

**ELIZIANE NITZ DE CARVALHO CALVI**

**FIBRAS DE COLÁGENO NO MÚSCULO RETO  
DO ABDOME EM CADÁVERES DE  
DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: AVALIAÇÃO  
QUANTITATIVA E QUALITATIVA**

**Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências**

**SÃO PAULO**

**2013**

**ELIZIANE NITZ DE CARVALHO CALVI**

**FIBRAS DE COLÁGENO NO MÚSCULO RETO  
DO ABDOME EM CADÁVERES DE  
DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: AVALIAÇÃO  
QUANTITATIVA E QUALITATIVA**

**Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. FÁBIO XERFAN NAHAS**

**COORIENTADORES: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SILVIA SAIULI MIKI IHARA**

**Prof. MARCUS VINÍCIUS JARDINI**

**BARBOSA**

**SÃO PAULO**

**2013**

Calvi, Eliziane Nitz de Carvalho

**Fibras de colágeno no músculo reto do abdome em cadáveres de diferentes faixas etárias:** avaliação quantitativa e qualitativa / Eliziane Nitz de Carvalho Calvi. – São Paulo, 2013.

xix, 182p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Collagen fibers in the rectus abdominis muscle of cadavers of different age groups: quantitative and qualitative assessment.

1. Colágeno. 2. Reto do Abdome. 3. Cadáver.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA TRANSACIONAL**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

*À minha amada mãe, Maria Helena,  
pelo exemplo de humanidade, respeito, dedicação  
e de mulher. Se todas as pessoas desse mundo  
fossem iguais a você,  
o mundo seria muito melhor.*

*Ao meu grande amor, Rodrigo,  
meu marido, pelo carinho, apoio e incentivo à  
realização de todos os meus sonhos ao longo da  
minha vida profissional e pessoal.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **PROFESSOR DOUTOR FÁBIO XERFAN NAHAS**, Professor Livre-Docente Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica e Professor Orientador de Mestrado e Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), orientador deste estudo, por ser um exemplo de professor e pesquisador, pelo seu talento, coerência, competência; pelas suas inúmeras sugestões, dedicação, atenção e, principalmente, pelo amigo que foi durante todo este período e acredito uma pessoa com quem posso contar para sempre.

À **PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), pela oportunidade e confiança, pelo estímulo a minha formação científica e profissional, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Ao **PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SABINO NETO**, Professor Adjunto Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), pela atenção, estímulo constante e orientação em todos os estudos realizados neste programa.

À **PROFESSORA DOUTORA SILVIA SAIULI MIKI IHARA**, docente do Departamento de Patologia (UNIFESP/EPM), por aceitar ser coorientadora desse estudo, por transmitir seus conhecimentos com muita

clareza, lógica, tranquilidade, carinho e amizade, por passar dias comigo e um microscópio. Se hoje sei alguma coisa de histologia, foi devido à senhora.

Ao **PROFESSOR DOUTOR MARCUS VINÍCIUS JARDINI BARBOSA**, professor colaborador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional (UNIFESP/EPM), coorientador deste estudo, pelo seu incentivo, sugestões e precisão. Admiro muito seu profissionalismo.

Ao **RODRIGO TERZI CALVI**, meu marido, ao qual, não apenas dedico essa obra como também sou eternamente grata pelo auxílio em todas as etapas desse trabalho. Divido com você essa conquista.

Ao **DOUTOR JOSÉ AUGUSTO CALIL**, pela oportunidade e aprendizado com os cadáveres.

À **PROFESSORA YARA JULIANO** e **PROFESSOR NEIL FERREIRA NOVO**, pelo acompanhamento estatístico desde a idéia deste trabalho até as publicações.

À **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE** e **SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica (UNIFESP/EPM), pela gentileza no atendimento, presteza nas comunicações importantes e pelo carinho que sempre dispensaram a mim.

Aos **DOCENTES** da Pós-Graduação em Cirurgia Translacional (UNIFESP/EPM), pelas inúmeras sugestões e amparo nas horas mais difíceis.

Ao **PROFESSOR DOUTOR MARCELLO FABIANO DE FRANCO**, Professor Afiliado/Aposentado do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), por me mostrar caminhos, tirar dúvidas, apresentar pessoas e ser exemplo de docente e pesquisador.

À **PROFESSORA DOUTORA CELINA TIZUKO FUJIYAMA OSHIMA**, docente do Departamento de Patologia (UNIFESP/EPM), por transmitir seus conhecimentos de Imuno-histoquímica.

Ao **MESTRE MARCELO DE SOUZA SILVA**, Departamento de Patologia (UNIFESP/EPM), pelo auxílio na elaboração da Imuno-histoquímica, por todas as vezes que fiquei ligando, enviando e-mail e cobrando por algo que era feito para ajudar.

Ao **ANTONIO CARLOS DE SOUSA**, técnico do laboratório do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), por acompanhar esse trabalho desde as ideias mais estapafúrdias até a concretização da obra.

