.512 | 42,109.315 | 147 | 6.704 | 37,388.596 |
| 148 | 7.552 | 51,326.598 | 148 | 4.735 | 46,920.756 | 148 | 5.703 | 36,846.696 | 154 | 5.086 | 43,646.875 | 148 | 6.728 | 42,109.315 | 148 | 4.387 | 37,246.140 |
| 149 | 8.309 | 51,326.598 | 149 | 4.836 | 46,920.756 | 149 | 7.272 | 36,437.392 | 155 | 4.780 | 43,494.406 | 149 | 7.199 | 42,109.315 | 149 | 8.700 | 36,824.487 |
| 150 | 6.035 | 51,011.839 | 150 | 6.278 | 46,920.756 | 150 | 5.493 | 36,031.227 | 156 | 8.549 | 43,494.406 | 150 | 4.775 | 41,946.105 | 150 | 9.062 | 36,824.487 |
| 151 | 6.223 | 51,011.839 | 151 | 9.414 | 46,920.756 | 151 | 6.124 | 36,031.227 | 157 | 4.427 | 43,188.368 | 151 | 4.862 | 41,621.897 | 151 | 8.988 | 36,411.140 |
| 152 | 7.376 | 51,011.839 | 152 | 3.100 | 46,735.299 | 152 | 7.111 | 36,031.227 | 158 | 7.633 | 43,188.368 | 152 | 6.074 | 41,460.894 | 152 | 4.513 | 36,275.144 |
| 153 | 7.787 | 51,011.839 | 153 | 5.125 | 46,735.299 | 153 | 7.000 | 35,361.393 | 159 | 7.866 | 43,188.368 | 153 | 8.275 | 41,300.619 | 153 | 5.557 | 36,140.021 |
| 154 | 7.882 | 51,011.839 | 154 | 6.519 | 46,735.299 | 154 | 6.778 | 35,228.509 | 160 | 5.452 | 42,880.959 | 154 | 5.326 | 41,141.069 | 154 | 7.715 | 36,140.021 |
| 155 | 5.930 | 50,707.755 | 155 | 5.226 | 46,552.825 | 155 | 7.359 | 35,095.990 | 161 | 8.659 | 42,880.959 | 155 | 7.536 | 40,824.135 | 155 | 6.988 | 36,005.757 |
| 156 | 5.024 | 50,413.967 | 156 | 5.612 | 46,552.825 | 156 | 8.817 | 34,832.056 | 162 | 6.386 | 42,726.776 | 156 | 7.812 | 40,824.135 | 156 | 4.387 | 35,477.040 |
| 157 | 5.777 | 50,413.967 | 157 | 6.088 | 46,373.063 | 157 | 6.099 | 34,700.644 | 163 | 7.158 | 42,726.776 | 157 | 8.088 | 40,666.743 | 157 | 7.517 | 35,477.040 |
| 158 | 6.318 | 49,855.780 | 158 | 6.798 | 46,373.063 | 158 | 5.567 | 34,569.605 | 164 | 4.512 | 42,572.293 | 158 | 8.388 | 40,666.743 | 158 | 6.296 | 35,217.507 |
| 159 | 6.482 | 49,855.780 | 159 | 4.570 | 46,020.589 | 159 | 5.728 | 34,569.605 | 165 | 6.085 | 42,572.293 | 159 | 5.888 | 40,510.064 | 159 | 6.605 | 35,088.902 |
| 160 | 6.706 | 49,855.780 | 160 | 5.425 | 46,020.589 | 160 | 4.756 | 34,308.652 | 166 | 7.328 | 42,417.526 | 160 | 8.613 | 40,510.064 | 160 | 8.237 | 35,088.902 |
| 161 | 6.965 | 49,855.780 | 161 | 5.925 | 46,020.589 | 161 | 5.901 | 34,308.652 | 167 | 7.694 | 42,417.526 | 161 | 5.050 | 38,981.770 | 161 | 8.613 | 34,961.056 |
| 162 | 7.153 | 49,855.780 | 162 | 7.063 | 46,020.589 | 162 | 4.951 | 34,178.742 | 168 | 5.171 | 42,107.192 | 162 | 9.412 | 37,664.312 | 162 | 5.470 | 33,964.032 |
| 163 | 6.871 | 49,590.628 | 163 | 6.975 | 45,847.332 | 163 | 4.609 | 33,920.064 | 169 | 4.914 | 41,951.656 | 163 | 4.200 | 37,378.758 | 163 | 7.185 | 33,842.432 |
| 164 | 7.882 | 49,590.628 | 164 | 5.113 | 45,505.425 | 164 | 6.642 | 33,920.064 | 170 | 5.318 | 41,639.914 | 164 | 8.713 | 37,378.758 | 164 | 4.850 | 33,721.463 |
| 165 | 7.282 | 49,334.270 | 165 | 6.139 | 45,336.230 | 165 | 6.815 | 33,791.300 | 171 | 7.121 | 41,639.914 | 165 | 9.062 | 37,378.758 | 165 | 5.889 | 33,481.365 |
| 166 | 7.669 | 49,334.270 | 166 | 4.507 | 45,000.000 | 166 | 6.963 | 33,662.921 | 172 | 8.269 | 41,639.914 | 166 | 6.395 | 37,095.772 | 166 | 6.988 | 33,362.211 |
| 167 | 7.953 | 49,334.270 | 167 | 5.475 | 45,000.000 | 167 | 7.495 | 33,662.921 | 173 | 5.098 | 41,327.377 | 167 | 6.691 | 36,955.234 | 167 | 4.513 | 33,243.637 |
| 168 | 8.024 | 49,334.270 | 168 | 7.463 | 45,000.000 | 168 | 7.124 | 33,534.929 | 174 | 5.855 | 41,327.377 | 168 | 8.275 | 36,955.234 | 168 | 7.542 | 33,243.637 |
| 169 | 8.190 | 49,334.270 | 169 | 5.600 | 44,832.468 | 169 | 4.646 | 33,153.298 | 175 | 6.036 | 41,327.377 | 169 | 7.186 | 36,537.401 | 169 | 8.913 | 33,125.630 |
| 170 | 8.560 | 49,334.270 | 170 | 7.238 | 44,832.468 | 170 | 4.743 | 33,026.875 | 176 | 6.458 | 41,170.846 | 170 | 7.712 | 36,537.401 | 170 | 9.149 | 33,008.177 |
| 171 | 8.726 | 49,334.270 | 171 | 4.380 | 44,498.222 | 171 | 7.049 | 32,900.848 | 177 | 5.635 | 41,014.160 | 171 | 4.300 | 36,261.963 | 171 | 6.346 | 32,659.016 |
| 172 | 7.493 | 49,086.328 | 172 | 4.634 | 44,165.093 | 172 | 5.579 | 32,775.220 | 178 | 5.220 | 40,700.379 | 172 | 5.464 | 35,988.991 | 172 | 5.754 | 32,543.653 |
| 173 | 7.787 | 49,086.328 | 173 | 9.402 | 44,165.093 | 173 | 6.519 | 32,649.992 | 179 | 8.037 | 40,228.900 | 173 | 6.988 | 35,718.457 | 173 | 4.387 | 32,428.780 |
| 174 | 8.404 | 49,086.328 | 174 | 6.570 | 43,998.958 | 174 | 6.827 | 32,649.992 | 180 | 6.831 | 40,071.582 | 174 | 4.212 | 35,584.097 | 174 | 4.500 | 32,314.386 |
| 175 | 8.476 | 49,086.328 | 175 | 5.125 | 43,833.114 | 175 | 4.658 | 32,400.745 | 181 | 7.012 | 40,071.582 | 175 | 7.486 | 35,584.097 | 175 | 7.690 | 32,314.386 |
| 176 | 3.152 | 48,846.428 | 176 | 5.238 | 43,833.114 | 176 | 4.731 | 32,400.745 | 182 | 7.158 | 40,071.582 | 176 | 8.663 | 35,317.174 | 176 | 8.350 | 32,314.386 |
| 177 | 8.297 | 48,614.192 | 177 | 5.887 | 43,833.114 | 177 | 4.305 | 32,276.729 | 183 | 4.890 | 39,756.798 | 177 | 6.247 | 34,790.425 | 177 | 4.437 | 31,193.933 |
| 178 | 9.296 | 48,389.245 | 178 | 7.625 | 43,833.114 | 178 | 5.357 | 31,784.761 | 184 | 8.330 | 39,756.798 | 178 | 9.437 | 34,530.548 | 178 | 4.287 | 30,974.307 |
| 179 | 6.741 | 48,171.211 | 179 | 6.164 | 43,667.565 | 179 | 7.557 | 31,662.803 | 185 | 8.561 | 39,441.910 | 179 | 7.549 | 33,638.901 | 179 | 5.000 | 30,430.492 |
| 180 | 6.129 | 47,959.714 | 180 | 3.087 | 43,502.317 | 180 | 5.074 | 31,541.261 | 186 | 4.683 | 39,284.463 | 180 | 6.988 | 33,513.755 | 180 | 4.825 | 30,322.527 |
| 181 | 6.012 | 47,554.827 | 181 | 3.349 | 43,502.317 | 181 | 6.259 | 31,420.138 | 187 | 6.710 | 38,812.283 | 181 | 4.712 | 33,389.159 | 181 | 5.618 | 30,214.798 |
| 182 | 6.388 | 47,554.827 | 182 | 5.575 | 43,502.317 | 182 | 7.161 | 31,420.138 | 188 | 5.086 | 38,183.622 | 182 | 4.787 | 33,389.159 | 182 | 7.148 | 29,786.015 |
| 183 | 7.823 | 47,554.827 | 183 | 6.861 | 43,502.317 | 183 | 7.000 | 31,299.436 | 190 | 5.428 | 38,026.716 | 183 | 8.913 | 32,896.193 | 183 | 8.925 | 29,786.015 |
| 184 | 5.012 | 47,360.684 | 184 | 4.190 | 43,337.371 | 184 | 4.865 | 30,702.298 | 191 | 5.648 | 37,713.316 | 184 | 7.712 | 32,652.917 | 184 | 4.350 | 29,679.328 |
| 185 | 5.636 | 47,360.684 | 185 | 5.338 | 43,337.371 | 185 | 5.678 | 30,702.298 | 192 | 5.988 | 37,556.850 | 185 | 8.375 | 32,411.746 | 185 | 6.741 | 29,254.671 |
| 186 | 5.753 | 47,171.573 | 186 | 6.481 | 43,337.371 | 186 | 6.407 | 30,702.298 | 193 | 4.890 | 36,932.888 | 186 | 6.321 | 32,291.941 | 186 | 4.600 | 29,149.045 |
| 187 | 5.883 | 47,171.573 | 187 | 5.425 | 43,008.407 | 187 | 7.557 | 30,584.158 | 194 | 5.452 | 36,777.445 | 187 | 4.187 | 31,007.461 | 187 | 5.075 | 29,149.045 |
| 188 | 6.506 | 46,806.946 | 188 | 8.595 | 43,008.407 | 188 | 5.456 | 30,466.452 | 195 | 5.757 | 36,777.445 | 188 | 4.287 | 31,007.461 | 188 | 4.900 | 29,043.640 |
| 189 | 6.730 | 46,806.946 | 189 | 8.823 | 43,008.407 | 189 | 7.359 | 30,349.181 | 196 | 6.807 | 36,777.445 | 189 | 4.100 | 30,893.640 | 189 | 7.542 | 29,043.640 |
| 190 | 7.634 | 46,806.946 | 190 | 4.367 | 42,844.397 | 190 | 4.439 | 30,000.000 | 197 | 4.244 | 36,622.249 | 190 | 7.124 | 29,781.177 | 190 | 5.618 | 28,938.458 |
| 191 | 8.071 | 46,806.946 | 191 | 6.038 | 42,844.397 | 191 | 7.198 | 30,000.000 | 198 | 6.338 | 36,312.658 | 191 | 4.650 | 29,564.153 | 191 | 7.099 | 28,938.458 |
| 192 | 6.953 | 46,630.677 | 192 | 7.263 | 42,844.397 | 192 | 6.617 | 29,769.421 | 199 | 5.489 | 36,158.292 | 192 | 4.112 | 29,456.314 | 192 | 8.938 | 28,624.282 |
| 193 | 9.284 | 46,630.677 | 193 | 4.545 | 42,680.706 | 193 | 6.778 | 29,654.796 | 200 | 9.268 | 36,158.292 | 193 | 4.187 | 29,456.314 | 193 | 6.617 | 28,520.022 |
| 194 | 5.260 | 46,457.937 | 194 | 9.452 | 42,680.706 | 194 | 6.926 | 29,540.614 | 201 | 7.438 | 36,004.231 | 194 | 4.512 | 29,241.975 | 194 | 5.520 | 28,416.000 |
| 195 | 6.282 | 46,457.937 | 195 | 4.266 | 42,354.298 | 195 | 5.160 | 29,426.874 | 202 | 6.638 | 35,850.489 | 195 | 4.387 | 29,135.474 | 195 | 6.160 | 28,312.218 |
| 196 | 6.435 | 46,457.937 | 196 | 5.649 | 42,354.298 | 196 | 4.622 | 29,200.726 | 203 | 9.000 | 35,850.489 | 196 | 7.074 | 28,818.629 | 196 | 5.692 | 28,208.680 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 197 | 7.423 | 46,457.937 | 197 | 5.799 | 42,354.298 | 197 | 6.469 | 29,088.317 | 204 | 6.927 | 35,697.082 | 197 | 7.374 | 28,818.629 | 197 | 7.369 | 28,208.680 |
| 198 | 7.493 | 46,457.937 | 198 | 6.608 | 42,191.590 | 198 | 7.136 | 29,088.317 | 205 | 7.133 | 35,697.082 | 198 | 7.524 | 28,713.897 | 198 | 6.494 | 28,105.388 |
| 199 | 6.624 | 46,288.349 | 199 | 7.351 | 42,191.590 | 199 | 5.394 | 28,643.115 | 206 | 8.269 | 35,697.082 | 199 | 5.213 | 28,299.359 | 199 | 5.012 | 28,002.344 |
| 200 | 8.000 | 46,288.349 | 200 | 4.861 | 42,029.218 | 200 | 6.025 | 28,643.115 | 207 | 7.707 | 35,544.022 | 200 | 6.580 | 28,196.817 | 200 | 5.298 | 28,002.344 |
| 201 | 7.247 | 46,121.537 | 201 | 5.300 | 42,029.218 | 201 | 7.767 | 28,643.115 | 208 | 8.695 | 35,391.326 | 201 | 5.589 | 28,094.710 | 201 | 4.838 | 27,899.552 |
| 202 | 8.893 | 46,121.537 | 202 | 5.912 | 41,867.185 | 202 | 5.542 | 28,532.923 | 209 | 5.428 | 35,239.007 | 202 | 6.124 | 27,891.796 | 202 | 6.605 | 27,797.015 |
| 203 | 6.388 | 45,957.125 | 203 | 6.101 | 41,867.185 | 203 | 6.395 | 28,532.923 | 210 | 5.086 | 34,935.558 | 203 | 7.299 | 27,690.609 | 203 | 9.693 | 27,797.015 |
| 204 | 6.518 | 45,633.998 | 204 | 4.987 | 41,705.496 | 204 | 4.902 | 28,313.872 | 211 | 5.574 | 34,935.558 | 204 | 4.787 | 27,590.661 | 204 | 6.914 | 27,592.715 |
| 205 | 7.717 | 45,633.998 | 205 | 5.226 | 41,705.496 | 205 | 6.963 | 28,096.597 | 212 | 9.293 | 34,633.791 | 205 | 4.925 | 27,590.661 | 205 | 7.123 | 27,592.715 |
| 206 | 4.727 | 45,474.530 | 206 | 4.202 | 41,544.155 | 206 | 4.634 | 27,881.099 | 213 | 4.792 | 33,887.487 | 206 | 8.000 | 27,491.142 | 206 | 7.963 | 27,490.957 |
| 207 | 7.411 | 45,474.530 | 207 | 5.413 | 41,222.532 | 207 | 6.210 | 27,774.016 | 214 | 5.391 | 33,887.487 | 207 | 8.500 | 27,491.142 | 207 | 8.450 | 27,490.957 |
| 208 | 7.622 | 45,474.530 | 208 | 5.500 | 41,222.532 | 208 | 5.037 | 27,561.183 | 215 | 8.439 | 33,445.844 | 208 | 7.074 | 27,392.051 | 208 | 6.383 | 27,187.291 |
| 209 | 5.036 | 45,315.959 | 209 | 6.303 | 41,222.532 | 209 | 5.283 | 27,245.269 | 216 | 5.599 | 33,299.740 | 209 | 6.334 | 27,097.335 | 209 | 6.778 | 27,187.291 |
| 210 | 5.189 | 45,315.959 | 210 | 6.962 | 41,222.532 | 210 | 6.506 | 27,140.853 | 217 | 5.769 | 33,154.214 | 210 | 4.937 | 26,902.978 | 210 | 6.000 | 26,686.699 |
| 211 | 6.741 | 45,315.959 | 211 | 7.925 | 41,062.258 | 211 | 5.728 | 26,625.451 | 218 | 4.402 | 32,435.772 | 211 | 6.728 | 26,902.978 | 211 | 4.900 | 26,389.780 |
| 212 | 8.536 | 45,315.959 | 212 | 4.316 | 40,902.348 | 212 | 5.209 | 26,422.406 | 219 | 8.366 | 32,435.772 | 212 | 9.575 | 26,902.978 | 212 | 5.137 | 26,291.396 |
| 213 | 5.130 | 45,157.908 | 213 | 6.139 | 40,902.348 | 213 | 7.495 | 26,021.663 | 220 | 7.523 | 32,294.021 | 213 | 7.299 | 26,142.346 | 213 | 5.285 | 26,291.396 |
| 214 | 4.631 | 44,841.925 | 214 | 8.544 | 40,902.348 | 214 | 6.161 | 25,922.591 | 221 | 9.293 | 32,294.021 | 214 | 5.013 | 26,049.140 | 214 | 5.667 | 25,611.248 |
| 215 | 5.753 | 44,841.925 | 215 | 5.100 | 40,742.806 | 215 | 4.719 | 25,823.965 | 222 | 6.879 | 32,152.951 | 215 | 5.150 | 25,863.965 | 215 | 6.321 | 25,515.338 |
| 216 | 6.353 | 44,841.925 | 216 | 5.724 | 40,742.806 | 216 | 5.517 | 25,628.051 | 223 | 7.109 | 31,872.906 | 216 | 5.576 | 25,589.281 | 216 | 5.037 | 25,229.550 |
| 217 | 6.941 | 44,525.122 | 217 | 4.710 | 40,583.636 | 217 | 5.012 | 24,956.407 | 224 | 5.061 | 31,595.752 | 217 | 4.625 | 25,318.267 | 217 | 5.199 | 25,134.944 |
| 218 | 4.488 | 44,366.416 | 218 | 5.188 | 40,424.842 | 218 | 8.293 | 24,862.244 | 225 | 6.506 | 31,595.752 | 218 | 4.775 | 25,228.740 | 218 | 9.680 | 25,040.671 |
| 219 | 5.460 | 44,366.416 | 219 | 4.811 | 39,950.755 | 219 | 7.173 | 24,490.058 | 226 | 7.658 | 31,458.296 | 219 | 4.937 | 25,050.897 | 219 | 4.800 | 24,853.135 |
| 220 | 5.577 | 44,366.416 | 220 | 5.575 | 39,950.755 | 220 | 5.505 | 24,398.129 | 227 | 4.207 | 31,050.580 | 220 | 5.238 | 25,050.897 | 220 | 5.112 | 24,759.878 |
| 221 | 6.118 | 44,366.416 | 221 | 5.774 | 39,950.755 | 221 | 5.147 | 24,125.025 | 228 | 5.342 | 30,916.274 | 221 | 6.272 | 25,050.897 | 221 | 4.963 | 24,666.965 |
| 222 | 6.835 | 44,366.416 | 222 | 4.659 | 39,793.505 | 222 | 7.693 | 24,125.025 | 229 | 5.623 | 30,782.791 | 222 | 7.837 | 25,050.897 | 222 | 8.537 | 24,574.400 |
| 223 | 8.214 | 44,366.416 | 223 | 5.674 | 39,793.505 | 223 | 5.295 | 23,767.149 | 230 | 4.756 | 30,257.386 | 223 | 5.075 | 24,962.578 | 223 | 5.643 | 24,390.321 |
| 224 | 9.248 | 44,366.416 | 224 | 4.735 | 39,636.650 | 224 | 4.951 | 23,243.767 | 231 | 5.745 | 30,257.386 | 224 | 8.563 | 24,700.023 | 224 | 7.888 | 23,056.614 |
| 225 | 7.023 | 44,207.522 | 225 | 4.861 | 39,636.650 | 225 | 7.161 | 23,158.105 | 232 | 6.807 | 30,000.000 | 225 | 4.750 | 24,613.302 | 225 | 7.369 | 22,134.890 |
| 226 | 8.583 | 44,207.522 | 226 | 6.659 | 39,636.650 | 226 | 5.530 | 23,072.890 | 233 | 5.073 | 29,746.284 | 226 | 4.862 | 24,613.302 | 226 | 5.396 | 21,419.153 |
| 227 | 7.247 | 44,048.451 | 227 | 7.100 | 39,636.650 | 227 | 5.025 | 22,407.323 | 234 | 4.219 | 29,496.219 | 227 | 9.475 | 24,613.302 | 227 | 4.788 | 19,963.205 |
| 228 | 7.953 | 44,048.451 | 228 | 5.413 | 39,324.146 | 228 | 5.295 | 21,927.000 | 235 | 7.719 | 29,372.540 | 228 | 5.013 | 24,441.048 | 228 | 4.638 | 19,761.719 |
| 229 | 5.389 | 43,889.213 | 229 | 5.975 | 39,168.504 | 229 | 5.703 | 20,304.368 | 236 | 9.305 | 29,372.540 | 229 | 5.526 | 24,185.626 | 229 | 6.222 | 19,761.719 |
| 230 | 7.728 | 43,889.213 | 230 | 5.350 | 39,013.274 | 230 | 5.740 | 19,768.331 | 237 | 7.061 | 29,249.757 | 230 | 7.324 | 24,101.270 | 230 | 3.172 | 19,564.575 |
| 231 | 5.648 | 43,729.820 | 231 | 4.494 | 38,858.460 | 231 | 4.122 | 19,574.539 | 238 | 4.414 | 29,006.850 | 231 | 5.063 | 23,685.332 | 231 | 5.803 | 19,371.655 |
| 232 | 8.297 | 43,729.820 | 232 | 6.417 | 38,858.460 | 232 | 8.208 | 18,955.224 | 239 | 5.489 | 29,006.850 | 232 | 7.862 | 23,198.925 | 232 | 3.172 | 18,698.498 |
| 233 | 4.333 | 43,570.283 | 233 | 4.380 | 38,704.066 | 233 | 4.792 | 18,544.521 | 240 | 5.794 | 28,886.715 | 233 | 7.311 | 22,266.902 | 233 | 5.248 | 18,352.496 |
| 234 | 6.565 | 43,570.283 | 234 | 6.544 | 38,550.097 | 234 | 5.221 | 18,487.288 | 241 | 5.073 | 28,531.514 | 234 | 9.525 | 21,387.826 | 234 | 8.450 | 18,296.190 |
| 235 | 7.811 | 43,410.612 | 235 | 5.900 | 38,396.556 | 235 | 8.768 | 18,487.288 | 242 | 7.255 | 28,414.828 | 235 | 9.537 | 20,426.840 | 235 | 5.025 | 18,240.261 |
| 236 | 8.667 | 43,410.612 | 236 | 4.987 | 38,090.774 | 236 | 8.122 | 18,261.789 | 243 | 4.780 | 28,298.990 | 236 | 5.764 | 20,164.691 | 236 | 4.825 | 18,129.518 |
| 237 | 9.296 | 43,410.612 | 237 | 9.414 | 38,090.774 | 237 | 5.037 | 18,151.045 | 244 | 6.988 | 28,298.990 | 237 | 4.712 | 20,035.645 | 237 | 4.663 | 18,074.694 |
| 238 | 5.742 | 43,250.820 | 238 | 5.487 | 37,938.541 | 238 | 7.445 | 17,826.450 | 245 | 7.426 | 28,298.990 | 238 | 4.350 | 19,844.570 | 238 | 7.616 | 17,393.116 |
| 239 | 6.259 | 43,250.820 | 239 | 7.375 | 37,786.753 | 239 | 7.803 | 17,773.423 | 246 | 5.501 | 28,183.993 | 239 | 4.550 | 19,844.570 | 239 | 8.025 | 17,293.039 |
| 240 | 7.434 | 43,250.820 | 240 | 4.291 | 37,635.413 | 240 | 7.223 | 17,720.692 | 247 | 5.232 | 27,732.302 | 240 | 6.186 | 19,781.530 | 240 | 5.643 | 16,762.680 |
| 241 | 6.824 | 43,090.915 | 241 | 8.810 | 37,635.413 | 241 | 7.656 | 17,720.692 | 248 | 6.795 | 27,621.424 | 241 | 5.789 | 19,594.327 | 241 | 7.431 | 16,531.782 |
| 242 | 5.812 | 42,930.911 | 242 | 5.625 | 37,484.525 | 242 | 4.963 | 17,564.231 | 249 | 6.434 | 27,402.079 | 242 | 3.025 | 19,471.089 | 242 | 7.950 | 16,486.291 |
| 243 | 6.129 | 42,930.911 | 243 | 6.354 | 37,484.525 | 243 | 8.805 | 17,359.513 | 250 | 5.574 | 27,185.912 | 243 | 8.475 | 18,756.477 | 243 | 6.370 | 15,956.250 |
| 244 | 4.810 | 42,770.817 | 244 | 9.063 | 37,484.525 | 244 | 7.779 | 17,159.013 | 251 | 6.036 | 27,079.004 | 244 | 4.925 | 18,470.445 | 244 | 7.283 | 15,785.277 |
| 245 | 7.235 | 42,770.817 | 245 | 9.151 | 37,484.525 | 245 | 5.493 | 17,011.253 | 252 | 6.867 | 26,972.873 | 245 | 5.063 | 18,470.445 | 245 | 5.864 | 15,408.883 |
| 246 | 6.353 | 42,610.644 | 246 | 5.325 | 37,334.094 | 246 | 4.585 | 16,962.477 | 253 | 7.036 | 26,867.512 | 246 | 5.263 | 18,470.445 | 246 | 6.259 | 15,326.558 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 247 | 6.988 | 42,610.644 | 247 | 6.570 | 37,334.094 | 247 | 7.581 | 16,913.932 | 254 | 6.290 | 26,555.994 | 247 | 4.575 | 18,357.827 | 247 | 4.162 | 15,163.084 |
| 248 | 8.309 | 42,450.404 | 248 | 6.785 | 37,334.094 | 248 | 4.086 | 16,769.647 | 255 | 8.464 | 26,555.994 | 248 | 4.737 | 18,357.827 | 248 | 4.925 | 15,000.944 |
| 249 | 6.188 | 42,290.108 | 249 | 7.725 | 37,334.094 | 249 | 5.246 | 16,627.304 | 256 | 7.267 | 26,453.655 | 249 | 8.188 | 18,190.744 | 249 | 3.012 | 14,920.286 |
| 250 | 6.529 | 42,290.108 | 250 | 7.887 | 37,334.094 | 250 | 3.495 | 16,580.269 | 257 | 7.976 | 26,453.655 | 250 | 9.512 | 18,080.549 | 250 | 9.680 | 14,839.856 |
| 251 | 7.387 | 42,129.766 | 251 | 8.151 | 37,334.094 | 251 | 4.244 | 16,486.794 | 258 | 7.389 | 26,352.058 | 251 | 4.812 | 17,648.787 | 251 | 8.400 | 14,759.619 |
| 252 | 4.869 | 41,969.390 | 252 | 8.595 | 37,334.094 | 252 | 6.481 | 16,256.394 | 259 | 4.609 | 26,151.062 | 252 | 4.987 | 17,595.780 | 252 | 7.296 | 14,679.540 |
| 253 | 5.519 | 41,969.390 | 253 | 5.950 | 37,184.123 | 253 | 6.235 | 16,165.464 | 260 | 4.853 | 26,151.062 | 253 | 7.637 | 17,542.977 | 253 | 7.542 | 14,679.540 |
| 254 | 5.036 | 41,808.990 | 254 | 5.537 | 37,034.617 | 254 | 7.124 | 16,075.189 | 261 | 5.183 | 25,952.958 | 254 | 8.038 | 17,490.374 | 254 | 9.062 | 14,679.540 |
| 255 | 5.789 | 41,648.578 | 255 | 7.413 | 36,588.924 | 255 | 3.877 | 15,940.935 | 262 | 6.241 | 25,757.700 | 255 | 7.386 | 16,773.287 | 255 | 3.012 | 14,519.715 |
| 256 | 6.635 | 41,648.578 | 256 | 5.263 | 36,441.316 | 256 | 5.456 | 15,852.159 | 263 | 5.903 | 25,661.122 | 256 | 7.950 | 16,673.513 | 256 | 4.900 | 14,519.715 |
| 257 | 7.528 | 41,648.578 | 257 | 9.414 | 36,441.316 | 257 | 4.719 | 15,807.976 | 264 | 5.000 | 25,281.688 | 257 | 3.700 | 16,475.721 | 257 | 4.688 | 14,439.899 |
| 258 | 4.941 | 41,488.164 | 258 | 4.684 | 36,294.192 | 258 | 8.427 | 15,720.002 | 265 | 6.109 | 25,281.688 | 258 | 9.525 | 15,990.318 | 258 | 8.863 | 14,439.899 |
| 259 | 5.977 | 41,488.164 | 259 | 5.512 | 36,294.192 | 259 | 5.777 | 15,545.509 | 266 | 5.562 | 25,188.518 | 259 | 6.309 | 15,894.596 | 259 | 9.285 | 14,439.899 |
| 260 | 6.341 | 41,488.164 | 260 | 6.443 | 36,294.192 | 260 | 6.667 | 15,415.785 | 267 | 7.255 | 24,822.420 | 260 | 7.199 | 15,894.596 | 260 | 8.588 | 14,300.870 |
| 261 | 9.296 | 41,488.164 | 261 | 4.469 | 36,147.556 | 261 | 8.208 | 15,201.443 | 268 | 8.549 | 24,292.357 | 261 | 8.688 | 15,515.414 | 261 | 7.222 | 13,061.739 |
| 262 | 7.247 | 41,167.375 | 262 | 4.608 | 36,147.556 | 262 | 4.988 | 15,116.266 | 269 | 5.000 | 24,206.164 | 262 | 3.775 | 15,280.933 | 262 | 4.925 | 11,426.087 |
| 263 | 6.977 | 41,007.022 | 263 | 5.350 | 36,147.556 | 263 | 5.480 | 15,116.266 | 270 | 6.879 | 23,951.153 | 263 | 3.950 | 15,280.933 | | | |
| 264 | 7.141 | 41,007.022 | 264 | 7.625 | 36,147.556 | 264 | 7.124 | 15,031.360 | 271 | 4.914 | 23,456.655 | 264 | 6.740 | 15,140.974 | | | |
| 265 | 6.553 | 40,846.712 | 265 | 4.367 | 35,710.621 | 265 | 6.259 | 14,946.694 | 272 | 6.217 | 23,456.655 | 265 | 4.600 | 15,001.459 | | | |
| 266 | 8.095 | 40,846.712 | 266 | 5.662 | 35,710.621 | 266 | 7.359 | 14,946.694 | 273 | 7.243 | 23,456.655 | 266 | 4.837 | 14,862.306 | | | |
| 267 | 8.261 | 40,846.712 | 267 | 8.899 | 35,710.621 | 267 | 4.939 | 14,777.953 | 274 | 4.609 | 23,216.849 | 267 | 5.175 | 14,862.306 | | | |
| 268 | 8.357 | 40,526.262 | 268 | 6.126 | 35,565.980 | 268 | 4.804 | 14,693.815 | 275 | 5.513 | 22,827.644 | 268 | 8.413 | 14,862.306 | | | |
| 269 | 6.871 | 40,366.145 | 269 | 5.425 | 35,135.124 | 269 | 8.963 | 14,693.815 | 276 | 7.780 | 22,827.644 | 269 | 7.224 | 14,630.960 | | | |
| 270 | 6.000 | 40,206.114 | 270 | 9.439 | 35,135.124 | 270 | 8.366 | 14,567.806 | 277 | 5.086 | 22,600.145 | 270 | 9.462 | 14,584.749 | | | |
| 271 | 7.223 | 40,206.114 | 271 | 4.987 | 34,992.542 | 271 | 6.864 | 14,349.558 | 278 | 4.866 | 22,303.507 | 271 | 7.499 | 14,538.551 | | | |
| 272 | 7.399 | 40,206.114 | 272 | 7.338 | 34,992.542 | 272 | 5.406 | 14,198.230 | 279 | 9.366 | 22,230.504 | 272 | 4.825 | 14,492.362 | | | |
| 273 | 5.036 | 40,046.180 | 273 | 5.950 | 34,850.484 | 273 | 6.519 | 13,946.018 | 280 | 5.073 | 20,987.759 | 273 | 8.575 | 14,243.119 | | | |
| 274 | 7.059 | 40,046.180 | 274 | 4.443 | 34,567.959 | 274 | 4.780 | 13,845.133 | 281 | 7.866 | 20,987.759 | 274 | 7.511 | 13,040.367 | | | |
| 275 | 8.583 | 40,046.180 | 275 | 7.151 | 34,287.581 | 275 | 5.012 | 13,794.690 | 282 | 5.709 | 20,223.311 | 275 | 7.124 | 12,935.780 | | | |
| 276 | 5.906 | 39,726.648 | 276 | 5.263 | 33,871.111 | 276 | 7.074 | 13,391.150 | 283 | 7.243 | 20,161.522 | 276 | 9.537 | 12,622.018 | | | |
| 277 | 6.223 | 39,726.648 | 277 | 6.583 | 33,871.111 | 277 | 6.012 | 13,290.265 | 284 | 9.354 | 19,977.738 | 277 | 7.774 | 12,203.670 | | | |
| 278 | 7.540 | 39,726.648 | 278 | 5.525 | 33,596.242 | 278 | 4.536 | 12,836.283 | 285 | 5.232 | 19,916.993 | 278 | 4.825 | 11,053.211 | | | |
| 279 | 6.471 | 39,567.072 | 279 | 7.025 | 33,596.242 | 279 | 6.284 | 12,634.513 | 286 | 5.709 | 19,207.178 | | | | | | |
| 280 | 6.647 | 38,612.965 | 280 | 6.101 | 33,459.653 | 280 | 8.439 | 12,483.186 | 287 | 4.963 | 18,977.991 | | | | | | |
| 281 | 6.859 | 38,612.965 | 281 | 9.414 | 33,459.653 | 281 | 5.025 | 11,625.664 | 288 | 5.122 | 18,752.258 | | | | | | |
| 282 | 8.107 | 38,612.965 | 282 | 6.329 | 33,323.633 | 282 | 4.939 | 11,222.124 | 289 | 4.719 | 18,696.348 | | | | | | |
| 283 | 5.636 | 38,454.608 | 283 | 6.621 | 33,323.633 | 283 | 8.853 | 10,969.912 | 290 | 8.464 | 18,365.085 | | | | | | |
| 284 | 6.988 | 38,454.608 | 284 | 5.662 | 33,053.315 | | | | 291 | 5.000 | 18,256.209 | | | | | | |
| 285 | 5.824 | 38,296.469 | 285 | 7.425 | 33,053.315 | | | | 292 | 4.670 | 18,040.658 | | | | | | |
| 286 | 6.141 | 38,296.469 | 286 | 6.836 | 32,919.026 | | | | 293 | 8.159 | 17,987.215 | | | | | | |
| 287 | 6.977 | 37,666.313 | 287 | 5.874 | 32,785.322 | | | | 294 | 9.390 | 17,987.215 | | | | | | |
| 288 | 7.540 | 37,666.313 | 288 | 6.684 | 32,785.322 | | | | 295 | 7.597 | 17,565.711 | | | | | | |
| 289 | 8.238 | 37,666.313 | 289 | 5.188 | 32,519.686 | | | | 296 | 8.024 | 17,565.711 | | | | | | |
| 290 | 4.405 | 37,509.430 | 290 | 6.050 | 32,387.761 | | | | 297 | 7.328 | 17,513.742 | | | | | | |
| 291 | 9.307 | 37,509.430 | 291 | 6.177 | 32,256.438 | | | | 298 | 5.526 | 17,002.016 | | | | | | |
| 292 | 6.494 | 37,352.830 | 292 | 5.537 | 31,866.115 | | | | 299 | 5.245 | 16,851.105 | | | | | | |
| 293 | 4.976 | 37,196.524 | 293 | 7.562 | 31,866.115 | | | | 300 | 2.939 | 16,701.283 | | | | | | |
| 294 | 5.894 | 37,196.524 | 294 | 9.464 | 31,866.115 | | | | 301 | 7.328 | 16,355.576 | | | | | | |
| 295 | 4.500 | 36,884.843 | 295 | 4.380 | 31,737.236 | | | | 302 | 4.561 | 16,306.598 | | | | | | |
| 296 | 6.800 | 36,884.843 | 296 | 6.937 | 31,737.236 | | | | 303 | 9.415 | 16,306.598 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 297 | 7.070 | 36,884.843 | 297 | 7.163 | 31,608.979 | | 304 | 7.951 | 16,257.714 | | |
| 298 | 7.258 | 36,884.843 | 298 | 7.063 | 31,481.347 | | 305 | 6.302 | 16,111.609 | | |
| 299 | 8.988 | 36,884.843 | 299 | 6.443 | 31,354.344 | | 306 | 6.759 | 15,966.273 | | |
| 300 | 7.564 | 36,729.489 | 300 | 4.000 | 31,102.243 | | 307 | 7.182 | 15,917.987 | | |
| 301 | 7.811 | 36,574.473 | 301 | 4.076 | 30,977.152 | | 309 | 5.379 | 15,725.581 | | |
| 302 | 8.715 | 36,574.473 | 302 | 4.962 | 30,852.707 | | 310 | 8.732 | 15,677.651 | | |
| 303 | 5.648 | 36,419.808 | 303 | 5.238 | 30,605.769 | | 311 | 4.670 | 15,581.982 | | |
| 304 | 6.376 | 36,419.808 | 304 | 5.724 | 30,483.284 | | 312 | 4.024 | 15,438.917 | | |
| 305 | 8.131 | 36,419.808 | 305 | 5.550 | 30,361.461 | | 313 | 6.710 | 15,343.806 | | |
| 306 | 8.297 | 36,419.808 | 306 | 6.076 | 30,361.461 | | 314 | 4.902 | 15,296.322 | | |
| 307 | 4.369 | 36,265.503 | 307 | 6.278 | 30,000.000 | | 315 | 6.097 | 15,296.322 | | |
| 308 | 6.659 | 36,111.570 | 308 | 7.063 | 29,880.862 | | 316 | 6.952 | 15,248.884 | | |
| 309 | 5.742 | 35,804.863 | 309 | 9.439 | 29,880.862 | | 317 | 4.695 | 14,965.068 | | |
| 310 | 7.106 | 35,804.863 | 310 | 5.525 | 29,762.398 | | 318 | 5.416 | 14,965.068 | | |
| 311 | 5.918 | 35,347.866 | 311 | 5.625 | 29,762.398 | | 319 | 8.427 | 14,917.879 | | |
| 312 | 9.319 | 35,347.866 | 312 | 5.749 | 29,762.398 | | 320 | 7.853 | 14,729.360 | | |
| 313 | 6.376 | 35,196.394 | 313 | 7.612 | 29,644.606 | | 321 | 9.378 | 14,729.360 | | |
| 314 | 8.261 | 35,196.394 | 314 | 5.400 | 29,527.482 | | 322 | 7.194 | 14,682.278 | | |
| 315 | 8.643 | 35,196.394 | 315 | 4.912 | 29,180.092 | | 323 | 7.450 | 14,494.067 | | |
| 316 | 7.799 | 35,045.371 | 316 | 7.000 | 29,065.612 | | 324 | 8.610 | 14,348.182 | | |
| 317 | 4.369 | 34,744.716 | 317 | 4.114 | 28,951.786 | | 325 | 8.378 | 13,881.818 | | |
| 318 | 6.788 | 34,595.105 | 318 | 4.202 | 28,951.786 | | 326 | 6.012 | 13,311.818 | | |
| 319 | 5.624 | 34,445.986 | 319 | 5.226 | 28,951.786 | | 327 | 7.133 | 13,104.545 | | |
| 320 | 7.070 | 34,445.986 | 320 | 5.724 | 28,726.082 | | 328 | 9.451 | 13,104.545 | | |
| 321 | 6.682 | 34,297.371 | 321 | 6.151 | 28,726.082 | | 329 | 7.780 | 12,430.909 | | |
| 322 | 7.458 | 34,297.371 | 322 | 6.583 | 28,726.082 | | 330 | 4.890 | 11,912.727 | | |
| 323 | 8.440 | 34,149.271 | 323 | 5.038 | 28,502.956 | | | | | | |
| 324 | 5.800 | 34,001.696 | 324 | 7.238 | 28,392.352 | | | | | | |
| 325 | 5.918 | 34,001.696 | 325 | 4.874 | 28,282.383 | | | | | | |
| 326 | 4.988 | 33,854.658 | 326 | 6.950 | 28,282.383 | | | | | | |
| 327 | 6.141 | 33,708.167 | 327 | 9.464 | 28,173.046 | | | | | | |
| 328 | 7.611 | 33,708.167 | 328 | 4.672 | 28,064.339 | | | | | | |
| 329 | 6.447 | 33,562.235 | 329 | 4.987 | 27,956.259 | | | | | | |
| 330 | 7.023 | 33,416.872 | 330 | 5.150 | 27,956.259 | | | | | | |
| 331 | 7.340 | 33,416.872 | 331 | 6.468 | 27,956.259 | | | | | | |
| 332 | 9.307 | 33,416.872 | 332 | 3.912 | 27,848.801 | | | | | | |
| 333 | 8.369 | 33,127.899 | 333 | 5.300 | 27,848.801 | | | | | | |
| 334 | 7.434 | 32,984.311 | 334 | 5.475 | 27,848.801 | | | | | | |
| 335 | 7.235 | 32,841.336 | 335 | 4.215 | 27,635.744 | | | | | | |
| 336 | 7.764 | 32,841.336 | 336 | 4.278 | 27,635.744 | | | | | | |
| 337 | 4.369 | 32,698.985 | 337 | 5.600 | 27,635.744 | | | | | | |
| 338 | 8.786 | 32,698.985 | 338 | 7.363 | 27,635.744 | | | | | | |
| 339 | 6.694 | 32,557.270 | 339 | 5.987 | 27,425.144 | | | | | | |
| 340 | 4.536 | 32,416.201 | 340 | 6.392 | 27,425.144 | | | | | | |
| 341 | 4.667 | 32,416.201 | 341 | 7.188 | 27,425.144 | | | | | | |
| 342 | 5.283 | 32,136.045 | 342 | 4.570 | 27,113.798 | | | | | | |
| 343 | 7.340 | 31,858.607 | 343 | 4.722 | 27,113.798 | | | | | | |
| 344 | 5.577 | 31,720.935 | 344 | 5.288 | 27,011.218 | | | | | | |
| 345 | 6.353 | 31,583.974 | 345 | 7.799 | 26,909.235 | | | | | | |
| 346 | 5.824 | 31,447.737 | 346 | 6.481 | 26,807.845 | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 347 | 6.753 | 31,447.737 | 347 | 6.975 | 26,807.845 | | | | |
| 348 | 4.500 | 31,312.234 | 348 | 5.525 | 26,707.045 | | | | |
| 349 | 9.296 | 30,910.240 | 349 | 4.748 | 26,606.832 | | | | |
| 350 | 6.977 | 30,777.784 | 350 | 4.887 | 26,606.832 | | | | |
| 351 | 5.530 | 30,646.116 | 351 | 7.188 | 26,606.832 | | | | |
| 352 | 5.918 | 30,515.249 | 352 | 5.862 | 26,507.203 | | | | |
| 353 | 5.295 | 30,255.958 | 353 | 6.202 | 26,507.203 | | | | |
| 354 | 6.565 | 30,255.958 | 354 | 4.519 | 26,211.790 | | | | |
| 355 | 7.164 | 30,255.958 | 355 | 5.937 | 26,017.714 | | | | |
| 356 | 7.799 | 30,255.958 | 356 | 4.937 | 25,921.526 | | | | |
| 357 | 8.774 | 30,255.958 | 357 | 5.088 | 25,730.837 | | | | |
| 358 | 8.905 | 30,255.958 | 358 | 5.662 | 25,730.837 | | | | |
| 359 | 8.571 | 30,127.557 | 359 | 6.987 | 25,542.376 | | | | |
| 360 | 5.695 | 29,873.295 | 360 | 7.188 | 25,542.376 | | | | |
| 361 | 4.512 | 29,747.440 | 361 | 6.050 | 25,356.118 | | | | |
| 362 | 4.834 | 29,747.440 | 362 | 5.450 | 25,172.040 | | | | |
| 363 | 8.285 | 29,747.440 | 363 | 4.975 | 25,080.811 | | | | |
| 364 | 6.388 | 29,622.429 | 364 | 4.672 | 24,810.326 | | | | |
| 365 | 7.376 | 29,622.429 | 365 | 4.481 | 24,721.222 | | | | |
| 366 | 7.446 | 29,622.429 | 366 | 4.912 | 24,721.222 | | | | |
| 367 | 7.528 | 29,622.429 | 367 | 6.164 | 24,721.222 | | | | |
| 368 | 8.000 | 29,622.429 | 368 | 4.583 | 24,632.642 | | | | |
| 369 | 4.619 | 29,498.258 | 369 | 7.700 | 24,632.642 | | | | |
| 370 | 4.393 | 29,374.921 | 370 | 7.550 | 24,544.583 | | | | |
| 371 | 9.319 | 29,374.921 | 371 | 4.836 | 24,283.499 | | | | |
| 372 | 4.691 | 29,252.413 | 372 | 4.710 | 24,111.992 | | | | |
| 373 | 6.223 | 29,252.413 | 373 | 8.519 | 24,111.992 | | | | |
| 374 | 6.859 | 29,252.413 | 374 | 5.425 | 23,942.496 | | | | |
| 375 | 7.129 | 29,130.729 | 375 | 6.950 | 23,445.830 | | | | |
| 376 | 8.607 | 29,130.729 | 376 | 5.013 | 23,364.745 | | | | |
| 377 | 5.319 | 29,009.863 | 377 | 7.201 | 23,364.745 | | | | |
| 378 | 6.671 | 28,889.811 | 378 | 5.188 | 22,966.393 | | | | |
| 379 | 7.376 | 28,770.567 | 379 | 7.762 | 22,656.017 | | | | |
| 380 | 5.613 | 28,652.126 | 380 | 7.188 | 21,767.166 | | | | |
| 381 | 4.727 | 28,534.483 | 381 | 5.188 | 21,207.897 | | | | |
| 382 | 5.847 | 28,417.632 | 382 | 5.774 | 20,415.084 | | | | |
| 383 | 9.331 | 28,301.569 | 383 | 5.625 | 19,976.346 | | | | |
| 384 | 5.753 | 28,186.288 | 384 | 4.532 | 19,915.016 | | | | |
| 385 | 6.247 | 28,071.785 | 385 | 4.659 | 19,915.016 | | | | |
| 386 | 6.635 | 28,071.785 | 386 | 9.502 | 19,793.339 | | | | |
| 387 | 7.775 | 28,071.785 | 387 | 4.962 | 19,672.952 | | | | |
| 388 | 6.765 | 27,958.052 | 388 | 5.150 | 19,672.952 | | | | |
| 389 | 7.000 | 27,958.052 | 389 | 6.076 | 19,672.952 | | | | |
| 390 | 7.458 | 27,958.052 | 390 | 5.637 | 19,319.292 | | | | |
| 391 | 7.364 | 27,732.883 | 391 | 4.924 | 19,089.539 | | | | |
| 392 | 7.164 | 27,621.435 | 392 | 5.113 | 19,089.539 | | | | |
| 393 | 8.012 | 27,621.435 | 393 | 5.288 | 18,698.427 | | | | |
| 394 | 8.750 | 27,621.435 | 394 | 5.637 | 18,589.128 | | | | |
| 395 | 6.482 | 27,510.739 | 395 | 5.088 | 18,480.875 | | | | |
| 396 | 8.476 | 27,510.739 | 396 | 8.607 | 18,480.875 | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 397 | 6.118 | 27,400.788 | 397 | 5.475 | 18,427.134 |
| 398 | 7.552 | 27,183.103 | 398 | 8.328 | 18,373.644 |
| 399 | 6.718 | 26,968.339 | 399 | 9.489 | 18,373.644 |
| 400 | 5.378 | 26,862.039 | 400 | 4.291 | 18,162.156 |
| 401 | 7.352 | 26,862.039 | 401 | 4.545 | 18,162.156 |
| 402 | 5.118 | 26,756.454 | 402 | 4.887 | 18,006.050 |
| 403 | 6.082 | 26,756.454 | 403 | 5.450 | 17,903.131 |
| 404 | 4.976 | 26,651.579 | 404 | 4.152 | 17,549.805 |
| 405 | 6.423 | 26,651.579 | 405 | 4.786 | 17,549.805 |
| 406 | 5.225 | 26,443.936 | 406 | 8.214 | 17,549.805 |
| 407 | 5.918 | 26,443.936 | 407 | 6.836 | 17,401.487 |
| 408 | 7.176 | 26,443.936 | 408 | 7.488 | 17,401.487 |
| 409 | 7.364 | 26,239.068 | 409 | 7.775 | 17,303.586 |
| 410 | 6.294 | 26,137.662 | 410 | 7.875 | 17,303.586 |
| 411 | 4.881 | 26,036.934 | 411 | 5.025 | 16,966.724 |
| 412 | 6.824 | 26,036.934 | 412 | 5.413 | 16,966.724 |
| 413 | 7.634 | 26,036.934 | 413 | 4.266 | 16,872.037 |
| 414 | 9.319 | 26,036.934 | 414 | 5.862 | 16,872.037 |
| 415 | 5.142 | 25,936.879 | 415 | 3.811 | 16,638.115 |
| 416 | 6.624 | 25,837.493 | 416 | 4.608 | 16,545.603 |
| 417 | 8.404 | 25,837.493 | 417 | 5.125 | 16,499.562 |
| 418 | 5.742 | 25,543.288 | 418 | 7.850 | 16,453.660 |
| 419 | 7.517 | 25,543.288 | 419 | 3.887 | 16,407.895 |
| 420 | 7.693 | 25,254.907 | 420 | 3.987 | 16,407.895 |
| 421 | 7.012 | 25,065.819 | 421 | 4.975 | 16,316.762 |
| 422 | 7.811 | 25,065.819 | 422 | 3.236 | 16,226.140 |
| 423 | 4.786 | 24,879.216 | 423 | 5.338 | 15,957.110 |
| 424 | 5.295 | 24,786.833 | 424 | 6.189 | 15,912.654 |
| 425 | 8.548 | 24,786.833 | 425 | 4.798 | 15,868.300 |
| 426 | 4.929 | 24,695.055 | 426 | 5.000 | 15,868.300 |
| 427 | 7.834 | 24,695.055 | 427 | 5.649 | 15,868.300 |
| 428 | 5.142 | 24,603.878 | 428 | 3.623 | 15,735.819 |
| 429 | 7.129 | 24,513.297 | 429 | 7.113 | 15,735.819 |
| 430 | 6.400 | 24,423.305 | 430 | 6.684 | 15,691.842 |
| 431 | 7.340 | 24,423.305 | 431 | 5.176 | 15,604.147 |
| 432 | 7.599 | 24,333.897 | 432 | 5.687 | 15,386.283 |
| 433 | 5.236 | 24,069.132 | 433 | 4.038 | 15,299.625 |
| 434 | 5.071 | 23,982.012 | 434 | 6.849 | 15,299.625 |
| 435 | 7.846 | 23,895.451 | 435 | 5.063 | 15,213.210 |
| 436 | 4.798 | 23,723.983 | 436 | 5.375 | 15,083.996 |
| 437 | 4.964 | 23,554.689 | 437 | 6.646 | 15,083.996 |
| 438 | 5.707 | 23,554.689 | 438 | 6.912 | 15,083.996 |
| 439 | 8.309 | 22,660.547 | 439 | 4.202 | 14,955.199 |
| 440 | 9.296 | 22,582.219 | 440 | 4.786 | 14,955.199 |
| 441 | 8.631 | 22,350.037 | 441 | 4.469 | 14,912.346 |
| 442 | 7.929 | 21,823.955 | 442 | 4.558 | 14,912.346 |
| 443 | 8.631 | 21,750.516 | 443 | 8.316 | 14,741.255 |
| 444 | 6.035 | 21,460.840 | 444 | 5.625 | 14,655.860 |
| 445 | 7.340 | 21,107.536 | 445 | 6.836 | 14,655.860 |
| 446 | 5.883 | 20,899.994 | 446 | 5.226 | 14,613.190 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 447 | 5.472 | 20,695.609 | 447 | 6.202 | 14,613.190 |
| 448 | 9.307 | 20,230.204 | 448 | 7.126 | 14,613.190 |
| 449 | 5.906 | 19,843.038 | 449 | 7.762 | 14,613.190 |
| 450 | 5.871 | 19,280.833 | 450 | 9.489 | 14,613.190 |
| 451 | 4.440 | 19,219.665 | 451 | 7.388 | 14,527.891 |
| 452 | 9.307 | 19,098.075 | 452 | 9.201 | 14,485.256 |
| 453 | 4.881 | 18,977.462 | 453 | 4.545 | 14,442.626 |
| 454 | 6.612 | 18,977.462 | 454 | 8.810 | 14,301.724 |
| 455 | 5.753 | 18,917.515 | 455 | 6.861 | 14,203.448 |
| 456 | 4.727 | 18,857.804 | 456 | 8.506 | 14,154.310 |
| 457 | 4.548 | 18,739.077 | 457 | 7.625 | 13,613.793 |
| 458 | 8.452 | 18,680.057 | 458 | 6.481 | 13,564.655 |
| 459 | 5.201 | 18,562.687 | 459 | 7.787 | 13,564.655 |
| 460 | 4.762 | 18,215.749 | 460 | 4.849 | 13,515.517 |
| 461 | 7.446 | 18,101.753 | 461 | 9.552 | 13,515.517 |
| 462 | 7.681 | 18,045.052 | 462 | 5.600 | 13,466.379 |
| 463 | 8.047 | 17,876.102 | 463 | 5.925 | 13,073.276 |
| 464 | 5.707 | 17,598.201 | 464 | 3.012 | 12,975.000 |
| 465 | 6.129 | 17,598.201 | 465 | 7.050 | 12,975.000 |
| 466 | 5.448 | 17,433.546 | 466 | 5.438 | 12,925.862 |
| 467 | 6.847 | 17,270.364 | 467 | 6.836 | 12,925.862 |
| 468 | 5.260 | 17,108.581 | 468 | 5.724 | 12,827.586 |
| 469 | 4.333 | 16,894.916 | 469 | 5.550 | 12,778.448 |
| 470 | 4.059 | 16,841.846 | 470 | 4.443 | 12,483.621 |
| 471 | 3.905 | 16,683.425 | 471 | 5.862 | 12,483.621 |
| 472 | 7.399 | 16,683.425 | 472 | 9.564 | 12,434.483 |
| 473 | 7.976 | 16,630.872 | 473 | 4.215 | 12,385.345 |
| 474 | 6.647 | 16,473.933 | 474 | 6.215 | 12,336.207 |
| 475 | 7.235 | 16,473.933 | 475 | 7.737 | 12,287.069 |
| 476 | 5.671 | 16,421.851 | 476 | 8.620 | 12,287.069 |
| 477 | 9.331 | 16,421.851 | 477 | 7.762 | 11,844.828 |
| 478 | 6.435 | 16,369.880 | 478 | 9.552 | 11,697.414 |
| 479 | 6.882 | 16,318.017 | 479 | 6.430 | 11,648.276 |
| 480 | 7.575 | 16,318.017 | 480 | 4.824 | 11,402.586 |
| 481 | 3.469 | 16,214.605 | 481 | 9.539 | 11,058.621 |
| 482 | 5.906 | 16,008.958 | 482 | 9.063 | 10,567.241 |
| 483 | 8.679 | 15,804.731 | | | |
| 484 | 6.835 | 15,753.875 | | | |
| 485 | 7.059 | 15,652.386 | | | |
| 486 | 5.683 | 15,551.174 | | | |
| 487 | 5.142 | 15,349.494 | | | |
| 488 | 7.941 | 15,148.657 | | | |
| 489 | 8.416 | 15,148.657 | | | |
| 490 | 7.247 | 15,048.500 | | | |
| 491 | 5.012 | 14,948.486 | | | |
| 492 | 7.481 | 14,948.486 | | | |
| 493 | 4.774 | 14,898.527 | | | |
| 494 | 9.777 | 14,848.595 | | | |
| 495 | 9.296 | 14,698.938 | | | |
| 496 | 8.595 | 14,449.807 | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 497 | 6.847 | 14,290.385 | | | | | |
| 498 | 5.636 | 14,235.577 | | | | | |
| 499 | 6.671 | 14,235.577 | | | | | |
| 500 | 8.321 | 14,235.577 | | | | | |
| 501 | 5.177 | 14,071.154 | | | | | |
| 502 | 6.188 | 13,687.500 | | | | | |
| 503 | 7.176 | 13,523.077 | | | | | |
| 504 | 5.695 | 13,358.654 | | | | | |
| 505 | 4.691 | 12,920.192 | | | | | |
| 506 | 6.988 | 12,810.577 | | | | | |
| 507 | 7.811 | 12,755.769 | | | | | |
| 508 | 6.459 | 12,700.962 | | | | | |
| 509 | 5.142 | 11,769.231 | | | | | |
| 510 | 5.047 | 11,714.423 | | | | | |
| 511 | 7.223 | 11,714.423 | | | | | |