Ao **PROFESSOR DOUTOR MANUEL DE JESUS SIMÕES**, Professor Associado da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural (UNIFESP/EPM), pela disponibilidade e aprendizado.

À **DOUTORA REGINA CÉLIA TEIXEIRA GOMES**, Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética e Departamento de Ginecologia (UNIFESP/EPM), pela disponibilidade e ensinamentos sobre colágeno e histologia.



Aos meus colegas da Pós-Graduação em Cirurgia Translacional (UNIFESP/EPM), em especial **MARIA JOSÉ BRITTO, GABRIELA P. R. PRADO, PAMELLA VERÍSSIMO, DIONE B. VILA-NOVA DA SILVA, MARIA AMÉLIA RODRIGUES, MILENA BASSALOBRE SCHLOSSER, MILLA POMPÍLIO DA SILVA, ANA CAROLINA BIM TEDESCO, MÔNICA SARTO PICCOLO, JOSÉ OCTÁVIO G. DE FREITAS, GUILHERME A. F. LAPIN E ÉRICA C. R. DA SILVA**, por compartilharem das horas boas e difíceis.

À **FERNANDA ABIBI SOARES, VIVIANE COELHO, MÁRIO FARINAZZO E THIAGO MARQUES**, residentes na época, pela disponibilidade e profissionalismo.

Aos meus chefes e amigos, coordenadores do Curso de Fisioterapia da UNINOVE, **ANA LÚCIA COLABONE, FERNANDA VARKALA, MARCELO FRIGERO e TABAJARA CONZALEZ**, por toda a compreensão nessa fase e incentivo pelo meu crescimento profissional e pessoal. Vocês são exemplos de união e sucesso.

Aos meus colegas de trabalho, **RITA MACHADO, CARLY DE FARIA COELHO, ANDRÉIA LEAL, RODRIGO ALCORINTE HUBINGER, MARIA LOFFREDO, ADRIANO RODRIGUES, ANDRÉ SERRA BLEY e IVAN BACHA**, pelo apoio e incentivo nas horas mais desgastantes.

Aos **MEUS ALUNOS**, por mostrarem a importância do aprimoramento constante na docência e na pesquisa.

**À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)**, pelo fomento à pesquisa, o que facilitou a obtenção do material da pesquisa e pelo grande aprendizado em relação a relatórios científicos.

**À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)**, pelo auxílio na bolsa de estudo, o que possibilitou que eu tivesse mais tempo disponível para a pesquisa.

*Oração ao Cadáver Desconhecido*

*"Ao curvar-te com a lâmina rija de teu bisturi sobre o cadáver desconhecido, lembra-te que este corpo nasceu do amor de duas almas; cresceu embalado pela fé e esperança daquela que em seu seio o agasalhou, sorriu e sonhou os mesmos sonhos das crianças e dos jovens; por certo amou e foi amado e sentiu saudades dos outros que partiram, acalentou um amanhã feliz e agora jaz na fria lousa, sem que por ele tivesse derramado uma lágrima sequer, sem que tivesse uma só prece. Seu nome só Deus o sabe; mas o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir a humanidade que por ele passou indiferente."*

*Karl Rokitansky (1876)*

*Ao cadáver, respeito e agradecimento.*

*"A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original."  
(Albert Einstein, 1879-1955)*

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>8</b>
<b>3. LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>NORMAS ADOTADAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>171</b>
<b>FONTES CONSULTADAS .....</b>	<b>181</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Local de retirada dos fragmentos do músculo reto do abdome do cadáver. .... 21
- Figura 2. Fotomicrografia de músculo reto do abdome corados por HE (A), Tricrômico de *Masson* (B) e *Picro Sirius red* (C). Grupo 1. Identificação do colágeno 100x. .... 26
- Figura 3. Fotomicrografia do músculo reto abdominal corados por *Masson* (A-C) e *Picro Sirius red* (D-F). Áreas de interesse selecionadas no programa *Corel Photo Paint*<sup>®</sup> (B) ou submetidas à luz polarizada (E) e áreas demarcadas para quantificação no programa *ImageTool*<sup>®</sup> 3.0 (UTHSCA) (C, F). Grupo 1. 100x ..... 27
- Figura 4. Fotomicrografia do colágeno no músculo reto do abdome. Técnicas Histológicas. Hematoxilina-Eosina (A e B), *Tricômio de Masson* (C e D) e *Picro Sirius red* com luz polarizada (E e F) sendo na primeiro coluna o grupo 1 e na segunda coluna grupo 2. Aumento 100x. .... 169
- Figura 5. Fotomicrografia do colágeno no músculo reto do abdome. Técnica de Imuno-histoquímica. Colágeno I (A e B), colágeno II (C e D), colágeno III (E e F), colágeno IV ( G e H) e colágeno V (I e J), sendo na primeiro coluna o grupo 1 e na segunda coluna grupo 2. Aumento 100x. .... 170