## APÊNDICE B

Comparação entre os pools quanto à presença, à ausência e à intensidade de expressão dos spots protéicos.

**Apêndice B.** Comparação entre os pools quanto à presença, à ausência e à intensidade de expressão dos spots protéicos.

| Ref. Spot | pool A Volume | pool B Volume | Ref. Spot | pool A Volume | pool E Volume | Ref. Spot | pool C Volume | pool D Volume | Ref. Spot | pool C Volume | pool F Volume | Ref. Spot | pool A Volume | pool C Volume | Ref. Spot | pool A Volume | pool D Volume | Ref. Spot | pool E Volume | pool F Volume |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1.000 | -4.098 | 1 | 1.000 | 1.067 | 1 | 1.000 | - | 1 | 1.000 | - | 1 | 1.000 | 1.000 | 1 | 1.000 | - | 1 | 1.000 | - |
| 2 | 1.000 | - | 2 | 1.000 | - | 2 | 1.000 | 3.882 | 2 | 1.000 | - | 2 | 1.000 | 1.000 | 2 | 1.000 | - | 2 | 1.000 | -1.321 |
| 3 | 1.000 | -4.412 | 3 | 1.000 | - | 4 | 1.000 | - | 4 | 1.000 | - | 3 | 1.000 | - | 3 | 1.000 | - | 3 | 1.000 | - |
| 4 | 1.000 | -7.934 | 4 | 1.000 | - | 6 | 1.000 | - | 6 | 1.000 | - | 4 | 1.000 | - | 4 | 1.000 | - | 4 | 1.000 | -8.272 |
| 5 | 1.000 | -3.087 | 5 | 1.000 | - | 7 | 1.000 | - | 7 | 1.000 | - | 5 | 1.000 | - | 5 | 1.000 | - | 5 | 1.000 | - |
| 6 | 1.000 | -10.655 | 6 | 1.000 | - | 8 | 1.000 | - | 8 | 1.000 | -18.259 | 6 | 1.000 | - | 6 | 1.000 | 1.000 | 6 | 1.000 | -11.408 |
| 7 | 1.000 | -14.318 | 7 | 1.000 | - | 9 | 1.000 | - | 9 | 1.000 | - | 7 | 1.000 | - | 7 | 1.000 | - | 7 | 1.000 | - |
| 8 | 1.000 | -76.500 | 8 | 1.000 | - | 10 | 1.000 | -1.251 | 10 | 1.000 | - | 8 | 1.000 | - | 8 | 1.000 | - | 8 | 1.000 | - |
| 9 | 1.000 | -2.605 | 9 | 1.000 | - | 11 | 1.000 | -1.310 | 11 | 1.000 | - | 9 | 1.000 | - | 9 | 1.000 | 1.000 | 9 | 1.000 | - |
| 10 | 1.000 | - | 10 | 1.000 | - | 12 | 1.000 | - | 12 | 1.000 | - | 10 | 1.000 | - | 10 | 1.000 | 1.000 | 10 | 1.000 | -1.400 |
| 11 | 1.000 | - | 11 | 1.000 | - | 13 | 1.000 | - | 13 | 1.000 | - | 11 | 1.000 | - | 11 | 1.000 | 1.000 | 11 | 1.000 | - |
| 12 | 1.000 | - | 12 | 1.000 | - | 14 | 1.000 | - | 14 | 1.000 | - | 12 | 1.000 | - | 12 | 1.000 | - | 12 | 1.000 | -3.232 |
| 13 | 1.000 | - | 13 | 1.000 | - | 15 | 1.000 | 1.041 | 15 | 1.000 | - | 13 | 1.000 | - | 13 | 1.000 | - | 13 | 1.000 | -1.353 |
| 14 | 1.000 | - | 14 | 1.000 | - | 16 | 1.000 | - | 16 | 1.000 | - | 14 | 1.000 | - | 14 | 1.000 | - | 14 | 1.000 | - |
| 15 | 1.000 | 4.813 | 15 | 1.000 | - | 17 | 1.000 | -3.641 | 17 | 1.000 | - | 15 | 1.000 | - | 15 | 1.000 | - | 15 | 1.000 | - |
| 16 | 1.000 | - | 16 | 1.000 | -3.004 | 18 | 1.000 | -1.756 | 18 | 1.000 | - | 16 | 1.000 | 1.000 | 16 | 1.000 | - | 16 | 1.000 | - |
| 17 | 1.000 | 1.482 | 17 | 1.000 | - | 19 | 1.000 | -1.471 | 19 | 1.000 | -1.112 | 17 | 1.000 | - | 17 | 1.000 | - | 17 | 1.000 | - |
| 18 | 1.000 | -3.976 | 18 | 1.000 | - | 20 | 1.000 | - | 20 | 1.000 | - | 18 | 1.000 | - | 18 | 1.000 | - | 18 | 1.000 | - |
| 19 | 1.000 | - | 19 | 1.000 | - | 21 | 1.000 | 1.753 | 21 | 1.000 | 2.582 | 19 | 1.000 | - | 19 | 1.000 | - | 19 | 1.000 | - |
| 20 | 1.000 | - | 20 | 1.000 | - | 22 | 1.000 | -1.379 | 22 | 1.000 | - | 20 | 1.000 | - | 20 | 1.000 | 1.000 | 20 | 1.000 | - |
| 21 | 1.000 | 4.025 | 21 | 1.000 | - | 23 | 1.000 | - | 23 | 1.000 | -1.236 | 21 | 1.000 | - | 21 | 1.000 | - | 21 | 1.000 | -22.244 |
| 22 | 1.000 | -2.127 | 22 | 1.000 | - | 24 | 1.000 | -2.079 | 24 | 1.000 | - | 22 | 1.000 | - | 22 | 1.000 | - | 22 | 1.000 | -5.211 |
| 23 | 1.000 | -1.302 | 23 | 1.000 | - | 25 | 1.000 | - | 25 | 1.000 | - | 23 | 1.000 | - | 23 | 1.000 | - | 23 | 1.000 | -5.662 |
| 24 | 1.000 | - | 24 | 1.000 | - | 26 | 1.000 | - | 26 | 1.000 | 3.034 | 24 | 1.000 | - | 24 | 1.000 | - | 24 | 1.000 | -4.427 |
| 25 | 1.000 | 2.141 | 25 | 1.000 | - | 27 | 1.000 | - | 27 | 1.000 | - | 25 | 1.000 | 1.000 | 25 | 1.000 | - | 25 | 1.000 | -10.265 |
| 26 | 1.000 | - | 26 | 1.000 | - | 28 | 1.000 | -1.040 | 28 | 1.000 | 1.131 | 26 | 1.000 | -1.020 | 26 | 1.000 | 1.020 | 26 | 1.000 | -2.010 |
| 27 | 1.000 | -2.430 | 27 | 1.000 | - | 29 | 1.000 | -1.107 | 29 | 1.000 | - | 27 | 1.000 | - | 27 | 1.000 | - | 27 | 1.000 | -5.947 |
| 28 | 1.000 | - | 28 | 1.000 | - | 30 | 1.000 | - | 30 | 1.000 | - | 28 | 1.000 | 1.121 | 28 | 1.000 | -1.138 | 28 | 1.000 | -3.000 |
| 29 | 1.000 | - | 29 | 1.000 | - | 31 | 1.000 | - | 31 | 1.000 | - | 29 | 1.000 | - | 29 | 1.000 | - | 29 | 1.000 | - |
| 30 | 1.000 | -1.102 | 30 | 1.000 | - | 32 | 1.000 | 1.396 | 32 | 1.000 | - | 30 | 1.000 | - | 30 | 1.000 | - | 30 | 1.000 | -2.085 |
| 31 | 1.000 | - | 31 | 1.000 | - | 33 | 1.000 | -3.660 | 33 | 1.000 | - | 31 | 1.000 | - | 31 | 1.000 | - | 31 | 1.000 | -10.896 |
| 32 | 1.000 | - | 32 | 1.000 | - | 34 | 1.000 | -2.107 | 34 | 1.000 | -1.097 | 32 | 1.000 | - | 32 | 1.000 | - | 32 | 1.000 | -2.872 |
| 33 | 1.000 | 1.374 | 33 | 1.000 | - | 35 | 1.000 | - | 35 | 1.000 | - | 33 | 1.000 | - | 33 | 1.000 | - | 33 | 1.000 | -5.184 |
| 34 | 1.000 | - | 34 | 1.000 | - | 36 | 1.000 | -1.374 | 36 | 1.000 | 1.184 | 34 | 1.000 | - | 34 | 1.000 | - | 34 | 1.000 | - |
| 35 | 1.000 | - | 35 | 1.000 | - | 37 | 1.000 | 1.362 | 37 | 1.000 | 3.010 | 35 | 1.000 | - | 35 | 1.000 | - | 35 | 1.000 | -2.403 |
| 36 | 1.000 | 2.328 | 36 | 1.000 | - | 38 | 1.000 | -2.473 | 38 | 1.000 | - | 36 | 1.000 | - | 36 | 1.000 | 1.000 | 36 | 1.000 | - |
| 37 | 1.000 | - | 37 | 1.000 | 1.097 | 39 | 1.000 | -1.903 | 39 | 1.000 | -1.256 | 37 | 1.000 | 1.350 | 37 | 1.000 | -1.540 | 37 | 1.000 | - |
| 38 | 1.000 | -1.432 | 38 | 1.000 | -1.728 | 40 | 1.000 | -1.639 | 40 | 1.000 | - | 38 | 1.000 | - | 38 | 1.000 | 1.000 | 38 | 1.000 | 1.146 |
| 39 | 1.000 | - | 39 | 1.000 | - | 41 | 1.000 | - | 41 | 1.000 | - | 39 | 1.000 | - | 39 | 1.000 | - | 39 | 1.000 | -4.964 |
| 40 | 1.000 | - | 40 | 1.000 | - | 42 | 1.000 | 7.962 | 42 | 1.000 | - | 40 | 1.000 | - | 40 | 1.000 | - | 40 | 1.000 | - |
| 41 | 1.000 | - | 41 | 1.000 | - | 43 | 1.000 | - | 43 | 1.000 | - | 41 | 1.000 | - | 41 | 1.000 | 1.000 | 41 | 1.000 | - |
| 42 | 1.000 | - | 42 | 1.000 | - | 45 | 1.000 | -1.428 | 45 | 1.000 | - | 42 | 1.000 | - | 42 | 1.000 | 1.000 | 42 | 1.000 | - |
| 43 | 1.000 | -3.582 | 43 | 1.000 | - | 46 | 1.000 | 1.479 | 46 | 1.000 | - | 43 | 1.000 | - | 43 | 1.000 | - | 43 | 1.000 | 1.227 |
| 44 | 1.000 | - | 44 | 1.000 | - | 47 | 1.000 | - | 47 | 1.000 | -1.121 | 44 | 1.000 | - | 44 | 1.000 | - | 44 | 1.000 | - |
| 45 | 1.000 | -1.183 | 45 | 1.000 | - | 48 | 1.000 | 1.800 | 48 | 1.000 | 1.200 | 45 | 1.000 | 1.000 | 45 | 1.000 | - | 45 | 1.000 | -8.049 |
| 46 | 1.000 | - | 46 | 1.000 | - | 49 | 1.000 | - | 49 | 1.000 | 34.805 | 46 | 1.000 | - | 46 | 1.000 | 1.000 | 46 | 1.000 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | 1.000 | 1.100 | 47 | 1.000 | - | 50 | 1.000 | - | 50 | 1.000 | -6.789 | 47 | 1.000 | - | 47 | 1.000 | - | 47 | 1.000 | -7.319 |
| 48 | 1.000 | -2.891 | 48 | 1.000 | - | 51 | 1.000 | - | 51 | 1.000 | -1.339 | 48 | 1.000 | 1.000 | 48 | 1.000 | - | 48 | 1.000 | - |
| 49 | 1.000 | 1.708 | 49 | 1.000 | - | 52 | 1.000 | 5.684 | 52 | 1.000 | - | 49 | 1.000 | - | 49 | 1.000 | - | 49 | 1.000 | - |
| 50 | 1.000 | - | 50 | 1.000 | - | 53 | 1.000 | - | 53 | 1.000 | -1.840 | 50 | 1.000 | 1.000 | 50 | 1.000 | - | 50 | 1.000 | 2.619 |
| 51 | 1.000 | - | 51 | 1.000 | - | 54 | 1.000 | -1.183 | 54 | 1.000 | -3.301 | 51 | 1.000 | 1.000 | 51 | 1.000 | - | 51 | 1.000 | -1.322 |
| 52 | 1.000 | 1.305 | 52 | 1.000 | - | 55 | 1.000 | - | 55 | 1.000 | - | 52 | 1.000 | - | 52 | 1.000 | - | 52 | 1.000 | - |
| 53 | 1.000 | - | 53 | 1.000 | - | 56 | 1.000 | - | 56 | 1.000 | - | 53 | 1.000 | - | 53 | 1.000 | - | 53 | 1.000 | -5.327 |
| 54 | 1.000 | - | 54 | 1.000 | -3.362 | 57 | 1.000 | 3.046 | 57 | 1.000 | -13.009 | 54 | 1.000 | - | 54 | 1.000 | - | 54 | 1.000 | - |
| 55 | 1.000 | 1.438 | 55 | 1.000 | - | 58 | 1.000 | - | 58 | 1.000 | 3.460 | 55 | 1.000 | - | 55 | 1.000 | 1.000 | 55 | 1.000 | - |
| 56 | 1.000 | 13.108 | 56 | 1.000 | - | 59 | 1.000 | -1.384 | 59 | 1.000 | - | 56 | 1.000 | 1.275 | 56 | 1.000 | -1.379 | 56 | 1.000 | -1.090 |
| 57 | 1.000 | - | 57 | 1.000 | - | 60 | 1.000 | - | 60 | 1.000 | - | 57 | 1.000 | - | 57 | 1.000 | - | 57 | 1.000 | 5.336 |
| 58 | 1.000 | 6.268 | 58 | 1.000 | - | 61 | 1.000 | - | 61 | 1.000 | - | 58 | 1.000 | - | 58 | 1.000 | 1.000 | 58 | 1.000 | -13.754 |
| 59 | 1.000 | -2.836 | 59 | 1.000 | - | 62 | 1.000 | -4.649 | 62 | 1.000 | - | 59 | 1.000 | 1.000 | 59 | 1.000 | - | 59 | 1.000 | -14.062 |
| 60 | 1.000 | -7.757 | 60 | 1.000 | - | 63 | 1.000 | -1.530 | 63 | 1.000 | - | 60 | 1.000 | 1.128 | 60 | 1.000 | -1.147 | 60 | 1.000 | - |
| 61 | 1.000 | - | 61 | 1.000 | - | 64 | 1.000 | -1.207 | 64 | 1.000 | 28.188 | 61 | 1.000 | - | 61 | 1.000 | - | 61 | 1.000 | -18.613 |
| 62 | 1.000 | -1.496 | 62 | 1.000 | - | 65 | 1.000 | 1.470 | 65 | 1.000 | - | 62 | 1.000 | - | 62 | 1.000 | - | 62 | 1.000 | - |
| 63 | 1.000 | - | 63 | 1.000 | - | 66 | 1.000 | -1.077 | 66 | 1.000 | - | 63 | 1.000 | - | 63 | 1.000 | 1.000 | 63 | 1.000 | -4.309 |
| 64 | 1.000 | 8.146 | 64 | 1.000 | - | 67 | 1.000 | - | 67 | 1.000 | - | 64 | 1.000 | - | 64 | 1.000 | - | 64 | 1.000 | - |
| 65 | 1.000 | -4.381 | 65 | 1.000 | - | 68 | 1.000 | 1.467 | 68 | 1.000 | 2.091 | 65 | 1.000 | - | 65 | 1.000 | - | 65 | 1.000 | - |
| 66 | 1.000 | 1.709 | 66 | 1.000 | - | 69 | 1.000 | 1.134 | 69 | 1.000 | - | 66 | 1.000 | - | 66 | 1.000 | - | 66 | 1.000 | - |
| 67 | 1.000 | -3.271 | 67 | 1.000 | - | 71 | 1.000 | -1.370 | 71 | 1.000 | 1.106 | 67 | 1.000 | -1.164 | 67 | 1.000 | 1.141 | 67 | 1.000 | - |
| 68 | 1.000 | - | 68 | 1.000 | - | 72 | 1.000 | - | 72 | 1.000 | - | 68 | 1.000 | - | 68 | 1.000 | - | 68 | 1.000 | -3.817 |
| 69 | 1.000 | -3.706 | 69 | 1.000 | - | 73 | 1.000 | - | 73 | 1.000 | 3.333 | 69 | 1.000 | - | 69 | 1.000 | - | 69 | 1.000 | -3.095 |
| 70 | 1.000 | -4.292 | 70 | 1.000 | - | 74 | 1.000 | - | 74 | 1.000 | - | 70 | 1.000 | - | 70 | 1.000 | - | 70 | 1.000 | -4.744 |
| 71 | 1.000 | - | 71 | 1.000 | - | 75 | 1.000 | - | 75 | 1.000 | - | 71 | 1.000 | - | 71 | 1.000 | 1.000 | 71 | 1.000 | - |
| 72 | 1.000 | 1.174 | 72 | 1.000 | - | 76 | 1.000 | - | 76 | 1.000 | - | 72 | 1.000 | -1.042 | 72 | 1.000 | 1.041 | 72 | 1.000 | - |
| 73 | 1.000 | - | 73 | 1.000 | - | 77 | 1.000 | - | 77 | 1.000 | 3.980 | 73 | 1.000 | -1.306 | 73 | 1.000 | 1.234 | 73 | 1.000 | - |
| 74 | 1.000 | -3.780 | 74 | 1.000 | - | 78 | 1.000 | 1.016 | 78 | 1.000 | -1.111 | 74 | 1.000 | 1.301 | 74 | 1.000 | -1.431 | 74 | 1.000 | - |
| 75 | 1.000 | -4.942 | 75 | 1.000 | - | 79 | 1.000 | -3.977 | 79 | 1.000 | -7.170 | 75 | 1.000 | 1.000 | 75 | 1.000 | - | 75 | 1.000 | - |
| 76 | 1.000 | - | 76 | 1.000 | - | 80 | 1.000 | - | 80 | 1.000 | - | 76 | 1.000 | - | 76 | 1.000 | 1.000 | 76 | 1.000 | -1.901 |
| 77 | 1.000 | -2.955 | 77 | 1.000 | - | 81 | 1.000 | - | 81 | 1.000 | - | 77 | 1.000 | 1.375 | 77 | 1.000 | -1.601 | 77 | 1.000 | -8.594 |
| 78 | 1.000 | - | 78 | 1.000 | - | 83 | 1.000 | - | 83 | 1.000 | - | 78 | 1.000 | - | 78 | 1.000 | 1.000 | 78 | 1.000 | - |
| 79 | 1.000 | - | 79 | 1.000 | -1.395 | 84 | 1.000 | - | 84 | 1.000 | - | 79 | 1.000 | 1.000 | 79 | 1.000 | - | 79 | 1.000 | - |
| 80 | 1.000 | 1.890 | 80 | 1.000 | - | 85 | 1.000 | -2.236 | 85 | 1.000 | - | 80 | 1.000 | 1.000 | 80 | 1.000 | - | 80 | 1.000 | - |
| 81 | 1.000 | - | 81 | 1.000 | 1.340 | 86 | 1.000 | - | 86 | 1.000 | 1.447 | 81 | 1.000 | - | 81 | 1.000 | 1.000 | 81 | 1.000 | - |
| 84 | 1.000 | -2.064 | 84 | 1.000 | - | 87 | 1.000 | - | 87 | 1.000 | - | 84 | 1.000 | 1.084 | 84 | 1.000 | -1.091 | 82 | 1.000 | - |
| 85 | 1.000 | -4.640 | 85 | 1.000 | - | 88 | 1.000 | - | 88 | 1.000 | -10.311 | 85 | 1.000 | 1.000 | 85 | 1.000 | - | 83 | 1.000 | - |
| 87 | 1.000 | 4.259 | 87 | 1.000 | - | 89 | 1.000 | - | 89 | 1.000 | - | 87 | 1.000 | - | 87 | 1.000 | - | 84 | 1.000 | - |
| 88 | 1.000 | -8.467 | 88 | 1.000 | -2.126 | 90 | 1.000 | 1.651 | 90 | 1.000 | 1.872 | 88 | 1.000 | - | 88 | 1.000 | - | 85 | 1.000 | -20.869 |
| 89 | 1.000 | -1.030 | 89 | 1.000 | -3.197 | 91 | 1.000 | - | 91 | 1.000 | - | 89 | 1.000 | 1.000 | 89 | 1.000 | - | 86 | 1.000 | -22.037 |
| 90 | 1.000 | - | 90 | 1.000 | - | 92 | 1.000 | - | 92 | 1.000 | - | 90 | 1.000 | - | 90 | 1.000 | - | 87 | 1.000 | -4.374 |
| 91 | 1.000 | - | 91 | 1.000 | - | 93 | 1.000 | -1.103 | 93 | 1.000 | -1.562 | 91 | 1.000 | - | 91 | 1.000 | 1.000 | 88 | 1.000 | - |
| 92 | 1.000 | -10.679 | 92 | 1.000 | -6.166 | 94 | 1.000 | -7.069 | 94 | 1.000 | -2.412 | 92 | 1.000 | - | 92 | 1.000 | 1.000 | 89 | 1.000 | -12.082 |
| 93 | 1.000 | - | 93 | 1.000 | -3.213 | 95 | 1.000 | - | 95 | 1.000 | -1.592 | 93 | 1.000 | 1.000 | 93 | 1.000 | - | 90 | 1.000 | - |
| 94 | 1.000 | - | 94 | 1.000 | - | 96 | 1.000 | - | 96 | 1.000 | - | 94 | 1.000 | - | 94 | 1.000 | - | 91 | 1.000 | - |
| 95 | 1.000 | -4.665 | 95 | 1.000 | -7.516 | 97 | 1.000 | - | 97 | 1.000 | -1.425 | 95 | 1.000 | 1.161 | 95 | 1.000 | -1.192 | 92 | 1.000 | - |
| 96 | 1.000 | - | 96 | 1.000 | - | 98 | 1.000 | -1.697 | 98 | 1.000 | -2.421 | 96 | 1.000 | - | 96 | 1.000 | - | 93 | 1.000 | - |
| 97 | 1.000 | -1.631 | 97 | 1.000 | -2.675 | 99 | 1.000 | - | 99 | 1.000 | - | 97 | 1.000 | - | 97 | 1.000 | - | 94 | 1.000 | -4.384 |
| 98 | 1.000 | 7.393 | 98 | 1.000 | -1.764 | 100 | 1.000 | -7.430 | 100 | 1.000 | -1.349 | 98 | 1.000 | - | 98 | 1.000 | - | 95 | 1.000 | -2.820 |
| 99 | 1.000 | -1.885 | 99 | 1.000 | 1.113 | 101 | 1.000 | -3.668 | 101 | 1.000 | - | 99 | 1.000 | 1.646 | 99 | 1.000 | -2.825 | 96 | 1.000 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 101 | 1.000 | - | 101 | 1.000 | -1.978 | 102 | 1.000 | - | 102 | 1.000 | 2.502 | 101 | 1.000 | - | 101 | 1.000 | - | 97 | 1.000 | - |
| 102 | 1.000 | 1.103 | 102 | 1.000 | -3.760 | 103 | 1.000 | 2.472 | 103 | 1.000 | 4.327 | 102 | 1.000 | -1.142 | 102 | 1.000 | 1.124 | 98 | 1.000 | -6.583 |
| 103 | 1.000 | 1.113 | 103 | 1.000 | -3.872 | 104 | 1.000 | -9.223 | 104 | 1.000 | 1.267 | 103 | 1.000 | -2.614 | 103 | 1.000 | 1.617 | 99 | 1.000 | - |
| 104 | 1.000 | - | 104 | 1.000 | - | 105 | 1.000 | - | 105 | 1.000 | - | 104 | 1.000 | 1.228 | 104 | 1.000 | -1.295 | 100 | 1.000 | -1.241 |
| 105 | 1.000 | - | 105 | 1.000 | -1.544 | 106 | 1.000 | - | 106 | 1.000 | - | 105 | 1.000 | 1.000 | 105 | 1.000 | - | 101 | 1.000 | - |
| 106 | 1.000 | -1.560 | 106 | 1.000 | -1.067 | 107 | 1.000 | - | 107 | 1.000 | - | 106 | 1.000 | 1.000 | 106 | 1.000 | - | 102 | 1.000 | -1.240 |
| 107 | 1.000 | - | 107 | 1.000 | - | 108 | 1.000 | - | 108 | 1.000 | - | 107 | 1.000 | - | 107 | 1.000 | - | 103 | 1.000 | -1.235 |
| 108 | 1.000 | 3.987 | 108 | 1.000 | - | 109 | 1.000 | - | 109 | 1.000 | -1.653 | 108 | 1.000 | 1.000 | 108 | 1.000 | - | 104 | 1.000 | -8.683 |
| 109 | 1.000 | - | 109 | 1.000 | - | 110 | 1.000 | - | 110 | 1.000 | -1.394 | 109 | 1.000 | - | 109 | 1.000 | - | 105 | 1.000 | -6.771 |
| 110 | 1.000 | 1.494 | 110 | 1.000 | - | 111 | 1.000 | - | 111 | 1.000 | 5.236 | 110 | 1.000 | 1.328 | 110 | 1.000 | -1.487 | 106 | 1.000 | 4.088 |
| 111 | 1.000 | - | 111 | 1.000 | - | 112 | 1.000 | -1.247 | 112 | 1.000 | 2.600 | 111 | 1.000 | - | 111 | 1.000 | - | 107 | 1.000 | - |
| 112 | 1.000 | - | 112 | 1.000 | 3.421 | 113 | 1.000 | 1.047 | 113 | 1.000 | 1.200 | 112 | 1.000 | 1.000 | 112 | 1.000 | - | 108 | 1.000 | -7.227 |
| 113 | 1.000 | 1.670 | 113 | 1.000 | 3.281 | 114 | 1.000 | -3.429 | 114 | 1.000 | - | 113 | 1.000 | 1.000 | 113 | 1.000 | - | 109 | 1.000 | -6.320 |
| 114 | 1.000 | 2.606 | 114 | 1.000 | 2.759 | 115 | 1.000 | 1.146 | 115 | 1.000 | 1.788 | 114 | 1.000 | - | 114 | 1.000 | 1.000 | 110 | 1.000 | -6.757 |
| 115 | 1.000 | 4.711 | 115 | 1.000 | - | 116 | 1.000 | - | 116 | 1.000 | - | 115 | 1.000 | - | 115 | 1.000 | - | 111 | 1.000 | -20.512 |
| 116 | 1.000 | 1.277 | 116 | 1.000 | - | 117 | 1.000 | -1.183 | 117 | 1.000 | -1.929 | 116 | 1.000 | 1.000 | 116 | 1.000 | - | 112 | 1.000 | -3.514 |
| 117 | 1.000 | - | 117 | 1.000 | - | 118 | 1.000 | 2.466 | 118 | 1.000 | 1.654 | 117 | 1.000 | - | 117 | 1.000 | 1.000 | 113 | 1.000 | - |
| 119 | 1.000 | - | 119 | 1.000 | 4.967 | 119 | 1.000 | 8.150 | 119 | 1.000 | 1.720 | 119 | 1.000 | -1.287 | 119 | 1.000 | 1.223 | 114 | 1.000 | -2.655 |
| 120 | 1.000 | -1.286 | 120 | 1.000 | -1.030 | 120 | 1.000 | - | 120 | 1.000 | - | 120 | 1.000 | 1.000 | 120 | 1.000 | - | 115 | 1.000 | -1.315 |
| 121 | 1.000 | -2.956 | 121 | 1.000 | 1.512 | 121 | 1.000 | -2.260 | 121 | 1.000 | 2.836 | 121 | 1.000 | - | 121 | 1.000 | 1.000 | 116 | 1.000 | - |
| 122 | 1.000 | - | 122 | 1.000 | -1.783 | 122 | 1.000 | -1.449 | 122 | 1.000 | - | 122 | 1.000 | - | 122 | 1.000 | 1.000 | 117 | 1.000 | - |
| 123 | 1.000 | 1.009 | 123 | 1.000 | -1.304 | 123 | 1.000 | 1.365 | 123 | 1.000 | -1.584 | 123 | 1.000 | - | 123 | 1.000 | - | 118 | 1.000 | - |
| 124 | 1.000 | 1.358 | 124 | 1.000 | - | 124 | 1.000 | 1.333 | 124 | 1.000 | 1.522 | 124 | 1.000 | -1.089 | 124 | 1.000 | 1.082 | 119 | 1.000 | - |
| 125 | 1.000 | -1.733 | 125 | 1.000 | - | 125 | 1.000 | - | 125 | 1.000 | - | 125 | 1.000 | 1.000 | 125 | 1.000 | - | 120 | 1.000 | - |
| 126 | 1.000 | - | 126 | 1.000 | - | 126 | 1.000 | - | 126 | 1.000 | -1.210 | 126 | 1.000 | 1.000 | 126 | 1.000 | - | 121 | 1.000 | - |
| 127 | 1.000 | -1.415 | 127 | 1.000 | - | 127 | 1.000 | - | 127 | 1.000 | - | 127 | 1.000 | - | 127 | 1.000 | - | 122 | 1.000 | - |
| 128 | 1.000 | -1.009 | 128 | 1.000 | - | 128 | 1.000 | - | 128 | 1.000 | -2.245 | 128 | 1.000 | - | 128 | 1.000 | - | 123 | 1.000 | - |
| 129 | 1.000 | 1.323 | 129 | 1.000 | 1.681 | 129 | 1.000 | - | 129 | 1.000 | - | 129 | 1.000 | 1.000 | 129 | 1.000 | - | 124 | 1.000 | - |
| 130 | 1.000 | - | 130 | 1.000 | -2.409 | 130 | 1.000 | - | 130 | 1.000 | - | 130 | 1.000 | - | 130 | 1.000 | 1.000 | 125 | 1.000 | - |
| 131 | 1.000 | - | 131 | 1.000 | - | 131 | 1.000 | 12.884 | 131 | 1.000 | 15.309 | 131 | 1.000 | - | 131 | 1.000 | - | 126 | 1.000 | - |
| 133 | 1.000 | -1.648 | 133 | 1.000 | - | 132 | 1.000 | -28.609 | 132 | 1.000 | 1.791 | 133 | 1.000 | 1.851 | 133 | 1.000 | -6.689 | 127 | 1.000 | - |
| 134 | 1.000 | - | 134 | 1.000 | -1.700 | 133 | 1.000 | -1.205 | 133 | 1.000 | - | 134 | 1.000 | 1.807 | 134 | 1.000 | -5.194 | 128 | 1.000 | - |
| 135 | 1.000 | 1.021 | 135 | 1.000 | - | 134 | 1.000 | -1.256 | 134 | 1.000 | -1.308 | 135 | 1.000 | - | 135 | 1.000 | - | 129 | 1.000 | - |
| 136 | 1.000 | 1.161 | 136 | 1.000 | - | 135 | 1.000 | - | 135 | 1.000 | - | 136 | 1.000 | - | 136 | 1.000 | - | 130 | 1.000 | - |
| 137 | 1.000 | - | 137 | 1.000 | -2.208 | 136 | 1.000 | -2.156 | 136 | 1.000 | -2.057 | 137 | 1.000 | - | 137 | 1.000 | 1.000 | 131 | 1.000 | - |
| 138 | 1.000 | - | 138 | 1.000 | - | 137 | 1.000 | -1.008 | 137 | 1.000 | -1.200 | 138 | 1.000 | 1.000 | 138 | 1.000 | - | 132 | 1.000 | - |
| 139 | 1.000 | - | 139 | 1.000 | - | 139 | 1.000 | -2.664 | 139 | 1.000 | -3.059 | 139 | 1.000 | 1.000 | 139 | 1.000 | - | 133 | 1.000 | -1.760 |
| 140 | 1.000 | - | 140 | 1.000 | - | 140 | 1.000 | -1.910 | 140 | 1.000 | - | 140 | 1.000 | - | 140 | 1.000 | - | 134 | 1.000 | -2.566 |
| 141 | 1.000 | - | 141 | 1.000 | -1.472 | 141 | 1.000 | 4.078 | 141 | 1.000 | 8.033 | 141 | 1.000 | - | 141 | 1.000 | - | 135 | 1.000 | - |
| 142 | 1.000 | - | 142 | 1.000 | - | 142 | 1.000 | -1.819 | 142 | 1.000 | -1.627 | 142 | 1.000 | - | 142 | 1.000 | 1.000 | 136 | 1.000 | 1.180 |
| 143 | 1.000 | - | 143 | 1.000 | - | 143 | 1.000 | -4.554 | 143 | 1.000 | -1.423 | 143 | 1.000 | - | 143 | 1.000 | - | 137 | 1.000 | - |
| 144 | 1.000 | 1.320 | 144 | 1.000 | - | 144 | 1.000 | - | 144 | 1.000 | - | 144 | 1.000 | 1.000 | 144 | 1.000 | - | 138 | 1.000 | - |
| 145 | 1.000 | -3.600 | 145 | 1.000 | 1.110 | 145 | 1.000 | - | 145 | 1.000 | 2.184 | 145 | 1.000 | - | 145 | 1.000 | 1.000 | 139 | 1.000 | - |
| 146 | 1.000 | - | 146 | 1.000 | -2.105 | 146 | 1.000 | - | 146 | 1.000 | - | 146 | 1.000 | - | 146 | 1.000 | 1.000 | 140 | 1.000 | -2.205 |
| 147 | 1.000 | -3.395 | 147 | 1.000 | -1.957 | 147 | 1.000 | - | 147 | 1.000 | - | 147 | 1.000 | - | 147 | 1.000 | - | 141 | 1.000 | -10.961 |
| 148 | 1.000 | - | 148 | 1.000 | - | 148 | 1.000 | - | 148 | 1.000 | 4.132 | 148 | 1.000 | - | 148 | 1.000 | - | 142 | 1.000 | -5.216 |
| 149 | 1.000 | - | 149 | 1.000 | - | 149 | 1.000 | 6.235 | 149 | 1.000 | 8.633 | 149 | 1.000 | - | 149 | 1.000 | - | 143 | 1.000 | - |
| 150 | 1.000 | - | 150 | 1.000 | 2.649 | 150 | 1.000 | - | 150 | 1.000 | -7.092 | 150 | 1.000 | -1.016 | 150 | 1.000 | 1.016 | 144 | 1.000 | -1.012 |
| 151 | 1.000 | -4.441 | 151 | 1.000 | 3.683 | 151 | 1.000 | - | 151 | 1.000 | - | 151 | 1.000 | - | 151 | 1.000 | 1.000 | 145 | 1.000 | -7.225 |
| 152 | 1.000 | - | 152 | 1.000 | -4.148 | 152 | 1.000 | - | 152 | 1.000 | 1.133 | 152 | 1.000 | 1.000 | 152 | 1.000 | - | 146 | 1.000 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 153 | 1.000 | - | 153 | 1.000 | 1.370 | 153 | 1.000 | -5.936 | 153 | 1.000 | -4.248 | 153 | 1.000 | - | 153 | 1.000 | 1.000 | 147 | 1.000 | - |
| 154 | 1.000 | - | 154 | 1.000 | - | 154 | 1.000 | -1.186 | 154 | 1.000 | - | 154 | 1.000 | - | 154 | 1.000 | - | 148 | 1.000 | - |
| 155 | 1.000 | -1.272 | 155 | 1.000 | 1.968 | 155 | 1.000 | 3.759 | 155 | 1.000 | - | 155 | 1.000 | 1.000 | 155 | 1.000 | - | 149 | 1.000 | - |
| 156 | 1.000 | - | 156 | 1.000 | - | 156 | 1.000 | 1.763 | 156 | 1.000 | - | 156 | 1.000 | - | 156 | 1.000 | - | 150 | 1.000 | - |
| 157 | 1.000 | -2.802 | 157 | 1.000 | 2.369 | 157 | 1.000 | 1.386 | 157 | 1.000 | -1.613 | 157 | 1.000 | 1.000 | 157 | 1.000 | - | 151 | 1.000 | - |
| 158 | 1.000 | 2.213 | 158 | 1.000 | 6.440 | 158 | 1.000 | - | 158 | 1.000 | 2.303 | 158 | 1.000 | -2.202 | 158 | 1.000 | 1.546 | 152 | 1.000 | - |
| 159 | 1.000 | - | 159 | 1.000 | - | 159 | 1.000 | 2.061 | 159 | 1.000 | - | 159 | 1.000 | 1.000 | 159 | 1.000 | - | 153 | 1.000 | -12.380 |
| 160 | 1.000 | - | 160 | 1.000 | - | 160 | 1.000 | -3.893 | 160 | 1.000 | -2.756 | 160 | 1.000 | 1.000 | 160 | 1.000 | - | 154 | 1.000 | -9.484 |
| 161 | 1.000 | - | 161 | 1.000 | -1.790 | 161 | 1.000 | -3.201 | 161 | 1.000 | -1.472 | 161 | 1.000 | -1.503 | 161 | 1.000 | 1.335 | 155 | 1.000 | -8.919 |
| 162 | 1.000 | - | 162 | 1.000 | 1.118 | 162 | 1.000 | - | 162 | 1.000 | - | 162 | 1.000 | - | 162 | 1.000 | 1.000 | 156 | 1.000 | -3.256 |
| 163 | 1.000 | - | 163 | 1.000 | -1.662 | 163 | 1.000 | - | 163 | 1.000 | 1.249 | 163 | 1.000 | - | 163 | 1.000 | 1.000 | 157 | 1.000 | -3.756 |
| 164 | 1.000 | - | 164 | 1.000 | - | 164 | 1.000 | -1.548 | 164 | 1.000 | - | 164 | 1.000 | 1.000 | 164 | 1.000 | - | 158 | 1.000 | - |
| 165 | 1.000 | -3.603 | 165 | 1.000 | -1.718 | 165 | 1.000 | -1.606 | 165 | 1.000 | -1.590 | 165 | 1.000 | 1.000 | 165 | 1.000 | - | 159 | 1.000 | -3.821 |
| 166 | 1.000 | - | 166 | 1.000 | 1.463 | 166 | 1.000 | 1.225 | 166 | 1.000 | 1.940 | 166 | 1.000 | -1.828 | 166 | 1.000 | 1.453 | 160 | 1.000 | -6.209 |
| 167 | 1.000 | - | 167 | 1.000 | - | 167 | 1.000 | 1.736 | 167 | 1.000 | - | 167 | 1.000 | 1.000 | 167 | 1.000 | - | 161 | 1.000 | - |
| 168 | 1.000 | - | 168 | 1.000 | - | 168 | 1.000 | - | 168 | 1.000 | 2.373 | 168 | 1.000 | 1.000 | 168 | 1.000 | - | 162 | 1.000 | - |
| 169 | 1.000 | - | 169 | 1.000 | 1.339 | 169 | 1.000 | -3.638 | 169 | 1.000 | - | 169 | 1.000 | -1.647 | 169 | 1.000 | 1.393 | 163 | 1.000 | - |
| 170 | 1.000 | - | 170 | 1.000 | - | 170 | 1.000 | 7.098 | 170 | 1.000 | 1.645 | 170 | 1.000 | -1.166 | 170 | 1.000 | 1.143 | 164 | 1.000 | - |
| 171 | 1.000 | - | 171 | 1.000 | - | 171 | 1.000 | 7.164 | 171 | 1.000 | -1.005 | 171 | 1.000 | - | 171 | 1.000 | 1.000 | 165 | 1.000 | - |
| 172 | 1.000 | - | 172 | 1.000 | 1.004 | 172 | 1.000 | 3.228 | 172 | 1.000 | - | 172 | 1.000 | 1.000 | 172 | 1.000 | - | 166 | 1.000 | - |
| 173 | 1.000 | - | 173 | 1.000 | - | 173 | 1.000 | - | 173 | 1.000 | - | 173 | 1.000 | - | 173 | 1.000 | 1.000 | 167 | 1.000 | -4.303 |
| 174 | 1.000 | - | 174 | 1.000 | - | 174 | 1.000 | -3.143 | 174 | 1.000 | -1.886 | 174 | 1.000 | -1.182 | 174 | 1.000 | 1.154 | 168 | 1.000 | - |
| 175 | 1.000 | - | 175 | 1.000 | - | 175 | 1.000 | -5.022 | 175 | 1.000 | - | 175 | 1.000 | - | 175 | 1.000 | - | 169 | 1.000 | - |
| 177 | 1.000 | - | 177 | 1.000 | - | 176 | 1.000 | - | 176 | 1.000 | 1.547 | 177 | 1.000 | -1.635 | 177 | 1.000 | 1.388 | 170 | 1.000 | - |
| 178 | 1.000 | -6.080 | 178 | 1.000 | - | 177 | 1.000 | - | 177 | 1.000 | 1.208 | 178 | 1.000 | - | 178 | 1.000 | 1.000 | 171 | 1.000 | - |
| 179 | 1.000 | -3.095 | 179 | 1.000 | -1.801 | 178 | 1.000 | - | 178 | 1.000 | - | 179 | 1.000 | 1.029 | 179 | 1.000 | -1.030 | 172 | 1.000 | -7.240 |
| 180 | 1.000 | -3.611 | 180 | 1.000 | 2.881 | 179 | 1.000 | 3.304 | 179 | 1.000 | 1.612 | 180 | 1.000 | 1.387 | 180 | 1.000 | -1.630 | 173 | 1.000 | - |
| 181 | 1.000 | -4.786 | 181 | 1.000 | 2.530 | 180 | 1.000 | - | 180 | 1.000 | - | 181 | 1.000 | - | 181 | 1.000 | 1.000 | 174 | 1.000 | - |
| 182 | 1.000 | -1.848 | 182 | 1.000 | 4.857 | 181 | 1.000 | - | 181 | 1.000 | - | 182 | 1.000 | 1.154 | 182 | 1.000 | -1.182 | 175 | 1.000 | - |
| 183 | 1.000 | - | 183 | 1.000 | - | 182 | 1.000 | - | 182 | 1.000 | - | 183 | 1.000 | 1.415 | 183 | 1.000 | -1.711 | 176 | 1.000 | - |
| 184 | 1.000 | -1.449 | 184 | 1.000 | - | 183 | 1.000 | -1.432 | 183 | 1.000 | 1.028 | 184 | 1.000 | -2.938 | 184 | 1.000 | 1.660 | 177 | 1.000 | -6.852 |
| 185 | 1.000 | 4.897 | 185 | 1.000 | 3.378 | 184 | 1.000 | 1.455 | 184 | 1.000 | 3.072 | 185 | 1.000 | 1.000 | 185 | 1.000 | - | 178 | 1.000 | - |
| 186 | 1.000 | -2.076 | 186 | 1.000 | 2.285 | 185 | 1.000 | -1.418 | 185 | 1.000 | -1.236 | 186 | 1.000 | 1.000 | 186 | 1.000 | - | 179 | 1.000 | - |
| 187 | 1.000 | -4.189 | 187 | 1.000 | 4.158 | 186 | 1.000 | - | 186 | 1.000 | -1.494 | 187 | 1.000 | 1.329 | 187 | 1.000 | -1.491 | 180 | 1.000 | - |
| 188 | 1.000 | - | 188 | 1.000 | 2.613 | 187 | 1.000 | - | 187 | 1.000 | - | 188 | 1.000 | - | 188 | 1.000 | - | 181 | 1.000 | - |
| 189 | 1.000 | -4.374 | 189 | 1.000 | - | 188 | 1.000 | 1.081 | 188 | 1.000 | - | 189 | 1.000 | -1.298 | 189 | 1.000 | 1.230 | 182 | 1.000 | - |
| 190 | 1.000 | - | 190 | 1.000 | - | 190 | 1.000 | - | 190 | 1.000 | - | 190 | 1.000 | 1.000 | 190 | 1.000 | - | 183 | 1.000 | -2.485 |
| 191 | 1.000 | - | 191 | 1.000 | - | 191 | 1.000 | - | 191 | 1.000 | 2.091 | 191 | 1.000 | 1.000 | 191 | 1.000 | - | 184 | 1.000 | -9.363 |
| 192 | 1.000 | - | 192 | 1.000 | 1.162 | 192 | 1.000 | - | 192 | 1.000 | - | 192 | 1.000 | 1.016 | 192 | 1.000 | -1.017 | 185 | 1.000 | - |
| 193 | 1.000 | - | 193 | 1.000 | - | 193 | 1.000 | - | 193 | 1.000 | - | 193 | 1.000 | - | 193 | 1.000 | 1.000 | 186 | 1.000 | - |
| 194 | 1.000 | - | 194 | 1.000 | 7.254 | 194 | 1.000 | - | 194 | 1.000 | 1.456 | 194 | 1.000 | 1.000 | 194 | 1.000 | - | 187 | 1.000 | - |
| 195 | 1.000 | -1.239 | 195 | 1.000 | 1.839 | 195 | 1.000 | - | 195 | 1.000 | - | 195 | 1.000 | - | 195 | 1.000 | - | 188 | 1.000 | -9.509 |
| 196 | 1.000 | - | 196 | 1.000 | - | 196 | 1.000 | - | 196 | 1.000 | - | 196 | 1.000 | 1.000 | 196 | 1.000 | - | 189 | 1.000 | -3.003 |
| 197 | 1.000 | 1.059 | 197 | 1.000 | - | 197 | 1.000 | -2.823 | 197 | 1.000 | - | 197 | 1.000 | -1.733 | 197 | 1.000 | 1.423 | 190 | 1.000 | -12.951 |
| 198 | 1.000 | - | 198 | 1.000 | - | 198 | 1.000 | 2.459 | 198 | 1.000 | - | 198 | 1.000 | 1.000 | 198 | 1.000 | - | 191 | 1.000 | - |
| 199 | 1.000 | - | 199 | 1.000 | 1.025 | 199 | 1.000 | - | 199 | 1.000 | - | 199 | 1.000 | - | 199 | 1.000 | 1.000 | 192 | 1.000 | -6.924 |
| 200 | 1.000 | - | 200 | 1.000 | - | 200 | 1.000 | - | 200 | 1.000 | - | 200 | 1.000 | 1.000 | 200 | 1.000 | - | 193 | 1.000 | - |
| 201 | 1.000 | -17.010 | 201 | 1.000 | -30.712 | 201 | 1.000 | - | 201 | 1.000 | 1.434 | 201 | 1.000 | 1.551 | 201 | 1.000 | -2.226 | 194 | 1.000 | -32.738 |
| 202 | 1.000 | - | 202 | 1.000 | - | 202 | 1.000 | - | 202 | 1.000 | - | 202 | 1.000 | - | 202 | 1.000 | - | 195 | 1.000 | - |
| 203 | 1.000 | -1.288 | 203 | 1.000 | - | 203 | 1.000 | - | 203 | 1.000 | 2.701 | 203 | 1.000 | - | 203 | 1.000 | 1.000 | 196 | 1.000 | -13.948 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 204 | 1.000 | 1.934 | 204 | 1.000 | - | 204 | 1.000 | -1.500 | 204 | 1.000 | -1.433 | 204 | 1.000 | 1.000 | 204 | 1.000 | - | 197 | 1.000 | -3.611 |
| 205 | 1.000 | 2.471 | 205 | 1.000 | - | 205 | 1.000 | 2.040 | 205 | 1.000 | - | 205 | 1.000 | 1.000 | 205 | 1.000 | - | 198 | 1.000 | -8.400 |
| 206 | 1.000 | -2.371 | 206 | 1.000 | - | 206 | 1.000 | - | 206 | 1.000 | - | 206 | 1.000 | 1.033 | 206 | 1.000 | -1.034 | 199 | 1.000 | -11.311 |
| 207 | 1.000 | 1.825 | 207 | 1.000 | - | 207 | 1.000 | - | 207 | 1.000 | - | 207 | 1.000 | - | 207 | 1.000 | - | 200 | 1.000 | -5.348 |
| 208 | 1.000 | 1.646 | 208 | 1.000 | - | 208 | 1.000 | 1.254 | 208 | 1.000 | 5.146 | 208 | 1.000 | - | 208 | 1.000 | 1.000 | 201 | 1.000 | -1.243 |
| 209 | 1.000 | - | 209 | 1.000 | -2.374 | 209 | 1.000 | -3.449 | 209 | 1.000 | -2.692 | 209 | 1.000 | 1.038 | 209 | 1.000 | -1.040 | 202 | 1.000 | -3.467 |
| 210 | 1.000 | - | 210 | 1.000 | -1.685 | 210 | 1.000 | - | 210 | 1.000 | - | 210 | 1.000 | - | 210 | 1.000 | 1.000 | 203 | 1.000 | -13.154 |
| 211 | 1.000 | - | 211 | 1.000 | - | 211 | 1.000 | - | 211 | 1.000 | - | 211 | 1.000 | - | 211 | 1.000 | 1.000 | 204 | 1.000 | -8.731 |
| 212 | 1.000 | - | 212 | 1.000 | - | 212 | 1.000 | - | 212 | 1.000 | - | 212 | 1.000 | - | 212 | 1.000 | 1.000 | 205 | 1.000 | -5.112 |
| 213 | 1.000 | - | 213 | 1.000 | -1.875 | 213 | 1.000 | - | 213 | 1.000 | -3.199 | 213 | 1.000 | - | 213 | 1.000 | 1.000 | 206 | 1.000 | -19.181 |
| 214 | 1.000 | -1.817 | 214 | 1.000 | - | 214 | 1.000 | - | 214 | 1.000 | - | 214 | 1.000 | 1.000 | 214 | 1.000 | - | 207 | 1.000 | -5.914 |
| 215 | 1.000 | 1.015 | 215 | 1.000 | - | 215 | 1.000 | - | 215 | 1.000 | - | 215 | 1.000 | -1.704 | 215 | 1.000 | 1.413 | 208 | 1.000 | - |
| 216 | 1.000 | -1.263 | 216 | 1.000 | 2.047 | 216 | 1.000 | - | 216 | 1.000 | 1.136 | 216 | 1.000 | 1.000 | 216 | 1.000 | - | 209 | 1.000 | - |
| 217 | 1.000 | -1.980 | 217 | 1.000 | - | 217 | 1.000 | - | 217 | 1.000 | - | 217 | 1.000 | - | 217 | 1.000 | - | 210 | 1.000 | -6.253 |
| 218 | 1.000 | -1.944 | 218 | 1.000 | - | 218 | 1.000 | - | 218 | 1.000 | 1.369 | 218 | 1.000 | 1.745 | 218 | 1.000 | -3.923 | 211 | 1.000 | - |
| 219 | 1.000 | - | 219 | 1.000 | - | 219 | 1.000 | -1.111 | 219 | 1.000 | - | 219 | 1.000 | - | 219 | 1.000 | - | 212 | 1.000 | -2.796 |
| 220 | 1.000 | -2.298 | 220 | 1.000 | 6.330 | 220 | 1.000 | 1.752 | 220 | 1.000 | 1.053 | 220 | 1.000 | - | 220 | 1.000 | - | 213 | 1.000 | - |
| 221 | 1.000 | - | 221 | 1.000 | - | 221 | 1.000 | - | 221 | 1.000 | - | 221 | 1.000 | - | 221 | 1.000 | - | 214 | 1.000 | -20.494 |