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Método histológico para cada tipo de fibra corada.....	22
Quadro 2. Anticorpo primário para cada tipo de colágeno para o Método de Imuno-histoquímica.....	23
Quadro 3. Padrão para avaliação da qualificação dos diferentes tipos de colágeno estudados pelo método de Imuno-histoquímica ..	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação do colágeno tipo I do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. Tricrômio de <i>Masson</i> . .....	30
Tabela 2. Quantificação do colágeno tipo I do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. Tricrômio de <i>Masson</i> .....	31
Tabela 3. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2 corados por <i>Picro Sirius red</i> .....	31
Tabela 4. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. <i>Picro Sirius red</i> .....	32
Tabela 5. Avaliação qualitativa de colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome no Grupo 1 e Grupo 2. Imuno-histoquímica.....	33
Tabela 6. Quantificação do colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. Imuno-histoquímica.....	33
Tabela 7. Quantidade de colágeno tipo I do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 – <i>Masson</i> . Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação dos lados direito e esquerdo, supra e infraumbilical intragrupos. Teste de Wilcoxon .....	67



Tabela 8. Quantificação do colágeno tipo I do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2– <i>Masson</i> . Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação do grupo 1 com o grupo 2. Teste de Mann-Whitney .....	68
Tabela 9. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 corados por <i>Picro Sirius red</i> . Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação dos lados direito e esquerdo, supra e infraumbilical intragrupos. Teste de Wilcoxon .....	69
Tabela 10. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 – <i>Picro Sirius red</i> . Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação do grupo 1 com o grupo 2. Teste de Mann-Whitney.....	70
Tabela 11. Avaliação qualitativa de colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome nos Grupo 1 e Grupo 2 – Imuno-histoquímica.....	71
Tabela 12. Quantificação do colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 – Imuno-histoquímica. Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação do grupo 1 com o grupo 2. (n= 20). Teste de Mann-Whitney .....	72
Tabela 13. Lâminas Histológicas .....	73
Tabela 14. Porcentagem de colágeno pelo programa <i>ImageTool</i> .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### ACRÔNIMOS CIENTÍFICOS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>cm</b>	Centímetros
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros ao quadrado
<b>dpi</b>	Pontos por polegadas
<b>EPM</b>	Escola Paulista de Medicina
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> (e colaboradores)
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>LILACS</b>	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
<b>Ma</b>	Masson
<b>MEDLINE</b>	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
<b>ml</b>	Mililitros
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PICRO</b>	<i>Picro Sírius red</i>
<b>PUBMED</b>	Public Medicine
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>CAPES</b>	Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>UNINOVE</b>	Universidade Nove de Julho
<b>%</b>	Porcentagem
<b>*</b>	Presença de Significância Estatística
<b>®</b>	Marca registrada
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µm<sup>2</sup></b>	Micrômetro ao quadrado
<b>g</b>	Gramas
<b>°</b>	Grau
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b><i>p</i></b>	Índice de Significância Estatística
<b>x</b>	Vezes
<b>z</b>	Score

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os defeitos mais frequentes da parede abdominal são representados pelas hérnias. O colágeno é um componente importante dos músculos e fâscias que proporciona resistência e integridade estrutural nos tecidos. **OBJETIVO:** Avaliar a quantidade de colágeno do músculo reto abdominal em cadáveres de diferentes faixas etárias. **MÉTODOS:** Foram utilizados 40 cadáveres do gênero masculino, oriundos do Instituto Médico-Legal de Franca, divididos em dois grupos: Grupo 1 (n = 20) – 18 a 30 anos; Grupo 2 (n = 20)– 31 a 60 anos. Utilizou-se a cicatriz umbilical como referência e assim fez-se uma biópsia do músculo reto do abdome a uma distância de três centímetros superiormente e dois centímetros inferiormente. Foram realizados cortes histológicos corados por Tricômio de *Masson*, *Picro Sirius red* e Imuno-histoquímica. **RESULTADOS:** Pela coloração de Tricômio de *Masson* (colágeno I) não houve diferença significativa entre o grupos, já através da coloração de *Picro Sirius red* (colágeno I + III), verificou-se que a quantidade foi maior no Grupo 1 em relação ao Grupo 2 ( $p < 0,05$ ); pelo método Imuno-histoquímico não foi visualizada a presença do colágeno tipo II e não houve diferença significativa do colágeno tipo IV. O colágeno tipo I e III mostrou diminuição significativa no Grupo 2 em relação ao Grupo 1 ( $p < 0,05$ ); o colágeno tipo V foi identificado, porém não foi possível quantificar devido à coloração de fundo apresentada na reação. **CONCLUSÃO:** Há menor quantidade de colágeno tipo I e III no grupo com faixa etária mais elevada e não há alteração de quantidade de colágeno tipo IV.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A parede abdominal com seus componentes músculo-aponeuróticos atua na proteção, compressão e sustentação do conteúdo abdominal; sua integridade é fundamental na micção, defecação, trabalho de parto e expiração forçada, sendo ainda responsável pelos movimentos de flexão, rotação do tronco e estabilidade da coluna vertebral (NAHAS *et al.*, 2011).

Flacidez cutânea, acúmulo gorduroso e diástase dos retos do abdome podem causar efeitos físicos, sociais e psicológicos significantes (DE BRITO *et al.*, 2010).

Os defeitos mais frequentes da parede abdominal são representados pelas hérnias incisionais e inguinais (NAHAS *et al.*, 1998; CALVI *et al.*, 2011; HIDALGO *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2011).

A etiologia das hérnias da parede abdominal anterior (incisional, epigástrica e umbilical) pode incluir fatores mecânicos e fatores que podem alterar a quantidade de fibras colágenas e elásticas (DONAHUE, HIATT, BUSUTTIL, 2006; SCHUMPELICK, 2006; SZCZESNY *et al.*, 2006; FACHINELLI, TRINDADE, FACHINELLI, 2011).

Dos pacientes submetidos à laparotomia mediana, mais de 11% desenvolvem hérnias incisionais, surgindo geralmente nos primeiros cinco anos após a operação (SCHUMPELICK, 2006; SAHM *et al.*, 2009; SPERANZINI & DEUTSCH, 2010; CLAUS *et al.*, 2011; NAUFEL *et al.*, 2012), sendo de 10 a 50% a recorrência da hérnia (LIMA, 2002; CALALUCE *et al.*, 2013). Pacientes submetidos à correção aberta para aneurisma da aorta abdominal possuem incidência de 10 a 37% de desenvolverem hérnia incisional, sendo o motivo principal atribuído a um

provável defeito no colágeno tecidual (MENEZES & GUILLAUMON, 2012). Pacientes submetidos à reconstrução de mama com o retalho do músculo reto do abdome podem desenvolver uma fraqueza na área doadora com conseqüente abaulamento e hérnia. Esta complicação pode ocorrer em até 27% dos casos (KROLL *et al.*, 1995).

As hérnias incisionais correspondem à protrusão de vísceras por meio de orifícios ou áreas da parede abdominal, anormalmente enfraquecida por incisões cirúrgicas, e representa a falência da via de acesso empregada e síntese dos planos anatômicos parietais ou demonstra a existência de uma alteração local ou geral que compromete a cicatrização (OLIVEIRA *et al.*, 2003; LÁZARO DA SILVA, GUERRA, CASTRO, 2006).

Apesar da maioria dos casos de hérnias incisionais serem assintomáticas, cerca de 30% dessas hérnias estão associadas à dor, encarceramento e/ou estrangulamento. Além disso, as hérnias incisionais são as indicações mais frequentes de reoperação após uma laparotomia (DUBAY *et al.*, 2006; VAZ *et al.*, 2009).

As grandes hérnias incisionais podem ser acompanhadas de acentuada redução do tecido músculo-aponeurótico da parede abdominal, atrofia da musculatura do abdome com perda das suas funções anatômicas e fisiológicas, podendo determinar grave comprometimento respiratório e visceral. A baixa pressão intra-abdominal altera a função do diafragma promovendo o seu abaixamento e atonia progressiva e como conseqüência, problemas respiratórios devido ao sinergismo alterado da parede abdominal, pela incoordenação motora entre a parede torácica, o diafragma e a musculatura abdominal (SPERANZINI & DEUTSCH, 2010).

Nas últimas décadas, o conhecimento sobre a biologia molecular da matriz extracelular tem aumentado e, para propósitos didáticos, as macromoléculas isoladas de tecido conectivo de diferentes espécies animais, desde invertebrados a humanos, podem ser divididas em quatro grandes categorias: colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas, sendo as duas primeiras famílias formadoras do arcabouço fibroso, enquanto os proteoglicanos e glicoproteínas preenchem os espaços intersticiais (LABAT-ROBERT, BIHARI-VARGA, ROBERT, 1990).

A matriz extracelular está presente em todos os tecidos do corpo e as alterações genéticas que levam a repercussão em seus componentes podem afetar muitos tecidos. As fibras de colágeno são elementos estruturais importantes da matriz extracelular (DONAHUE, HIATT, BUSUTTIL, 2006; EL SHERIF *et al.*, 2006). O tecido muscular esquelético é composto por vários tipos de fibras de colágeno com diferentes características morfológicas, metabólicas e contráteis. A quantidade relativa e distribuição das fibras de colágeno nos diferentes músculos dependem da espécie, gênero, etnia, idade, grupo muscular e, sobretudo o próprio indivíduo. Eles também dependem do nível de atividade física, desuso, estado nutricional, denervação e estresse fisiológico crônico. Neste campo da pesquisa, os métodos morfológicos e histoquímicos de análise têm desempenhado um papel importante no estudo da anatomia muscular e fisiológica (DE BRITO *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2008; CASANOVA, TRINDADE, TRINDADE, 2009; ORPHEU *et al.*, 2010).