| 222 | 1.000 | - | 222 | 1.000 | - | 222 | 1.000 | -1.153 | 222 | 1.000 | -2.887 | 222 | 1.000 | - | 222 | 1.000 | 1.000 | 215 | 1.000 | -1.433 |
| 223 | 1.000 | - | 223 | 1.000 | - | 223 | 1.000 | - | 223 | 1.000 | 1.004 | 223 | 1.000 | - | 223 | 1.000 | - | 216 | 1.000 | -7.587 |
| 224 | 1.000 | 1.182 | 224 | 1.000 | - | 224 | 1.000 | - | 224 | 1.000 | - | 224 | 1.000 | - | 224 | 1.000 | - | 217 | 1.000 | -1.933 |
| 225 | 1.000 | - | 225 | 1.000 | -1.914 | 225 | 1.000 | - | 225 | 1.000 | - | 225 | 1.000 | 1.000 | 225 | 1.000 | - | 218 | 1.000 | - |
| 226 | 1.000 | - | 226 | 1.000 | - | 226 | 1.000 | - | 226 | 1.000 | - | 226 | 1.000 | 1.000 | 226 | 1.000 | - | 219 | 1.000 | - |
| 227 | 1.000 | 5.619 | 227 | 1.000 | -3.425 | 227 | 1.000 | -8.711 | 227 | 1.000 | - | 227 | 1.000 | - | 227 | 1.000 | 1.000 | 220 | 1.000 | -4.878 |
| 228 | 1.000 | - | 228 | 1.000 | - | 228 | 1.000 | - | 228 | 1.000 | - | 228 | 1.000 | - | 228 | 1.000 | 1.000 | 221 | 1.000 | - |
| 229 | 1.000 | -43.180 | 229 | 1.000 | - | 229 | 1.000 | - | 229 | 1.000 | - | 229 | 1.000 | - | 229 | 1.000 | - | 222 | 1.000 | -2.083 |
| 230 | 1.000 | -2.867 | 230 | 1.000 | -5.398 | 230 | 1.000 | - | 230 | 1.000 | 2.920 | 230 | 1.000 | 1.382 | 230 | 1.000 | -1.618 | 223 | 1.000 | - |
| 231 | 1.000 | -3.142 | 231 | 1.000 | 2.439 | 231 | 1.000 | - | 231 | 1.000 | - | 231 | 1.000 | -1.715 | 231 | 1.000 | 1.417 | 224 | 1.000 | - |
| 232 | 1.000 | - | 232 | 1.000 | - | 232 | 1.000 | - | 232 | 1.000 | - | 232 | 1.000 | - | 232 | 1.000 | - | 225 | 1.000 | -5.468 |
| 233 | 1.000 | 1.015 | 233 | 1.000 | - | 233 | 1.000 | - | 233 | 1.000 | 2.116 | 233 | 1.000 | - | 233 | 1.000 | 1.000 | 226 | 1.000 | - |
| 234 | 1.000 | - | 234 | 1.000 | -1.381 | 234 | 1.000 | -8.021 | 234 | 1.000 | - | 234 | 1.000 | - | 234 | 1.000 | 1.000 | 227 | 1.000 | - |
| 235 | 1.000 | -9.132 | 235 | 1.000 | - | 235 | 1.000 | - | 235 | 1.000 | - | 235 | 1.000 | - | 235 | 1.000 | - | 228 | 1.000 | -4.803 |
| 236 | 1.000 | -9.784 | 236 | 1.000 | - | 236 | 1.000 | - | 236 | 1.000 | - | 236 | 1.000 | 1.524 | 236 | 1.000 | -2.100 | 229 | 1.000 | - |
| 237 | 1.000 | 1.042 | 237 | 1.000 | - | 237 | 1.000 | -1.377 | 237 | 1.000 | -1.216 | 237 | 1.000 | - | 237 | 1.000 | - | 230 | 1.000 | -4.927 |
| 238 | 1.000 | - | 238 | 1.000 | 2.477 | 238 | 1.000 | -4.703 | 238 | 1.000 | -1.191 | 238 | 1.000 | - | 238 | 1.000 | - | 231 | 1.000 | - |
| 239 | 1.000 | -1.670 | 239 | 1.000 | - | 239 | 1.000 | - | 239 | 1.000 | 1.067 | 239 | 1.000 | - | 239 | 1.000 | 1.000 | 232 | 1.000 | -11.564 |
| 240 | 1.000 | -14.906 | 240 | 1.000 | -15.964 | 240 | 1.000 | - | 240 | 1.000 | - | 240 | 1.000 | - | 240 | 1.000 | - | 233 | 1.000 | - |
| 241 | 1.000 | -3.192 | 241 | 1.000 | -2.164 | 241 | 1.000 | - | 241 | 1.000 | 2.934 | 241 | 1.000 | - | 241 | 1.000 | 1.000 | 234 | 1.000 | -6.817 |
| 242 | 1.000 | -2.312 | 242 | 1.000 | 2.717 | 242 | 1.000 | -1.172 | 242 | 1.000 | - | 242 | 1.000 | - | 242 | 1.000 | - | 235 | 1.000 | - |
| 243 | 1.000 | 1.600 | 243 | 1.000 | - | 243 | 1.000 | - | 243 | 1.000 | -1.413 | 243 | 1.000 | - | 243 | 1.000 | - | 236 | 1.000 | - |
| 244 | 1.000 | -3.618 | 244 | 1.000 | - | 244 | 1.000 | 1.027 | 244 | 1.000 | -7.007 | 244 | 1.000 | 1.000 | 244 | 1.000 | - | 237 | 1.000 | -1.700 |
| 245 | 1.000 | 8.119 | 245 | 1.000 | - | 245 | 1.000 | -1.593 | 245 | 1.000 | -1.985 | 245 | 1.000 | -1.020 | 245 | 1.000 | 1.019 | 238 | 1.000 | -13.965 |
| 246 | 1.000 | - | 246 | 1.000 | - | 246 | 1.000 | - | 246 | 1.000 | 4.025 | 246 | 1.000 | - | 246 | 1.000 | - | 239 | 1.000 | -2.623 |
| 247 | 1.000 | - | 247 | 1.000 | -1.964 | 247 | 1.000 | - | 247 | 1.000 | 1.548 | 247 | 1.000 | - | 247 | 1.000 | 1.000 | 240 | 1.000 | - |
| 248 | 1.000 | - | 248 | 1.000 | - | 248 | 1.000 | - | 248 | 1.000 | -1.053 | 248 | 1.000 | -2.114 | 248 | 1.000 | 1.527 | 241 | 1.000 | - |
| 249 | 1.000 | -10.190 | 249 | 1.000 | -2.404 | 249 | 1.000 | - | 249 | 1.000 | -7.658 | 249 | 1.000 | 1.542 | 249 | 1.000 | -2.185 | 242 | 1.000 | - |
| 250 | 1.000 | - | 250 | 1.000 | - | 250 | 1.000 | -2.942 | 250 | 1.000 | - | 250 | 1.000 | 1.000 | 250 | 1.000 | - | 243 | 1.000 | - |
| 251 | 1.000 | 3.236 | 251 | 1.000 | - | 251 | 1.000 | 1.738 | 251 | 1.000 | - | 251 | 1.000 | -1.113 | 251 | 1.000 | 1.101 | 244 | 1.000 | 1.856 |
| 252 | 1.000 | - | 252 | 1.000 | - | 252 | 1.000 | - | 252 | 1.000 | - | 252 | 1.000 | - | 252 | 1.000 | - | 245 | 1.000 | - |
| 253 | 1.000 | -8.559 | 253 | 1.000 | 2.881 | 253 | 1.000 | -1.583 | 253 | 1.000 | -1.519 | 253 | 1.000 | -4.614 | 253 | 1.000 | 1.783 | 246 | 1.000 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 254 | 1.000 | - | 254 | 1.000 | -1.958 | 254 | 1.000 | -1.051 | 254 | 1.000 | 2.135 | 254 | 1.000 | 1.646 | 254 | 1.000 | -2.826 | 247 | 1.000 | - |
| 255 | 1.000 | -2.756 | 255 | 1.000 | - | 255 | 1.000 | 3.785 | 255 | 1.000 | - | 255 | 1.000 | 1.000 | 255 | 1.000 | - | 248 | 1.000 | - |
| 256 | 1.000 | -17.421 | 256 | 1.000 | -3.277 | 256 | 1.000 | 2.155 | 256 | 1.000 | - | 256 | 1.000 | 1.000 | 256 | 1.000 | - | 249 | 1.000 | - |
| 257 | 1.000 | -1.214 | 257 | 1.000 | - | 257 | 1.000 | 1.335 | 257 | 1.000 | - | 257 | 1.000 | - | 257 | 1.000 | 1.000 | 250 | 1.000 | - |
| 258 | 1.000 | - | 258 | 1.000 | -2.242 | 258 | 1.000 | - | 258 | 1.000 | - | 258 | 1.000 | - | 258 | 1.000 | 1.000 | 251 | 1.000 | - |
| 259 | 1.000 | -4.853 | 259 | 1.000 | 1.076 | 259 | 1.000 | - | 259 | 1.000 | - | 259 | 1.000 | 1.500 | 259 | 1.000 | -2.000 | 252 | 1.000 | - |
| 260 | 1.000 | - | 260 | 1.000 | - | 260 | 1.000 | -6.018 | 260 | 1.000 | - | 260 | 1.000 | - | 260 | 1.000 | - | 253 | 1.000 | -32.948 |
| 261 | 1.000 | -1.934 | 261 | 1.000 | - | 261 | 1.000 | -2.180 | 261 | 1.000 | -2.569 | 261 | 1.000 | - | 261 | 1.000 | - | 254 | 1.000 | -30.954 |
| 262 | 1.000 | - | 262 | 1.000 | - | 262 | 1.000 | - | 262 | 1.000 | - | 262 | 1.000 | 1.000 | 262 | 1.000 | - | 255 | 1.000 | - |
| 263 | 1.000 | - | 263 | 1.000 | - | 263 | 1.000 | - | 263 | 1.000 | - | 263 | 1.000 | - | 263 | 1.000 | - | 256 | 1.000 | - |
| 264 | 1.000 | 3.358 | 264 | 1.000 | - | 264 | 1.000 | 1.110 | 264 | 1.000 | 1.215 | 264 | 1.000 | - | 264 | 1.000 | 1.000 | 257 | 1.000 | - |
| 265 | 1.000 | - | 265 | 1.000 | - | 265 | 1.000 | - | 265 | 1.000 | 2.229 | 265 | 1.000 | - | 265 | 1.000 | - | 258 | 1.000 | - |
| 266 | 1.000 | -1.322 | 266 | 1.000 | - | 266 | 1.000 | -3.892 | 266 | 1.000 | -1.846 | 266 | 1.000 | -2.152 | 266 | 1.000 | 1.535 | 259 | 1.000 | -5.002 |
| 267 | 1.000 | - | 267 | 1.000 | - | 267 | 1.000 | 1.148 | 267 | 1.000 | - | 267 | 1.000 | - | 267 | 1.000 | 1.000 | 260 | 1.000 | - |
| 268 | 1.000 | - | 268 | 1.000 | -1.069 | 268 | 1.000 | -1.780 | 268 | 1.000 | - | 268 | 1.000 | -1.227 | 268 | 1.000 | 1.185 | 261 | 1.000 | -2.972 |
| 269 | 1.000 | - | 269 | 1.000 | 1.924 | 269 | 1.000 | 1.329 | 269 | 1.000 | 1.420 | 269 | 1.000 | - | 269 | 1.000 | - | 262 | 1.000 | -5.669 |
| 270 | 1.000 | 1.387 | 270 | 1.000 | - | 270 | 1.000 | - | 270 | 1.000 | - | 270 | 1.000 | - | 270 | 1.000 | 1.000 | 263 | 1.000 | - |
| 271 | 1.000 | - | 271 | 1.000 | - | 271 | 1.000 | - | 271 | 1.000 | - | 271 | 1.000 | 1.000 | 271 | 1.000 | - | 264 | 1.000 | -3.660 |
| 272 | 1.000 | - | 272 | 1.000 | - | 272 | 1.000 | - | 272 | 1.000 | - | 272 | 1.000 | - | 272 | 1.000 | - | 265 | 1.000 | - |
| 273 | 1.000 | -11.485 | 273 | 1.000 | - | 273 | 1.000 | -1.725 | 273 | 1.000 | - | 273 | 1.000 | 1.000 | 273 | 1.000 | - | 266 | 1.000 | -1.391 |
| 274 | 1.000 | - | 274 | 1.000 | - | 274 | 1.000 | - | 274 | 1.000 | - | 274 | 1.000 | 1.000 | 274 | 1.000 | - | 267 | 1.000 | -4.411 |
| 275 | 1.000 | - | 275 | 1.000 | - | 275 | 1.000 | - | 275 | 1.000 | - | 275 | 1.000 | 1.173 | 275 | 1.000 | -1.209 | 268 | 1.000 | -3.199 |
| 276 | 1.000 | -2.414 | 276 | 1.000 | 1.661 | 276 | 1.000 | 6.821 | 276 | 1.000 | 6.374 | 276 | 1.000 | - | 276 | 1.000 | - | 269 | 1.000 | -1.680 |
| 277 | 1.000 | -4.366 | 277 | 1.000 | 2.587 | 277 | 1.000 | - | 277 | 1.000 | - | 277 | 1.000 | - | 277 | 1.000 | - | 270 | 1.000 | -2.808 |
| 278 | 1.000 | - | 278 | 1.000 | 8.815 | 278 | 1.000 | - | 278 | 1.000 | - | 278 | 1.000 | - | 278 | 1.000 | - | 271 | 1.000 | - |
| 279 | 1.000 | -3.137 | 279 | 1.000 | -1.743 | 279 | 1.000 | - | 279 | 1.000 | - | 279 | 1.000 | - | 279 | 1.000 | 1.000 | 272 | 1.000 | - |
| 280 | 1.000 | - | 280 | 1.000 | - | 280 | 1.000 | - | 280 | 1.000 | - | 280 | 1.000 | - | 280 | 1.000 | - | 273 | 1.000 | - |
| 281 | 1.000 | 9.790 | 281 | 1.000 | - | 281 | 1.000 | - | 281 | 1.000 | - | 281 | 1.000 | 1.000 | 281 | 1.000 | - | 274 | 1.000 | - |
| 282 | 1.000 | - | 282 | 1.000 | -2.485 | 282 | 1.000 | - | 282 | 1.000 | - | 282 | 1.000 | - | 282 | 1.000 | - | 275 | 1.000 | - |
| 283 | 1.000 | -3.688 | 283 | 1.000 | -1.975 | 283 | 1.000 | - | 283 | 1.000 | - | 283 | 1.000 | 1.000 | 283 | 1.000 | - | 276 | 1.000 | -4.903 |
| 284 | 1.000 | - | 284 | 1.000 | - | 284 | 1.000 | - | 284 | 1.000 | - | 284 | 1.000 | - | 284 | 1.000 | - | 277 | 1.000 | - |
| 285 | 1.000 | -4.837 | 285 | 1.000 | - | 285 | 1.000 | - | 285 | 1.000 | - | 285 | 1.000 | 1.000 | 285 | 1.000 | - | 278 | 1.000 | - |
| 286 | 1.000 | -1.255 | 286 | 1.000 | - | 286 | 1.000 | - | 286 | 1.000 | -1.821 | 286 | 1.000 | 1.000 | 286 | 1.000 | - | 279 | 1.000 | - |
| 287 | 1.000 | - | 287 | 1.000 | - | 287 | 1.000 | 3.913 | 287 | 1.000 | 3.227 | 287 | 1.000 | 1.000 | 287 | 1.000 | - | 280 | 1.000 | - |
| 288 | 1.000 | -5.378 | 288 | 1.000 | -2.074 | 288 | 1.000 | 3.794 | 288 | 1.000 | 1.272 | 288 | 1.000 | - | 288 | 1.000 | - | 281 | 1.000 | -13.599 |
| 289 | 1.000 | -1.724 | 289 | 1.000 | - | 289 | 1.000 | 1.513 | 289 | 1.000 | 1.582 | 289 | 1.000 | - | 289 | 1.000 | 1.000 | 282 | 1.000 | - |
| 290 | 1.000 | - | 290 | 1.000 | - | 290 | 1.000 | -1.111 | 290 | 1.000 | -2.783 | 290 | 1.000 | - | 290 | 1.000 | 1.000 | | 1.000 | |
| 291 | 1.000 | 1.017 | 291 | 1.000 | - | 291 | 1.000 | -1.030 | 291 | 1.000 | - | 291 | 1.000 | 1.000 | 291 | 1.000 | - | | | |
| 292 | 1.000 | 1.169 | 292 | 1.000 | - | 292 | 1.000 | - | 292 | 1.000 | - | 292 | 1.000 | 1.000 | 292 | 1.000 | - | | | |
| 293 | 1.000 | - | 293 | 1.000 | 1.111 | 293 | 1.000 | 2.205 | 293 | 1.000 | - | 293 | 1.000 | 1.000 | 293 | 1.000 | - | | | |
| 294 | 1.000 | -3.864 | 294 | 1.000 | -2.714 | 294 | 1.000 | - | 294 | 1.000 | - | 294 | 1.000 | 1.000 | 294 | 1.000 | - | | | |
| 295 | 1.000 | 7.086 | 295 | 1.000 | - | 295 | 1.000 | -2.402 | 295 | 1.000 | -3.762 | 295 | 1.000 | 1.477 | 295 | 1.000 | -1.912 | | | |
| 296 | 1.000 | - | 296 | 1.000 | - | 296 | 1.000 | -1.878 | 296 | 1.000 | -2.368 | 296 | 1.000 | 1.446 | 296 | 1.000 | -1.805 | | | |
| 297 | 1.000 | - | 297 | 1.000 | - | 297 | 1.000 | - | 297 | 1.000 | - | 297 | 1.000 | 1.000 | 297 | 1.000 | - | | | |
| 298 | 1.000 | -1.870 | 298 | 1.000 | - | 298 | 1.000 | - | 298 | 1.000 | -1.310 | 298 | 1.000 | -1.520 | 298 | 1.000 | 1.342 | | | |
| 299 | 1.000 | -1.433 | 299 | 1.000 | - | 299 | 1.000 | - | 299 | 1.000 | - | 299 | 1.000 | 1.000 | 299 | 1.000 | - | | | |
| 300 | 1.000 | -3.665 | 300 | 1.000 | - | 300 | 1.000 | - | 300 | 1.000 | - | 300 | 1.000 | 1.092 | 300 | 1.000 | -1.102 | | | |
| 301 | 1.000 | -17.869 | 301 | 1.000 | -16.109 | 301 | 1.000 | - | 301 | 1.000 | - | 301 | 1.000 | 1.000 | 301 | 1.000 | - | | | |
| 302 | 1.000 | - | 302 | 1.000 | -3.532 | 302 | 1.000 | - | 302 | 1.000 | - | 302 | 1.000 | - | 302 | 1.000 | 1.000 | | | |
| 303 | 1.000 | -4.516 | 303 | 1.000 | - | 303 | 1.000 | - | 303 | 1.000 | - | 303 | 1.000 | 1.108 | 303 | 1.000 | -1.122 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 304 | 1.000 | - | 304 | 1.000 | -1.418 | 304 | 1.000 | - | 304 | 1.000 | - | 304 | 1.000 | - | 304 | 1.000 | 1.000 |
| 305 | 1.000 | - | 305 | 1.000 | - | 305 | 1.000 | -1.013 | 305 | 1.000 | -1.666 | 305 | 1.000 | - | 305 | 1.000 | - |
| 306 | 1.000 | - | 306 | 1.000 | - | 306 | 1.000 | - | 306 | 1.000 | - | 306 | 1.000 | 1.000 | 306 | 1.000 | - |
| 307 | 1.000 | - | 307 | 1.000 | - | 307 | 1.000 | -2.072 | 307 | 1.000 | -4.114 | 307 | 1.000 | - | 307 | 1.000 | - |
| 308 | 1.000 | - | 308 | 1.000 | - | 309 | 1.000 | - | 309 | 1.000 | - | 308 | 1.000 | - | 308 | 1.000 | - |
| 309 | 1.000 | - | 309 | 1.000 | -15.950 | 310 | 1.000 | -2.316 | 310 | 1.000 | - | 309 | 1.000 | 1.000 | 309 | 1.000 | - |
| 310 | 1.000 | -1.391 | 310 | 1.000 | - | 311 | 1.000 | -1.139 | 311 | 1.000 | - | 310 | 1.000 | - | 310 | 1.000 | 1.000 |
| 311 | 1.000 | 1.746 | 311 | 1.000 | - | 312 | 1.000 | - | 312 | 1.000 | - | 311 | 1.000 | - | 311 | 1.000 | - |
| 312 | 1.000 | -2.320 | 312 | 1.000 | - | 313 | 1.000 | -1.277 | 313 | 1.000 | - | 312 | 1.000 | 1.000 | 312 | 1.000 | - |
| 313 | 1.000 | -1.818 | 313 | 1.000 | 2.900 | 314 | 1.000 | -2.128 | 314 | 1.000 | -2.516 | 313 | 1.000 | - | 313 | 1.000 | - |
| 314 | 1.000 | - | 314 | 1.000 | - | 315 | 1.000 | - | 315 | 1.000 | - | 314 | 1.000 | - | 314 | 1.000 | - |
| 315 | 1.000 | - | 315 | 1.000 | -2.692 | 316 | 1.000 | - | 316 | 1.000 | - | 315 | 1.000 | 1.000 | 315 | 1.000 | - |
| 316 | 1.000 | - | 316 | 1.000 | - | 317 | 1.000 | - | 317 | 1.000 | -1.293 | 316 | 1.000 | - | 316 | 1.000 | - |
| 317 | 1.000 | - | 317 | 1.000 | - | 318 | 1.000 | - | 318 | 1.000 | - | 317 | 1.000 | - | 317 | 1.000 | 1.000 |
| 318 | 1.000 | -1.685 | 318 | 1.000 | 1.473 | 319 | 1.000 | 1.066 | 319 | 1.000 | -1.497 | 318 | 1.000 | - | 318 | 1.000 | - |
| 319 | 1.000 | 2.055 | 319 | 1.000 | - | 320 | 1.000 | - | 320 | 1.000 | - | 319 | 1.000 | 1.000 | 319 | 1.000 | - |
| 320 | 1.000 | 1.238 | 320 | 1.000 | -1.930 | 321 | 1.000 | - | 321 | 1.000 | -1.769 | 320 | 1.000 | - | 320 | 1.000 | - |
| 321 | 1.000 | -3.588 | 321 | 1.000 | - | 322 | 1.000 | -2.246 | 322 | 1.000 | -5.028 | 321 | 1.000 | - | 321 | 1.000 | - |
| 322 | 1.000 | - | 322 | 1.000 | - | 323 | 1.000 | 1.190 | 323 | 1.000 | -2.159 | 322 | 1.000 | - | 322 | 1.000 | - |
| 323 | 1.000 | - | 323 | 1.000 | - | 324 | 1.000 | 1.638 | 324 | 1.000 | -2.892 | 323 | 1.000 | 1.000 | 323 | 1.000 | - |
| 324 | 1.000 | -1.395 | 324 | 1.000 | -3.595 | 325 | 1.000 | - | 325 | 1.000 | - | 324 | 1.000 | 1.000 | 324 | 1.000 | - |
| 325 | 1.000 | -1.485 | 325 | 1.000 | -1.065 | 326 | 1.000 | - | 326 | 1.000 | - | 325 | 1.000 | 1.000 | 325 | 1.000 | - |
| 326 | 1.000 | -3.318 | 326 | 1.000 | -4.441 | 327 | 1.000 | -1.720 | 327 | 1.000 | -6.432 | 326 | 1.000 | 1.481 | 326 | 1.000 | -1.928 |
| 327 | 1.000 | 11.476 | 327 | 1.000 | 6.286 | 328 | 1.000 | - | 328 | 1.000 | - | 327 | 1.000 | - | 327 | 1.000 | - |
| 328 | 1.000 | -1.194 | 328 | 1.000 | -2.904 | 329 | 1.000 | -3.611 | 329 | 1.000 | - | 328 | 1.000 | -1.429 | 328 | 1.000 | 1.300 |
| 329 | 1.000 | 1.639 | 329 | 1.000 | - | 330 | 1.000 | -2.488 | 330 | 1.000 | -3.424 | 329 | 1.000 | - | 329 | 1.000 | 1.000 |
| 330 | 1.000 | -3.208 | 330 | 1.000 | -5.735 | | | | | | | 330 | 1.000 | 1.071 | 330 | 1.000 | -1.077 |
| 331 | 1.000 | - | 331 | 1.000 | 13.101 | | | | | | | 331 | 1.000 | - | 331 | 1.000 | - |
| 332 | 1.000 | -2.124 | 332 | 1.000 | - | | | | | | | 332 | 1.000 | 1.000 | 332 | 1.000 | - |
| 333 | 1.000 | - | 333 | 1.000 | - | | | | | | | 333 | 1.000 | 1.052 | 333 | 1.000 | -1.055 |
| 334 | 1.000 | - | 334 | 1.000 | - | | | | | | | 334 | 1.000 | - | 334 | 1.000 | - |
| 335 | 1.000 | 6.715 | 335 | 1.000 | 3.070 | | | | | | | 335 | 1.000 | 1.000 | 335 | 1.000 | - |