Sabe-se que o colágeno na musculatura estriada tem uma função estrutural de conexão de fibras musculares para assegurar que estas fibras estejam adequadamente alinhadas. A resistência à tração do colágeno se dá a partir da estrutura única das suas fibras, fibrilas e moléculas, mais



especificamente as ligações cruzadas, a orientação, a densidade e as forças de atrito entre as fibras, e das interações físicas e químicas com outros componentes estruturais da matriz extracelular (IMAMURA, IMAMURA, HIROSE-PASTOR, 1999).

A avaliação de fibras de colágeno e, particularmente os seus subtipos, tem sido essencial para o diagnóstico de diferentes doenças obtido por biópsias musculares (HECKMAN & JAMASBI, 1999).

O colágeno muscular desempenha uma variedade de funções mecânicas, imunológicas e de reparação tecidual. Exerce, ainda, um papel importante na transmissão da força produzida pela contração muscular ativa em músculos com diferentes funções (IMAMURA, IMAMURA, HIROSE-PASTOR, 1999). Trata-se de um importante componente de fâscias e músculos, conferindo resistência a estas estruturas (NAHAS, BARBOSA, FERREIRA, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2010; NAHAS *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2011). Até o momento, mais de 19 tipos de colágeno já foram descritos (GAO *et al.*, 2008), sendo os tipos I, II e III os mais estudados. No músculo estriado existe colágeno tipo I, III, IV e V e na fâscia apenas I e III (NAHAS, BARBOSA, FERREIRA, 2009; SILVA *et al.*, 2012).

O colágeno tipo I é o mais comum, representando 90% do total de colágeno dos mamíferos. É sintetizado pelos fibroblastos, odontoblastos e osteoblastos. É constituído de duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2, sendo usualmente organizado em fibras espessas, que conferem resistência à estrutura que contém, sendo encontrado em ligamentos, fâscias e tendões (NORTON, 1993; CALVI *et al.*, 2012).

O colágeno tipo III é constituído por três cadeias alfa-1 formando fibras menores e mais finas. É produzido pelos fibroblastos e pelas células

reticulares, sendo encontrado, em geral, junto com o tipo I, em proporções variáveis, prevalecendo em tecidos que requerem algum grau de elasticidade, como: pele, músculo, fâscias e ligamentos (NORTON, 1993; CALVI *et al.*, 2012).

O colágeno tipo I maduro é responsável pela força em tensão dos tecidos e o colágeno tipo III representa o colágeno imaturo, sintetizado durante a cicatrização da ferida precoce. A proporção destes dois tipos de colágenos é de grande importância na cirurgia; sendo que a diminuição no colágeno I e III tem mostrado estar associada a complicações de cicatrização de feridas graves, tais como recidiva da hérnia incisional (DONAHUE, HIATT, BUSUTTLIL, 2006; MINAMOTO, 2007).

O colágeno tipo IV é o componente estrutural mais abundante da membrana basal, fornecendo suporte mecânico à mesma, sendo formado por moléculas de colágeno que não se associam em fibrilas, mas prendem-se umas as outras pelas extremidades, formando uma rede semelhante a uma tela de arame. Ele se associa a várias moléculas não fibrosas da matriz extracelular e forma uma membrana contínua que separa certos tecidos. Em certas regiões desempenha o papel de filtro. Isto é bem evidente nos rins, onde filtra a urina a partir do sangue. É produzido pelas células epiteliais, musculares e pelas células dos capilares sanguíneos (NORTON, 1993; CALVI *et al.*, 2012).

O colágeno tipo V é responsável pela regulação do diâmetro das fibras de colágeno. Ele é, proporcionalmente, o menor componente em massa nos tecidos, mas desempenha papel fundamental nos processos de proliferação e reparação tecidual. A sua presença na membrana basal de vasos e em alguns tecidos mesenquimatosos é de extrema importância na ligação entre o colágeno IV da membrana basal e o conjuntivo frouxo em

órgãos, participando ativamente na interação dos componentes da matriz extracelular e estabelecendo associação com outros tipos de colágeno, como os tipos I e III (OLIVEIRA *et al.*, 2006; CALVI *et al.*, 2012).

Nota-se, portanto, que a família dos colágenos tem várias funções e que suas moléculas se dispõem de diferentes maneiras, de acordo com a função a ser desempenhada. Há fortes evidências de que estas moléculas foram modificadas durante a evolução dos seres multicelulares e se adaptaram gradualmente a várias funções que surgiram nesse processo (MINAMOTO, 2007).

FACHINELLI & MACIEL TRINDADE (2007) observaram que as quantidades de colágeno I e III eram menores em pacientes com hérnias da parede anterior do abdome quando comparados ao grupo controle de cadáveres sem hérnias.

Assim sendo, as variações da quantidade de colágeno ou de proporção de colágeno tipo I e III na fáscia podem estar relacionados à ocorrência de hérnias da parede abdominal. Todavia, não foram encontrados estudos que avaliam o colágeno no músculo reto do abdome de cadáveres em diferentes faixas etárias.

## **2. OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a quantidade de colágeno no músculo reto do abdome em diferentes faixas etárias em cadáveres.

### **3. LITERATURA**

### 3. LITERATURA

#### 3.1 Cadáveres

NAHAS & FERREIRA (2003) relataram o uso de cadáver como modelo experimental para a avaliação da tensão da parede abdominal após incisões aponeuróticas e descolamentos musculares em cadáveres frescos em dois níveis: três centímetros superior e dois centímetros inferiormente à cicatriz umbilical. As medidas de tração foram realizadas com o uso de um dinamômetro acoplado às alças realizadas com fio de sutura na aponeurose anterior e posterior dos retos, próximas à linha média, nos níveis supra e infraumbilicais. A tração utilizada para mobilizar os pontos aponeuróticos até a linha média e seu deslocamento resultante foi denominada coeficiente de tração. Estes índices foram comparados em três situações: anteriormente a qualquer descolamento; após a incisão da aponeurose anterior do reto e o descolamento do músculo reto de sua aponeurose posterior; e após, além da manobra anterior, a liberação e descolamento do músculo oblíquo externo. O modelo experimental descrito mostrou-se factível na avaliação da alteração da tensão na parede abdominal após incisões e descolamentos destes músculos e aponeuroses.

AMORIM *et al.* (2007) compararam a resistência à tração medial das lâminas posterior e anterior da bainha do músculo reto do abdome em diferentes níveis supra e infraumbilicais em cadáveres. Utilizaram 20 cadáveres adultos que foram submetidos à dissecação da parede abdominal anterior. Foram feitas alças com fio de náilon no plano aponeurótico em oito pontos diferentes na lâmina anterior e na lâmina posterior da bainha do músculo reto do abdome, sendo quatro destes pontos supraumbilicais e

quatro infraumbilicais. Com o uso de um dinamômetro analógico, foi verificada a força necessária para o avanço medial de dez milímetros destes 16 pontos. Não foram encontradas diferenças significantes de medidas da resistência à tração entre os diferentes níveis da aponeurose anterior e posterior, mas quando se comparou as medidas obtidas na aponeurose anterior às obtidas na posterior verificou-se que a aponeurose anterior necessitou de maior força de tração para o avanço medial. A aponeurose anterior é mais resistente à tração medial quando comparada à aponeurose posterior.

BARBOSA *et al.* (2007) dissecaram 20 cadáveres não fixados e avaliaram a resistência à tração medial das lâminas anterior e posterior do músculo reto abdominal, após a dissecação dos componentes músculo-aponeuróticos da parede abdominal anterior, em três fases: sem nenhum descolamento, após liberação do reto do abdome de sua lâmina anterior e após incisão longitudinal, na aponeurose do músculo oblíquo externo ao longo da linha semilunar. Concluíram que houve diminuição significativa da tensão à tração medial dos componentes músculo-aponeuróticos da parede abdominal após o descolamento da musculatura.

BARBOSA *et al.* (2010) dissecaram 40 cadáveres não fixados, divididos em dois grupos com 20 cadáveres cada grupo. No primeiro grupo procedeu-se a incisão da aponeurose do músculo oblíquo externo na linha semilunar. No segundo grupo não foi realizada incisão. Em ambos os grupos, a resistência à tração medial das lâminas anterior e posterior do músculo reto do abdome foi mensurada com um dinamômetro analógico, posicionado três centímetros superiormente e dois centímetros inferiormente ao umbigo. As mensurações foram comparadas em três fases:



1- sem qualquer deslocamento (ambos os grupos); 2- deslocamento do músculo reto do abdome de sua lâmina anterior (ambos os grupos) e 3- no grupo A liberação e descolamento do músculo oblíquo externo através da incisão da linha semilunar e no grupo B descolamento do oblíquo externo através do recesso lateral da bainha do músculo reto do abdome. Nos dois grupos houve redução significativa da resistência à tração após cada fase da dissecação. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das fases na comparação realizada entre os grupos A e B.

### **3.2 Fibras de colágeno**

PANS, PIÉRARD, ALBERT (1999) realizaram uma avaliação semiquantitativa do músculo reto do abdome e fáscia transversal na hérnia inguinal em adultos. Foram avaliadas amostras de pacientes com hérnia uni ou bilaterais e de controles sem hérnia, do gênero masculino e feminino e com a média de idade variando nos grupos entre 48 e 57 anos. Não houve diferença estatística do colágeno entre o grupo controle e grupo de pacientes, a morfologia e a área relativa das fibras elásticas foram semelhantes, também foram observados os mesmos resultados para a quantidade de adipócitos e fibras musculares lisas. O número de vasos e células por campo foram aumentadas, significativamente, nas fáscias de hérnia direta, em comparação com as fáscias controle. O número de fáscias com a estrutura de colágeno desorganizada foi aumentada no grupo de hérnia direta.