| 336 | 1.000 | -1.297 | 336 | 1.000 | - | | | | | | | 336 | 1.000 | -1.446 | 336 | 1.000 | 1.309 |
| 337 | 1.000 | -1.118 | 337 | 1.000 | -4.613 | | | | | | | 337 | 1.000 | - | 337 | 1.000 | - |
| 338 | 1.000 | - | 338 | 1.000 | 3.639 | | | | | | | 338 | 1.000 | - | 338 | 1.000 | - |
| 339 | 1.000 | - | 339 | 1.000 | - | | | | | | | 339 | 1.000 | 1.000 | 339 | 1.000 | - |
| 340 | 1.000 | - | 340 | 1.000 | - | | | | | | | 340 | 1.000 | - | 340 | 1.000 | - |
| 341 | 1.000 | - | 341 | 1.000 | 2.128 | | | | | | | 341 | 1.000 | - | 341 | 1.000 | 1.000 |
| 342 | 1.000 | -2.941 | 342 | 1.000 | - | | | | | | | 342 | 1.000 | 1.000 | 342 | 1.000 | - |
| 343 | 1.000 | - | 343 | 1.000 | -4.331 | | | | | | | 343 | 1.000 | - | 343 | 1.000 | - |
| 344 | 1.000 | 2.182 | 344 | 1.000 | - | | | | | | | 344 | 1.000 | 1.000 | 344 | 1.000 | - |
| 345 | 1.000 | - | 345 | 1.000 | -4.432 | | | | | | | 345 | 1.000 | - | 345 | 1.000 | - |
| 346 | 1.000 | 1.212 | 346 | 1.000 | - | | | | | | | 346 | 1.000 | 1.000 | 346 | 1.000 | - |
| 347 | 1.000 | 2.067 | 347 | 1.000 | -1.063 | | | | | | | 347 | 1.000 | - | 347 | 1.000 | - |
| 348 | 1.000 | -1.116 | 348 | 1.000 | - | | | | | | | 348 | 1.000 | - | 348 | 1.000 | 1.000 |
| 349 | 1.000 | -1.012 | 349 | 1.000 | - | | | | | | | 349 | 1.000 | - | 349 | 1.000 | - |
| 350 | 1.000 | - | 350 | 1.000 | - | | | | | | | 350 | 1.000 | - | 350 | 1.000 | - |
| 351 | 1.000 | 2.696 | 351 | 1.000 | 1.470 | | | | | | | 351 | 1.000 | - | 351 | 1.000 | - |
| 352 | 1.000 | -24.075 | 352 | 1.000 | -6.721 | | | | | | | 352 | 1.000 | 1.000 | 352 | 1.000 | - |
| 353 | 1.000 | -2.204 | 353 | 1.000 | -2.158 | | | | | | | 353 | 1.000 | 1.000 | 353 | 1.000 | - |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 354 | 1.000 | 7.512 | 354 | 1.000 | -1.428 |
| 355 | 1.000 | -2.662 | 355 | 1.000 | -10.267 |
| 356 | 1.000 | -1.837 | 356 | 1.000 | - |
| 357 | 1.000 | - | 357 | 1.000 | - |
| 358 | 1.000 | - | 358 | 1.000 | - |
| 359 | 1.000 | - | 359 | 1.000 | - |
| 360 | 1.000 | -4.124 | 360 | 1.000 | -1.282 |
| 361 | 1.000 | - | 361 | 1.000 | 3.245 |
| 362 | 1.000 | -1.869 | 362 | 1.000 | - |
| 363 | 1.000 | - | 363 | 1.000 | - |
| 364 | 1.000 | 9.245 | 364 | 1.000 | - |
| 365 | 1.000 | - | 365 | 1.000 | 2.161 |
| 366 | 1.000 | - | 366 | 1.000 | -3.361 |
| 367 | 1.000 | - | 367 | 1.000 | - |
| 368 | 1.000 | - | 368 | 1.000 | - |
| 369 | 1.000 | -2.092 | 369 | 1.000 | - |
| 370 | 1.000 | - | 370 | 1.000 | - |
| 371 | 1.000 | -1.513 | 371 | 1.000 | - |
| 372 | 1.000 | - | 372 | 1.000 | 2.158 |
| 373 | 1.000 | -1.115 | 373 | 1.000 | - |
| 374 | 1.000 | - | 374 | 1.000 | 2.006 |
| 375 | 1.000 | -1.778 | 375 | 1.000 | -1.392 |
| 376 | 1.000 | - | 376 | 1.000 | - |
| 377 | 1.000 | -2.561 | 377 | 1.000 | - |
| 378 | 1.000 | 1.357 | 378 | 1.000 | 1.041 |
| 379 | 1.000 | 1.720 | 379 | 1.000 | 1.952 |
| 380 | 1.000 | - | 380 | 1.000 | 2.584 |
| 381 | 1.000 | 1.567 | 381 | 1.000 | 15.772 |
| 382 | 1.000 | 3.178 | 382 | 1.000 | - |
| 383 | 1.000 | 1.053 | 383 | 1.000 | - |
| 384 | 1.000 | - | 384 | 1.000 | -1.847 |
| 385 | 1.000 | -17.685 | 385 | 1.000 | -1.168 |
| 386 | 1.000 | - | 386 | 1.000 | -4.086 |
| 387 | 1.000 | - | 387 | 1.000 | - |
| 388 | 1.000 | - | 388 | 1.000 | - |
| 389 | 1.000 | - | 389 | 1.000 | - |
| 390 | 1.000 | 1.199 | 390 | 1.000 | - |
| 391 | 1.000 | 1.000 | 391 | 1.000 | - |
| 392 | 1.000 | -1.215 | 392 | 1.000 | -1.914 |
| 393 | 1.000 | -2.246 | 393 | 1.000 | - |
| 394 | 1.000 | - | 394 | 1.000 | - |
| 395 | 1.000 | - | 395 | 1.000 | 1.118 |
| 396 | 1.000 | - | 396 | 1.000 | - |
| 397 | 1.000 | - | 397 | 1.000 | - |
| 398 | 1.000 | - | 398 | 1.000 | - |
| 399 | 1.000 | - | 399 | 1.000 | -1.254 |
| 400 | 1.000 | 1.156 | 400 | 1.000 | -1.102 |
| 401 | 1.000 | 3.229 | 401 | 1.000 | - |
| 402 | 1.000 | -1.023 | 402 | 1.000 | - |
| 403 | 1.000 | - | 403 | 1.000 | - |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 354 | 1.000 | - | 354 | 1.000 | - |
| 355 | 1.000 | 1.000 | 355 | 1.000 | - |
| 356 | 1.000 | 1.000 | 356 | 1.000 | - |
| 357 | 1.000 | - | 357 | 1.000 | - |
| 358 | 1.000 | - | 358 | 1.000 | - |
| 359 | 1.000 | - | 359 | 1.000 | - |
| 360 | 1.000 | 1.000 | 360 | 1.000 | - |
| 361 | 1.000 | - | 361 | 1.000 | 1.000 |
| 362 | 1.000 | 1.894 | 362 | 1.000 | -9.450 |
| 363 | 1.000 | - | 363 | 1.000 | - |
| 364 | 1.000 | - | 364 | 1.000 | - |
| 365 | 1.000 | 1.000 | 365 | 1.000 | - |
| 366 | 1.000 | - | 366 | 1.000 | - |
| 367 | 1.000 | 1.000 | 367 | 1.000 | - |
| 368 | 1.000 | - | 368 | 1.000 | - |
| 369 | 1.000 | 1.000 | 369 | 1.000 | - |
| 370 | 1.000 | - | 370 | 1.000 | 1.000 |
| 371 | 1.000 | 1.000 | 371 | 1.000 | - |
| 372 | 1.000 | - | 372 | 1.000 | 1.000 |
| 373 | 1.000 | - | 373 | 1.000 | - |
| 374 | 1.000 | 1.000 | 374 | 1.000 | - |
| 375 | 1.000 | 1.248 | 375 | 1.000 | -1.330 |
| 376 | 1.000 | - | 376 | 1.000 | - |
| 377 | 1.000 | 1.000 | 377 | 1.000 | - |
| 378 | 1.000 | - | 378 | 1.000 | - |
| 379 | 1.000 | - | 379 | 1.000 | - |
| 380 | 1.000 | - | 380 | 1.000 | - |
| 381 | 1.000 | - | 381 | 1.000 | 1.000 |
| 382 | 1.000 | 1.000 | 382 | 1.000 | - |
| 383 | 1.000 | - | 383 | 1.000 | - |
| 384 | 1.000 | - | 384 | 1.000 | 1.000 |
| 385 | 1.000 | -1.369 | 385 | 1.000 | 1.270 |
| 386 | 1.000 | 1.558 | 386 | 1.000 | -2.261 |
| 387 | 1.000 | - | 387 | 1.000 | - |
| 388 | 1.000 | - | 388 | 1.000 | - |
| 389 | 1.000 | 1.000 | 389 | 1.000 | - |
| 390 | 1.000 | 1.000 | 390 | 1.000 | - |
| 391 | 1.000 | 1.000 | 391 | 1.000 | - |
| 392 | 1.000 | 1.072 | 392 | 1.000 | -1.078 |
| 393 | 1.000 | 1.000 | 393 | 1.000 | - |
| 394 | 1.000 | - | 394 | 1.000 | - |
| 395 | 1.000 | 1.025 | 395 | 1.000 | -1.026 |
| 396 | 1.000 | 1.000 | 396 | 1.000 | - |
| 397 | 1.000 | - | 397 | 1.000 | - |
| 398 | 1.000 | - | 398 | 1.000 | 1.000 |
| 399 | 1.000 | - | 399 | 1.000 | - |
| 400 | 1.000 | - | 400 | 1.000 | 1.000 |
| 401 | 1.000 | - | 401 | 1.000 | 1.000 |
| 402 | 1.000 | - | 402 | 1.000 | 1.000 |
| 403 | 1.000 | 1.000 | 403 | 1.000 | - |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 404 | 1.000 | 1.307 | 404 | 1.000 | - |
| 405 | 1.000 | 4.221 | 405 | 1.000 | - |
| 406 | 1.000 | -1.063 | 406 | 1.000 | - |
| 407 | 1.000 | - | 407 | 1.000 | 1.026 |
| 408 | 1.000 | -1.098 | 408 | 1.000 | - |
| 409 | 1.000 | 1.027 | 409 | 1.000 | - |
| 410 | 1.000 | - | 410 | 1.000 | - |
| 411 | 1.000 | 1.281 | 411 | 1.000 | - |
| 412 | 1.000 | - | 412 | 1.000 | - |
| 413 | 1.000 | - | 413 | 1.000 | 1.895 |
| 414 | 1.000 | 1.269 | 414 | 1.000 | - |
| 415 | 1.000 | - | 415 | 1.000 | 2.440 |
| 416 | 1.000 | - | 416 | 1.000 | - |
| 417 | 1.000 | - | 417 | 1.000 | - |
| 418 | 1.000 | - | 418 | 1.000 | -2.108 |
| 419 | 1.000 | - | 419 | 1.000 | - |
| 420 | 1.000 | 2.543 | 420 | 1.000 | - |
| 421 | 1.000 | - | 421 | 1.000 | - |
| 422 | 1.000 | 10.694 | 422 | 1.000 | - |
| 423 | 1.000 | - | 423 | 1.000 | - |
| 424 | 1.000 | -1.262 | 424 | 1.000 | -2.783 |
| 425 | 1.000 | - | 425 | 1.000 | - |
| 426 | 1.000 | - | 426 | 1.000 | - |
| 427 | 1.000 | - | 427 | 1.000 | - |
| 428 | 1.000 | - | 428 | 1.000 | - |
| 429 | 1.000 | 1.356 | 429 | 1.000 | - |
| 430 | 1.000 | - | 430 | 1.000 | - |
| 431 | 1.000 | -1.390 | 431 | 1.000 | -1.548 |
| 432 | 1.000 | - | 432 | 1.000 | - |
| 433 | 1.000 | - | 433 | 1.000 | - |
| 434 | 1.000 | - | 434 | 1.000 | -1.838 |
| 435 | 1.000 | - | 435 | 1.000 | -2.221 |
| 436 | 1.000 | - | 436 | 1.000 | - |
| 437 | 1.000 | - | 437 | 1.000 | - |
| 438 | 1.000 | - | 438 | 1.000 | -6.663 |
| 439 | 1.000 | - | 439 | 1.000 | - |
| 440 | 1.000 | - | 440 | 1.000 | - |
| 441 | 1.000 | - | 441 | 1.000 | - |
| 442 | 1.000 | -1.449 | 442 | 1.000 | - |
| 443 | 1.000 | - | 443 | 1.000 | - |
| 444 | 1.000 | 1.576 | 444 | 1.000 | - |
| 445 | 1.000 | -3.392 | 445 | 1.000 | - |
| 446 | 1.000 | -1.329 | 446 | 1.000 | - |
| 447 | 1.000 | 3.129 | 447 | 1.000 | - |
| 448 | 1.000 | 1.955 | 448 | 1.000 | - |
| 449 | 1.000 | 3.232 | 449 | 1.000 | -1.247 |
| 450 | 1.000 | -1.726 | 450 | 1.000 | - |
| 451 | 1.000 | - | 451 | 1.000 | - |
| 452 | 1.000 | 2.754 | 452 | 1.000 | - |
| 453 | 1.000 | -1.199 | 453 | 1.000 | -1.653 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 404 | 1.000 | 1.000 | 404 | 1.000 | - |
| 405 | 1.000 | 1.000 | 405 | 1.000 | - |
| 406 | 1.000 | 1.322 | 406 | 1.000 | -1.475 |
| 407 | 1.000 | - | 407 | 1.000 | - |
| 408 | 1.000 | - | 408 | 1.000 | 1.000 |
| 409 | 1.000 | -2.106 | 409 | 1.000 | 1.525 |
| 410 | 1.000 | 1.000 | 410 | 1.000 | - |
| 411 | 1.000 | - | 411 | 1.000 | - |
| 412 | 1.000 | - | 412 | 1.000 | 1.000 |
| 413 | 1.000 | - | 413 | 1.000 | - |
| 414 | 1.000 | - | 414 | 1.000 | - |
| 415 | 1.000 | - | 415 | 1.000 | - |
| 416 | 1.000 | - | 416 | 1.000 | - |
| 417 | 1.000 | - | 417 | 1.000 | 1.000 |
| 418 | 1.000 | 1.591 | 418 | 1.000 | -2.446 |
| 419 | 1.000 | - | 419 | 1.000 | - |
| 420 | 1.000 | - | 420 | 1.000 | - |
| 421 | 1.000 | 1.000 | 421 | 1.000 | - |
| 422 | 1.000 | - | 422 | 1.000 | - |
| 423 | 1.000 | - | 423 | 1.000 | - |
| 424 | 1.000 | 1.084 | 424 | 1.000 | -1.092 |
| 425 | 1.000 | 1.000 | 425 | 1.000 | - |
| 426 | 1.000 | - | 426 | 1.000 | 1.000 |
| 427 | 1.000 | - | 427 | 1.000 | - |
| 428 | 1.000 | - | 428 | 1.000 | 1.000 |
| 429 | 1.000 | - | 429 | 1.000 | - |
| 430 | 1.000 | 1.000 | 430 | 1.000 | - |
| 431 | 1.000 | 1.534 | 431 | 1.000 | -2.145 |
| 432 | 1.000 | - | 432 | 1.000 | - |
| 433 | 1.000 | -1.035 | 433 | 1.000 | 1.033 |
| 434 | 1.000 | - | 434 | 1.000 | 1.000 |
| 435 | 1.000 | -1.967 | 435 | 1.000 | 1.492 |
| 436 | 1.000 | - | 436 | 1.000 | 1.000 |
| 437 | 1.000 | -2.019 | 437 | 1.000 | 1.505 |
| 438 | 1.000 | 1.395 | 438 | 1.000 | -1.653 |
| 439 | 1.000 | - | 439 | 1.000 | - |
| 440 | 1.000 | -2.758 | 440 | 1.000 | 1.637 |
| 441 | 1.000 | - | 441 | 1.000 | - |
| 442 | 1.000 | -2.527 | 442 | 1.000 | 1.604 |
| 443 | 1.000 | - | 443 | 1.000 | - |
| 444 | 1.000 | - | 444 | 1.000 | - |
| 445 | 1.000 | 1.158 | 445 | 1.000 | -1.188 |
| 446 | 1.000 | 1.231 | 446 | 1.000 | -1.301 |
| 447 | 1.000 | 1.000 | 447 | 1.000 | - |
| 448 | 1.000 | -1.699 | 448 | 1.000 | 1.412 |
| 449 | 1.000 | 1.519 | 449 | 1.000 | -2.077 |
| 450 | 1.000 | - | 450 | 1.000 | - |
| 451 | 1.000 | - | 451 | 1.000 | - |
| 452 | 1.000 | - | 452 | 1.000 | 1.000 |
| 453 | 1.000 | -1.256 | 453 | 1.000 | 1.204 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 454 | 1.000 | - | 454 | 1.000 | - |
| 455 | 1.000 | -1.535 | 455 | 1.000 | - |
| 456 | 1.000 | -9.992 | 456 | 1.000 | - |
| 457 | 1.000 | - | 457 | 1.000 | - |
| 458 | 1.000 | -7.247 | 458 | 1.000 | - |
| 459 | 1.000 | - | 459 | 1.000 | -5.520 |
| 460 | 1.000 | - | 460 | 1.000 | - |
| 461 | 1.000 | - | 461 | 1.000 | 2.416 |
| 462 | 1.000 | -1.304 | 462 | 1.000 | -5.721 |
| 463 | 1.000 | -2.551 | 463 | 1.000 | - |
| 464 | 1.000 | 2.114 | 464 | 1.000 | -2.037 |
| 465 | 1.000 | 2.109 | 465 | 1.000 | - |
| 466 | 1.000 | 2.628 | 466 | 1.000 | 1.047 |
| 467 | 1.000 | - | 467 | 1.000 | - |
| 468 | 1.000 | -2.491 | 468 | 1.000 | - |
| 469 | 1.000 | 1.665 | 469 | 1.000 | 2.402 |
| 470 | 1.000 | - | 470 | 1.000 | - |
| 471 | 1.000 | - | 471 | 1.000 | - |
| 472 | 1.000 | - | 472 | 1.000 | - |
| 473 | 1.000 | -2.209 | 473 | 1.000 | - |
| 474 | 1.000 | - | 474 | 1.000 | 2.650 |
| 475 | 1.000 | 1.186 | 475 | 1.000 | 3.154 |
| 476 | 1.000 | -1.058 | 476 | 1.000 | 1.207 |
| 477 | 1.000 | - | 477 | 1.000 | - |
| 478 | 1.000 | 1.414 | 478 | 1.000 | 2.679 |
| 479 | 1.000 | -2.308 | 479 | 1.000 | - |
| 480 | 1.000 | - | 480 | 1.000 | - |
| 481 | 1.000 | - | 481 | 1.000 | - |
| 482 | 1.000 | -1.721 | 482 | 1.000 | 3.098 |
| 483 | 1.000 | - | 483 | 1.000 | - |
| 484 | 1.000 | 2.532 | 484 | 1.000 | 1.129 |
| 485 | 1.000 | -2.557 | 485 | 1.000 | - |
| 486 | 1.000 | 1.950 | 486 | 1.000 | 1.712 |
| 487 | 1.000 | - | 487 | 1.000 | -1.656 |
| 488 | 1.000 | - | 488 | 1.000 | - |
| 489 | 1.000 | - | 489 | 1.000 | - |
| 490 | 1.000 | 1.115 | 490 | 1.000 | -4.082 |
| 491 | 1.000 | - | 491 | 1.000 | -1.695 |
| 492 | 1.000 | -1.668 | 492 | 1.000 | -4.730 |
| 493 | 1.000 | 2.112 | 493 | 1.000 | - |
| 494 | 1.000 | - | 494 | 1.000 | - |
| 495 | 1.000 | 1.321 | 495 | 1.000 | - |
| 496 | 1.000 | - | 496 | 1.000 | - |
| 497 | 1.000 | - | 497 | 1.000 | - |
| 498 | 1.000 | - | 498 | 1.000 | 2.245 |
| 499 | 1.000 | -1.629 | 499 | 1.000 | -5.233 |
| 500 | 1.000 | - | 500 | 1.000 | - |
| 501 | 1.000 | - | 501 | 1.000 | -1.984 |
| 502 | 1.000 | 1.863 | 502 | 1.000 | -2.128 |
| 503 | 1.000 | -2.873 | 503 | 1.000 | -1.599 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 454 | 1.000 | - | 454 | 1.000 | - |
| 455 | 1.000 | - | 455 | 1.000 | - |
| 456 | 1.000 | - | 456 | 1.000 | 1.000 |
| 457 | 1.000 | - | 457 | 1.000 | - |
| 458 | 1.000 | 1.000 | 458 | 1.000 | - |
| 459 | 1.000 | -1.588 | 459 | 1.000 | 1.370 |
| 460 | 1.000 | 1.000 | 460 | 1.000 | - |
| 461 | 1.000 | 1.000 | 461 | 1.000 | - |
| 462 | 1.000 | 1.000 | 462 | 1.000 | - |
| 463 | 1.000 | 1.000 | 463 | 1.000 | - |
| 464 | 1.000 | 1.000 | 464 | 1.000 | - |
| 465 | 1.000 | - | 465 | 1.000 | - |
| 466 | 1.000 | 1.000 | 466 | 1.000 | - |
| 467 | 1.000 | - | 467 | 1.000 | - |
| 468 | 1.000 | - | 468 | 1.000 | - |
| 469 | 1.000 | - | 469 | 1.000 | - |
| 470 | 1.000 | - | 470 | 1.000 | - |
| 471 | 1.000 | - | 471 | 1.000 | 1.000 |
| 472 | 1.000 | 1.000 | 472 | 1.000 | - |
| 473 | 1.000 | 1.765 | 473 | 1.000 | -4.251 |
| 474 | 1.000 | - | 474 | 1.000 | - |
| 475 | 1.000 | 1.000 | 475 | 1.000 | - |
| 476 | 1.000 | 1.000 | 476 | 1.000 | - |
| 477 | 1.000 | -2.221 | 477 | 1.000 | 1.550 |
| 478 | 1.000 | 1.000 | 478 | 1.000 | - |
| 479 | 1.000 | 1.000 | 479 | 1.000 | - |
| 480 | 1.000 | - | 480 | 1.000 | 1.000 |
| 481 | 1.000 | - | 481 | 1.000 | - |
| 482 | 1.000 | - | 482 | 1.000 | - |
| 483 | 1.000 | 1.000 | 483 | 1.000 | - |
| 484 | 1.000 | 1.000 | 484 | 1.000 | - |
| 485 | 1.000 | 1.000 | 485 | 1.000 | - |
| 486 | 1.000 | 1.000 | 486 | 1.000 | - |
| 487 | 1.000 | - | 487 | 1.000 | - |
| 488 | 1.000 | 1.000 | 488 | 1.000 | - |
| 489 | 1.000 | 1.000 | 489 | 1.000 | - |
| 490 | 1.000 | 1.753 | 490 | 1.000 | -4.049 |
| 491 | 1.000 | 1.361 | 491 | 1.000 | -1.564 |
| 492 | 1.000 | 1.000 | 492 | 1.000 | - |
| 493 | 1.000 | 1.416 | 493 | 1.000 | -1.713 |
| 494 | 1.000 | - | 494 | 1.000 | - |
| 495 | 1.000 | 1.914 | 495 | 1.000 | -11.663 |
| 496 | 1.000 | 1.000 | 496 | 1.000 | - |
| 497 | 1.000 | - | 497 | 1.000 | 1.000 |
| 498 | 1.000 | - | 498 | 1.000 | - |
| 499 | 1.000 | - | 499 | 1.000 | - |
| 500 | 1.000 | -2.056 | 500 | 1.000 | 1.514 |
| 501 | 1.000 | - | 501 | 1.000 | - |
| 502 | 1.000 | 1.000 | 502 | 1.000 | - |
| 503 | 1.000 | 1.000 | 503 | 1.000 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 504 | 1.000 | 2.517 | 504 | 1.000 | - | | | 504 | 1.000 | - | 504 | 1.000 | - | |
| 505 | 1.000 | -2.953 | 505 | 1.000 | - | | | 505 | 1.000 | - | 505 | 1.000 | - | |
| 506 | 1.000 | - | 506 | 1.000 | - | | | 506 | 1.000 | - | 506 | 1.000 | - | |
| 507 | 1.000 | -5.818 | 507 | 1.000 | - | | | 507 | 1.000 | 1.000 | 507 | 1.000 | - | |
| 508 | 1.000 | 3.452 | 508 | 1.000 | 1.359 | | | 508 | 1.000 | - | 508 | 1.000 | - | |
| 509 | 1.000 | 3.069 | 509 | 1.000 | 2.176 | | | 509 | 1.000 | - | 509 | 1.000 | - | |
| 510 | 1.000 | - | 510 | 1.000 | 1.543 | | | 510 | 1.000 | 1.000 | 510 | 1.000 | - | |
| 511 | 1.000 | - | 511 | 1.000 | - | | | 511 | 1.000 | - | 511 | 1.000 | 1.000 | |