RODRIGUES JUNIOR *et al.* (2002) demonstraram alterações estruturais e quantitativas de fibras de colágeno e elásticas na *fascia transversalis* com o envelhecimento, tendo importante papel na gênese da hérnia inguinal. Com o objetivo de verificar diferenças na matriz extracelular de pacientes com hérnia inguinal direta e indireta, quantificaram o colágeno e as fibras elásticas de 36 pacientes masculinos com hérnia inguinal indireta e 21 pacientes masculinos com hérnia inguinal direta. Os fragmentos de *fascia transversalis* foram retirados durante a intervenção cirúrgica e seguiram para análise quantitativa calorimétrica do colágeno e histomorfométrica de fibras elásticas da *fascia transversalis* de pacientes com hérnia inguinal direta apresentaram menor quantidade de colágeno e maior quantidade de fibras elásticas em relação à *fascia transversalis* de pacientes com hérnia inguinal indireta. Estes resultados deram elementos para compreender a participação efetiva da matriz extracelular na gênese da hérnia inguinal direta, sugerindo uma relação com alterações genéticas do metabolismo de fibras elásticas e colágeno.

WOLWACZ JÚNIOR, TRINDADE, CERSKI (2003) analisaram a espessura, elementos constitutivos e quantificação do colágeno total em amostras de *fascia transversalis* e compararam os dois grupos: Grupo 1 – pacientes entre 20 e 60 anos de idade com hérnia inguinal direta e Grupo 2 – cadáveres que não apresentavam hérnias. As técnicas de Hematoxilina-Eosina e *Picro Sirius red* foram utilizadas. Constatou-se uma espessura de *fascia transversalis* nos controles, em média, de 4,5 milímetros. A espessura da *fascia transversalis* dos pacientes com hérnia foi, em média, 58% menor ( $p < 0,001$ ). Não se evidenciou nenhum processo de degeneração das fibras de colágeno atribuível à senilidade. O principal elemento constitutivo da fáschia, nos dois grupos, foi o tecido conjuntivo

denso, representando cerca de 75% nos controles e sendo um terço menor nos pacientes ( $p < 0,001$ ). A área média percentual de colágeno no campo amostral dos pacientes foi metade da área dos controles ( $p < 0,001$ ), resultando em uma menor quantidade de colágeno na parede posterior herniada. Concluíram que os pacientes com hérnia inguinal direta apresentam menor quantidade de colágeno – tanto absoluto quanto relativamente – aos demais elementos constitutivos da *fascia transversalis*.

GONÇALVES *et al.* (2003) avaliaram a participação do colágeno na etiopatogenia das hérnias inguinais, através da análise quantitativa histoquímica do colágeno na bainha anterior do músculo reto do abdome e na *fascia transversalis*: operaram 40 doentes do sexo masculino, na faixa etária entre 20 e 60 anos, portadores de hérnia inguinal e foram realizadas autópsias em dez cadáveres frescos, da mesma faixa etária que não apresentavam hérnias da parede abdominal (grupo controle). Em ambos os grupos, amostras da lâmina anterior do músculo reto do abdome e da *fascia transversalis* foram colhidas, coradas pela técnica histoquímica do *Picro Sirius red* e submetidas à análise morfométrica quantitativa através de sistema computadorizado com a finalidade de identificar possíveis alterações quantitativas do colágeno em cada um dos dois tipos de hérnias em comparação com indivíduos sem hérnias. Encontraram maior concentração do colágeno na lâmina anterior do músculo reto do abdome, em comparação com a *fascia transversalis* em todos os grupos estudados, embora esta diferença tenha sido estatisticamente significativa apenas no grupo controle. Não foram encontradas diferenças na concentração do colágeno, na lâmina anterior do músculo reto do abdome e na *fascia transversalis*, entre os doentes com hérnias, também não houve diferenças na concentração do colágeno quando comparados os grupos com hérnias e

o grupo controle, não havendo diferenças na quantidade do colágeno na lâmina anterior do músculo reto do abdome e na *fascia transversalis* entre os pacientes portadores de hérnia inguinal em comparação com indivíduos sem hérnias.