## APÊNDICE C

Artigo científico submetido para apreciação pelo corpo editorial da revista:

***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***

**Analysis of various 2DE parameters to improve the solubility, isoelectric focusing, SDS-PAGE and gel storage of human lymph node tissue proteins**

A. B. Trovó[1,a], A. Vidotto[1,a], G. M. Polachini[1,a], C. M. Bellato[2], H. Cabral[3], A M. Leopoldino[4], J. F. Góis Fo[5], E. E. Fukuyama[5], F. A. P. Settani[5], P. M. Cury[4], M. S. Palma[6] and E. H.Tajara[4]

[1]Universidade Estadual Paulista/UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/IBILCE, Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brazil

[2]Universidade de São Paulo/USP, Centro de Energia Nuclear para Agricultura/CENA, Piracicaba, SP, Brazil

[3]Universidade Estadual Paulista/UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/IBILCE, Departamento de Física, São José do Rio Preto, SP, Brazil

[4]Faculdade de Medicina/FAMERP, Departamento de Biologia Molecular, São José do Rio Preto, SP, Brazil

[5]Hospital do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, SP, Brazil

[6]Universidade Estadual Paulista/UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro, Centro de Estudos em Insetos Sociais/Departamento de Biologia, Rio Claro, SP, Brazil

[a] The authors contributed equally to this work.

**Financial Support:** FAPESP (01/14473-0), CNPq and CAPES

**Send correspondence to:** Eloiza Helena Tajara, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina/FAMERP, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, Cep: 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Tel +55 17 210 5700 (extension 5899), Fax +55 17 234 6407. E-mail: tajara@famerp.br.

**Short running title:** Optimization protocols of protein extraction and 2-DE

**Key words:** protein solubilization, two-dimensional gel electrophoresis, lymph node, optimization

**Abstract**

The solubilization of protein before two-dimensional gel electrophoresis is a very critical point for proteomic analysis. In the present study, we compared the efficiency of six different solubilization protocols in respect to chaotropic compounds, detergents, and reducing agents. Best results were obtained with a lysis solution containing 7M urea, 2M thiourea, 4% Chaps, 65 mM DTT and 0.2% carrier ampholytes. In addition, we analyzed different isoelectric focusing (IEF), sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel storage conditions. The best protocol for IEF was accumulated voltage of 16.500 Vh and a double concentration of DTT in the rehydration solution. In the experiments conducted for the SDS-PAGE, best results were obtained with a doubled concentration of SDS electrophoresis buffer. Among the five protocols tested for storing gels, sucess was attained when the gels were placed in plastic bags with glycerol solution.

## Introduction

Recently, considerable interest in proteomics has arisen with an increasing number of journals and articles being dedicated to this subject. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is one of the most important technique of proteomic analysis and has been used for approximately 30 years. With this technique, proteins are efficiently separated by isoelectric focusing (IEF), based on their respective isoeletric point/p*I*, and by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), based on their molecular mass/$M_r$ (1).

The analytical potential of 2-DE is dependent on good sample preparation. The aim of sample preparation is to convert the native sample into a suitable physicochemical state for first- dimension IEF, while preserving the native charge and $M_r$ of the constituent proteins. In many cases, this means that the proteins of the sample need to be solubilized, disaggregated, denatured and reduced (2). For this purpose, mixtures of chaotropic compounds, detergents or surfactants, reducing agents and carrier ampholytes are employed (3,4).

The role of chaotropes, such as urea and thiourea, is to disrupt hydrogen bonding, leading to protein unfolding and denaturation. Surfactants such as CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamino]-1-propane sulfonate), SB3-10 (N-decyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate), ASB-14 (amidosulfobetaine-14), Triton X-100, SDS (sodium dodecyl sulfate) and NP-40 (Nonidet P-40) act synergistically with chaotropes. Reducing agents, such as dithiothreithol/DTT, dithioerythritol/DTE, tributyl phosphine/TBP and 2-mercaptoethanol, are used to break intramolecular and intermolecular disulfide bonds. Carrier ampholytes enhance protein solubility by minimizing protein aggregation due to charge-charge interactions (2,3,5,6).

Due to variable protein expression from one tissue to another, conditions of protein solubilization that are optimal for one particular tissue type may not hold for the others. In

addition, several other 2-DE steps must be optimized for a particular sample in order to obtain good results. The goal of the present study was to test different protocols of solubilization, isoelectric focusing and SDS-PAGE conditions, and gel storage for proteomic analysis. The following parameters were investigated in solubilizing solutions, either alone or in combination: (a) alteration of the chaotrope concentration; (b) alteration of the detergent mix used, and (c) alteration of the reducing agents. In respect to IEF conditions, we tested different accumulated voltages and concentrations of the reducing agent in the rehydration solution. Variable conditions for second-dimension electrophoresis and gel storage solutions were also analyzed.

## Materials and Methods

### Materials

Normal lymph nodes were collected from patients diagnosed with head and neck squamous cell carcinoma at the Cancer Hospital "Arnaldo Vieira de Carvalho", in São Paulo, Brazil. Tissue samples were obtained just after the removal of the surgical specimen, snap-frozen and stored in liquid nitrogen. Before protein extraction, the pathological diagnosis was re-confirmed by a pathologist at the São José do Rio Preto School of Medicine, São Paulo. Patients gave informed consent prior to inclusion in the study.

## Methods

### *Sample preparation*

A sample of lymph node was cut into six pieces of about 5 $mm^3$ each and placed into different tubes. Then, 500 µl of one out of six different lysis buffers (Table 1) were added to each tube. The specimens were disrupted by sonication (Microsonic SX-10) 12 times at intervals of 10s at 10°C and vortexed vigorously for approximately 2 min. The lysates were centrifuged at 10000 rpm for 3 min at 4°C. The supernatants were transferred into other tubes, and the insoluble pellets were washed with 200 µL lysis buffers. The second supernatants were again transferred into new tubes. The protein concentration of the resulting supernatants was determined by the Bradford method (7). The protein samples were stored in aliquots at –80°C.

NOTE: APPROXIMATE LOCATION OF TABLE 1

### *Chemicals and apparatus*

All chemicals used were of highest quality (Merck, Calbiochem, Amersham Biosciences – GE Healthcare, Sigma, Bio-Rad). Isoelectric focusing (IEF) was performed using IPGphor apparatus, with strips with immobilized pH gradients (IPG), pH 3-10 linear (L) and strip holders (Amersham Biosciences - GE Healthcare). SDS-PAGE was performed with vertically laboratory-made gels using the SE 600 Ruby and the EPS 600 power supply (Amersham Biosciences – GE Healthcare). Stained 2-DE gels were scanned with an ImageScanner (Amersham Biosciences – GE Healthcare).

### *First-dimension electrophoresis – IEF*

For IEF, 500 µg proteins were diluted with the rehydration solution (8 M urea, 2% w/v CHAPS, 0.3% w/v DTT, 0.5% v/v IPG buffer, bromophenol blue trace) to a total volume

of 250 µl. IPG strips (pH 3-10 L, 13 cm) were rehydrated in this protein solution for 12 h under mineral oil. IEF was performed at 20°C with the following parameters: 500Vh (1 h), 1000Vh (1 h), 8000 Vh (2 h or 3:30 h or 5 h), 500 Vh (0 h or 1 h), until 16500Vh, 26500Vh or 41500Vh were attained. The current was limited to 50µA/strip. After IEF, the IPG strip was stored (-70°C) until further processing by second-dimension SDS-PAGE.

*Second-dimension electrophoresis – SDS-PAGE*

The individual strips were consecutively incubated, at room temperature, in the equilibrium solution A (2% w/v SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% w/v glycerol, bromophenol blue trace and 1% w/v DTT) followed by solution B (2% w/v SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% w/v glycerol, bromophenol blue trace and 2.5% w/v iodoacetamide), for 15 min each. When the proteins were solubilized using solutions containing TBP, the strips were incubated in solution C (2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, bromophenol blue trace and 5 mM TBP) for 30 min. The strips were then washed in SDS electrophoresis buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS), placed on top of the second-dimension vertical gels (16 x 18 x 0.015 cm) 12.5% polyacrylamide and sealed in place with sealing solution (0.5% agarose in SDS electrophoresis buffer). The electrophoresis conditions were 15 mA/gel for 30 min, followed by 30 mA/gel for 4-5 h at room temperature.

*Coomassie Blue staining*

Proteins were detected by Coomassie Blue staining, according to a modified protocol (8). Briefly, gels were fixed overnight in a solution of 50% ethanol, 10% acetic acid, followed by a destain solution (50% ethanol, 5% acetic acid) for 3 min, and incubated for 90 min with 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250 solution (0.125g Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% ethanol, 10% acetic acid). Subsequently, the gels were washed four times with destain solution,

for 15 min, 45 min, 120 min and 120 min, respectively, and incubated in preserving solution (5% acetic acid) for approximately 72 h.

*Preserving the gels*

Five protocols for storing gels were tested:

- Protocol 1. The gel was washed twice in solution A (30% ethanol) for 30 min followed by a solution B (30% ethanol, 3.5% glycerol) for 60 min. Then the gel was placed between two cellophane sheets previously embedded in solution B.
- Protocol 2. The gel was incubated in 4.3% glycerol for 5 min and placed between two cellophane sheets previously embedded in water.
- Protocol 3. The gel was washed four times in water for a total of 4 h and placed between two cellophane sheets previously embedded in 8.7% glycerol.
- Protocol 4. The gel was incubated in 8.7% glycerol for 60 min. Then the gel was placed between two cellophane sheets previously embedded in the same solution and dried using an embroidering hoop (9).
- Protocol 5. The gel was incubated in 10% methanol for 48 h. Afterwards, it was placed in a clear plastic bag with 2mL of 50% glycerol solution applied over both surfaces of the gel. The bag was then heat-sealed.

**Results and Discussion**

One of the challenges for extensive proteomic analysis using 2-DE is the visualization of a maximum of proteins spots, which has prompted intensive research on new compounds able to increase protein solubilization. The standard buffer for protein

solubilization contains 8M urea, 4% CHAPS, 50-100 mM DTT and 40 mM Tris, but for many protein mixtures this is not always efficient (5).

In the present study, we tested six buffers for protein solubilization, which differed in one or more components, including chaotropes, detergents and reducing agents. In addition, we analyzed different isoelectric focusing (IEF), sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel storage conditions. The experiments were performed using a normal lymph node sample, which has a very homogeneous composition, since the admixture of different tissues in the same sample may compromise 2-DE gel quality and significance (Figure 1). The results were validated in 30 lymph node samples.

NOTE: APPROXIMATE LOCATION OF FIGURE 1

In the buffers tested, urea varied from 5 to 8 M, CHAPS from 2 to 4%, SB3-10 from 1 to 2%, and ASB-14 from 0.5 to 1%. The carrier ampholytes were used in low concentration (0.2%) in order to avoid extended running times, because they contribute to the initial conductivity of the sample solution (4). Tris base was added to three buffers (1, 2 and 3). This compound is used when basic conditions are required for full solubilization or to minimize proteolysis (10). However, addition of ionic compounds in buffers for protein solubilization can result in first-dimension disturbances. For this reason, salts must be removed after the solubilization step or maintained at as low a concentration as possible (lower than 10 mM) in the rehydration solution (2,6). In our experiments, Tris base was added to the buffers at 40 mM, but the final salt concentration during rehydration was maintained at approximately 10 mM. In all buffers tested, thiourea was at 2M, DTT at 1% (65 mM), and TBP at 2 mM. Thiourea was introduced by Rabilloud et al. (11), in combination with urea, to increase the solubility of proteins, mainly of membrane proteins. According to these authors, the use of this component inhibits the adsorption of protein to the

gel matrix, when IEF is conducted in immobilized pH gradients (IPGs). Thiourea also inhibits proteolysis, contributing to the detection of a higher number of species in 2-DE gels (12). This efficient chaotrope is poorly soluble in water and requires high concentrations of urea for solubility (optimal condition is 2 M thiourea in 5-7 M urea). In our study, the urea-thiourea mixture showed excellent results, greatly improving the solubility of proteins as compared to urea alone, as already stated for the separation of proteins by Rabilloud et al. (11), Pasquali et al. (13), Musante et al. (14), Rabilloud (15), Giavalisco et al. (16), Méchin et al. (17) and Taylor & Pfeiffer (18).

According to Carboni et al. (19), no apparent differences could be detected in spot molecular mass and intensities in images from samples with or without protease inhibitors. Moreover, Castellanos-Serra & Paz-Lago (12) reported that proteolysis was highly inhibited in samples containing 2M thiourea. Proteolysis can also be inhibited by preparing the sample at as low temperature, in the presence of Tris base and in strong denaturants such as 8M urea (6,10). In the present study, the solubilization of proteins was performed in the absence of protease inhibitors, but using 2M thiourea, and the sample preparation was conducted at 4 to 10°C.

We also examined three zwitterionic detergents (CHAPS, SB 3-10, ASB-14). The sulfobetaine CHAPS is the most commonly used detergent for 2-DE, at between 2% and 4% in high concentrations of urea (5,20). Sulfobetaines with long linear tails (i.e., SB 3-10, ASB-14) have been shown to possess a greater ability to solubilize membrane proteins. SB 3-10 has poor solubility in high concentrations of urea (5,21). In contrast, ASB-14 is compatible with 9 M urea, but results in large horizontal streaking towards the basic end of the strip. Stanley et al. (22) have shown that this streaking appears to be an interaction between ASB-14 and the cathode rather than purely an issue with basic proteins, as the effect was independent of the pH range of the IPG strip (pH 3-10 or pH 4-7). Our gels also showed

increased streaking in all the pH range when ASB-14 was used in the extraction solution (Figure 1e, 1f). Studies conducted by Carboni et al. (19) using three different detergents (Chaps, ASB-14 or NP-40) in the solubilizing solution, also showed that the use of ASB-14 as compared to CHAPS, resulted in more streaking in the second dimension.

The ionic detergent SDS is a very effective protein solubilizer. However, due to its charged nature, it is incompatible with IEF and can, therefore, only be used during tissue homogenization with an uncharged/zwitterionic detergent or in low concentrations, such as 0.25% or less (23,24). Since the aim of the present study was to achieve high resolution with well-defined protein spots in 2-DE and because of the inconvenience of using SDS in IEF, buffers with SDS were not selected for our optimization experiments.

In respect to reducing agents, TBP and the free thiol-containing agents DTT, DTE and 2-mercaptoethanol are commonly used in extraction solutions. TBP has been used at a concentration of 2 mM (25), while DTT and DTE are used in the concentration range of 20-100 mM with an optimal concentration at about 65 mM. For the less potent 2-mercaptoethanol, higher concentrations are required (6). However, inherent impurities of the latter compound may cause artifacts in 2-DE gels (26).

When the proteins are solubilized using reagents containing free thiol, IPG equilibration requires two steps: reduction (by DTT) and alkylation (by iodoacetamide). DTT has been the standard reducing agent for 2-DE for many years (3,27) and is effective for reducing protein disulfide bonds prior to SDS-PAGE, while iodoacetamide eliminates artifacts of disulfide formation during electrophoresis for less streaking and better resolution. However, DTT is charged, especially at alkaline pH, and thus migrates out of the pH gradient during IEF, which results in loss of solubility for some proteins (25,28). In contrast, TBP lacks a free thiol group, making the second equilibration of the IPG strips unnecessary. In addition, TBP is neutral and does not migrate during IEF, thus, the reducing conditions are

maintained for the entire focusing process. On the other hand, TBP has a low solubility, is unstable, volatile and toxic (6,10,25,28). In the present study, we detected significant improvements in the resolution of proteins by 2-DE using DTT as a reducing agent (Figure 1b, 1c). Taylor & Pfeiffer (18) reported similar results for myelin proteins.

In the present study, we compared the solubilization properties of six sample buffers. The more effective buffers (1 and 4) have similar compositions in respect to detergents, reducing agents, and carrier ampholytes. Differences include the presence of Tris base in buffer 1 and of thiourea in buffer 4. It has been comprehensively reported in the literature that the addition of thiourea significantly increases both the total protein yield and the number of detected proteins (12,16). Although the 8M urea pattern resulted in many well-focused proteins (Figure 1a), more proteins were observed after using the 7M urea/2M thiourea (Figure 1d). Extraction solution 4 was tested for other tissue samples, such as neurofibroma and normal and neoplastic mucosa of patients with head and neck squamous cell carcinoma and proved to be very efficient in all cases (data not shown).

Different protocol settings for isoelectric focusing, and conditions for SDS-PAGE and gel storage were also tested in this study. The focusing settings are known to be critical for protein separation. In particular, total voltage and slow sample entry have a pronounced effect on the spot pattern quality (27). Each sample requires different IEF conditions, and this is mirrored by the multitude of conditions published elsewhere (29). In the present study, 13 cm pH 3-10L strips were subjected to a total of 16500 to 41500 Vh. The more remarkable results were the decreasing in horizontal streaking and the well-rounded spots in 16500 Vh focused gels and by using double concentration of DTT in the rehydration solution according to Hoving et al. (30). The experiments conducted for the SDS-PAGE step tested the SDS electrophoresis buffer at a doubled concentration (2X buffer) in the cathodic reservoir (31).

This condition resulted in decreasing protein smearing in the gel, which is usually caused by buffer depletion during electrophoresis.

Preservation of gels for a long time after electrophoresis is frequently desirable, mainly if their transport to another laboratory is necessary. Five protocols for storing gels were tested and success was attained when the gels were placed in plastic bags with glycerol solution (Protocol 5). Under such condition, the gels were submitted to spot excision from 1 to 10 weeks after SDS-PAGE. The remaining protocols resulted in brittle gels.

## Conclusion

Progress in sample preparation methodology for 2-DE has focused on improvements in sample buffer constituents to achieve better representation of soluble proteins. Many data on the results have been published. However, it must be taken into account that a variety of factors influences the sample preparation steps, some of which have been highlighted in this manuscript. It is clear that for a good protein representation, a variety of sample buffers may need to be tested in a trial-and-error manner. In addition, several other 2-DE steps must be optimized for a particular sample in order to obtain good results.

**Acknowledgments**

We thank Professor Carlos Roberto Ceron, Keity Souza Santos, Lucilene Delazari dos Santos and Ana Maria Galvan Custódio for useful suggestions and Professor Gustavo O. Bonilla Rodriguez for access to the Laboratório de Bioquímica de Proteínas (IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP). We also thank Professor Nicole Grosso for critically reading the English manuscript.

**References**


1. O'Farrel PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 250: 4007-4021.
2. Shaw MM & Riederer BM (2003). Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 3: 1408-1417.
3. Molloy MP (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, 280: 1-10.
4. Garfin DE (2003). Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *Trends in Analytical Chemistry,* 22 (5): 263-272.
5. Herbert B (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 20: 660-663.
6. Berkelman T & Stenstedt T (2002). 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods. Amersham Biosciences, Uppsala. Sweden. 100p.
7. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
8. Neuhoff V, Stamm R, Eibl H (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, 6: 427-448.
9. Ceron CR, Santos JR, de Campos-Bicudo HEM (1992). The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Revista Brasileira Genética*, 15 (1): 201-203.
10. Rabilloud T (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 17: 813-829.

11. Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis,* 18: 307-16.
12. Castellanos-Serra L & Paz-Lago D (2002). Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: Evaluation of its efficiency in challenge experiments. *Electrophoresis*, 23: 1745-1753.
13. Pasquali C, Fialka I, Huber LA (1997). Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*, 18(14): 2573-2581.
14. Musante L, Candiano G, Ghiggeri GM (1998). Resolution of fibronectin and other uncharacterized proteins by two-dimensional polyacrilamide electrophoresis with thiourea. *Journal of chromatography,* 705: 351-356.
15. Rabilloud (1998). Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(5): 758-760.
16. Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, Gobom J, Klose J (2003). Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis*, 24: 207-216.
17. Méchin V, Consoli L, Guilloux ML, Damerval C (2003). An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics*, 3: 1299-1302.
18. Taylor CM & Pfeiffer SE (2003). Enhanced resolution of glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane proteins from the lipid-rich myelin membrane by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 3: 1303-1312.
19. Carboni L, Piubelli C, Righetti PG, Jansson B, Domenici E (2002). Proteomic analysis of rat brain tissue: Comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents. *Electrophoresis*, 23: 4132-4141.

20. Gorg A & Weiss W (1999). Analytical IPG-Dalt. *Methods in molecular biology*, 112: 189-95.

21. Di Ciero L, Bellato CM, Meinhardt LW, Ferrari F, Castellari RR, Marangoni S, Novello JC (2004). Assessment of four different detergents used to extract membrane proteins from *Xylella fastidiosa* by two-dimensional electrophoresis. *Brazilian Journal of Microbiology* (in press).

22. Stanley BA, Neverova I, Brown HA, Eyk JEV (2003). Optimizing protein solubility for two-dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium. *Proteomics,* 3: 815-820.

23. Ames GFL & Nikaido K (1976). Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry*, 15: 616-623.

24. Harder A, Wildgruber R, Nawrocki A, Fey SJ, Larsen PM, Gorg A (1999). Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 20(4-5): 826-9.

25. Herbert BR, Molloy MP, Gooley AA, Walsh BJ, Bryson WG, Williams KL (1998). Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*, 19: 845-851.

26. Marshall T & Williams KM (1984). Artifacts associated with 2-mecaptoethanol upon high resolution two-dimensional electrophoresis. *Analytical Biochemistry,* 139: 502-505.

27. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21: 1037-1053.

28. Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, Tyler MI, Traini M, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Williams KL, Gooley AA (1998). Extraction of membrane proteins by differential

solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 19: 837-844.

29. Endler AT, Young DS, Tracy RP (1987). Methodology for high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Cancer investigation*, 5(2):127-49.
30. Hoving S, Gerrits B, Voshol H, Müller D, Roberts RC, van Oostrum J (2002). Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics*, 2(2):127-34.
31. Werner WE (2003). Run parameters affecting protein patterns from second dimension electrophoresis gels. *Analytical Biochemistry*, 317: 280-283.
32. Expasy home page (2003). Sample preparation (analytical gels). http://us.expasy.org/ch2d/protocols/protocols.fm1.html
33. Tachibana M, Ohkura Y, Kobayashi Y, Sakamoto H, Tanaka Y, Watanabe J, Amikura K, Nishimura Y, Akagi K (2003). Expression of apolipoprotein A1 in colonic adenocarcinoma. *Anticancer Research*, 23: 4161-4168.

**Table 1**. Composition of six lysis buffers tested for protein solubilization efficiency.

| | **Buffer 1** | **Buffer 2** | **Buffer 3** | **Buffer 4** | **Buffer 5** | **Buffer 6** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Chaotropes** | 8 M Urea | 5M Urea<br>2M Thiourea | 5M Urea<br>2M Thiourea | 7M Urea<br>2M Thiourea | 5M Urea<br>2M Thiourea | 7M Urea<br>2M Thiourea |
| **Detergents** | 4%CHAPS | 2% CHAPS<br>2% SB 3-10 | 2% CHAPS<br>2% SB 3-10 | 4% CHAPS | 2% CHAPS<br>1% SB 3-10<br>1% ASB -14 | 2% CHAPS<br>0,5% ASB -14 |
| **Salts** | 40 mM Tris base | 40 mM Tris base | 40 mM Tris base | | | |
| **Reducing agents** | 65 mM DTT | 65 mM DTT | 2 mM TBP | 65 mM DTT | 2 mM TBP | 65 mM DTT |
| **Carrier ampholytes** | 0.2%<br>(pH 3-10) | 0.2%<br>(pH 3-10) | 0.2%<br>(pH 3-10) | 0.2%<br>(pH 3-10) | 0.2%<br>(pH 3-10) | 0.2%<br>(pH 3-10) |
| **References** | 5,28,32 | 11,32 | 11,28,33 | 3,6,11,27 | 4 | 12 |

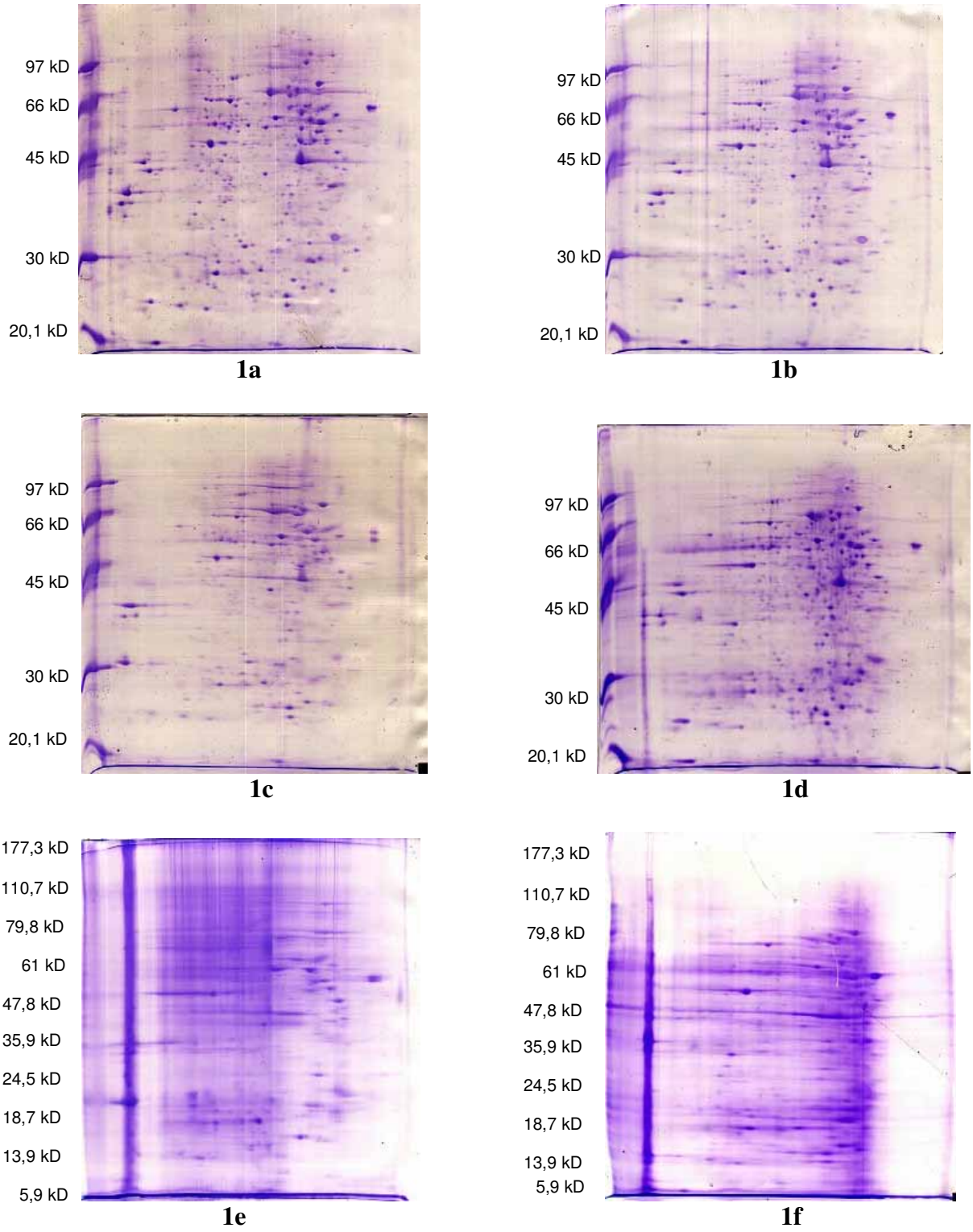



**Figure 1 -** Comparison of solubilization conditions. Lysis and solubilization of human lymph node tissue proteins were performed using six different buffers (1-6). Proteins were separated on a 13 cm pH 3-10 IPG, 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.