BÓRQUEZ MORALES (2005) estudou a Imuno-histoquímica do colágeno tipo I e III na pele de nove pacientes com hérnia inguinal primária comparados a nove pacientes sem hérnia. Na distribuição de colágeno tipo I a diferença não foi significativa, porém nos pacientes com hérnia inguinal encontramos maior concentração de fibras de colágeno tipo III nas regiões mais superficiais da pele. Na quantificação de colágeno tipo I/III por Imuno-histoquímica obteve o valor de 1,28 para pacientes sem hérnia e 0,79 para pacientes com hérnia inguinal primária, sendo esta diferença estatisticamente significante. Concluiu que há uma diferença na qualidade e quantidade de fibras de colágeno e na proporção de colágeno tipo I/III na pele de pacientes com hérnia se comparados com os sem hérnia.

FACHINELLI & MACIEL TRINDADE (2007) compararam a quantidade de colágeno I e III em 26 pacientes com hérnia abdominal anterior e 32 cadáveres sem hérnia, os dois grupos de ambos os sexos e com idade entre 20 e 65 anos, foram retirados fragmentos da fâscia (três centímetros superior e dois centímetros inferior à linha umbilical) e com a técnica histológica de *Picro Sirius red* e Imuno-histoquímica para o colágeno I e III. Observaram que as quantidades de colágeno total eram 18,05% menores em pacientes com hérnias da parede anterior do abdome quando comparados ao grupo controle de cadáveres sem hérnias, sendo as quantidades de colágeno tipo I, 20,50% menores e a tipo III, 7,3% menores

nos pacientes com hérnia. Concluíram que a quantidade de colágeno é menor nos pacientes com hérnia do que nos cadáveres sem hérnia.

MEYER *et al.* (2007) relataram que a hérnia inguinal é a segunda afecção cirúrgica mais comum em nosso meio. Os fatores anatômicos, isoladamente, não são suficientes para explicar a ocorrência das hérnias inguinais. A maior produção de colágeno tipo III, em relação ao tipo I, poderia justificar o adelgaçamento da *fascia transversalis* e sua fraqueza. Os autores determinaram as alterações quantitativas e qualitativas de colágeno na *fascia transversalis* de doentes com hérnia inguinal, compararam com achados em cadáveres sem hérnia inguinal e realizaram um estudo prospectivo caso-controle com análise de biópsia de *fascia transversalis* de 27 doentes e 24 cadáveres, por meio de coloração de hematoxilina-eosina e *Picro Sirius red*. A área percentual média de colágeno (tipo I + tipo III) e colágeno tipo I, nos dois grupos, não apresentou diferença estatística. A quantidade de colágeno tipo III foi maior que nos doentes. Concluíram que há diferença significativa na quantidade de colágeno em *fascia transversalis* de doentes comparados com controles, havendo diminuição na quantidade de colágeno tipo III nos doentes com hérnia.

FACHINELLI, TRINDADE, FACHINELLI (2011) avaliaram as fibras de colágeno e elásticas da fáschia de 30 pacientes (15 do gênero masculino e 15 do gênero feminino), sendo 14 com hérnia umbilical, 6 com hérnia incisional e 10 com hérnia epigástrica e compararam com um grupo controle (cadáveres) por Imuno-histoquímica e Orcina. Obtiveram uma diminuição da quantidade de colágeno I e III no grupo composto por pacientes quando comparado ao grupo controle

## **4. MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da amostra

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFESP CEP n°1492/08 (Anexo 1) e autorizado pelo Instituto Médico Legal de Franca (SP) (Anexo 2).

Foram dissecados 40 cadáveres adultos, frescos (não fixados), do gênero masculino, com tempo de óbito de até 24 horas, em temperatura ambiente (22 – 25°C), provenientes do Instituto Médico-Legal de Franca. Os critérios de exclusão adotados foram:

- Gênero feminino;
- Com idade abaixo de 18 anos;
- Com idade superior a 60 anos;
- Submetidos a baixas temperaturas;
- Submetidos à laparotomias prévias;
- Presença de hérnias da parede abdominal;
- Vítimas de trauma abdominal.

Foram realizadas medidas de altura, peso, distância xifo-púbica, distância entre as cristas ilíacas. O índice de massa corpórea individual foi calculado.

Os cadáveres foram distribuídos em dois grupos de 20 cadáveres cada: GRUPO 1 (n=20) – cadáveres de 18 a 30 anos de idade (média 23,45 - mediana 24) e GRUPO 2 (n=20) – cadáveres de 31 a 60 anos de idade (média 46,25 - mediana 47,50).

## 4.2 Dissecção anatômica

Com o cadáver colocado em posição supina (decúbito dorsal horizontal), foi realizada incisão xifo-púbica com bisturi de lâmina número dez, incluindo a pele e o tecido subcutâneo até a exposição da linha alba, contornando-se da cicatriz umbilical de ambos os lados. A dissecção supra-aponeurótica teve como limites superiores, as margens costais; como limites laterais, as linhas semilunares e como limites inferiores, as espinhas ilíacas antero superiores e os ligamentos inguinais.

A separação entre os músculos retos do abdome foi delimitada com violeta de genciana. Os dois pontos de referência para obtenção de material para estudo foram demarcados: o primeiro, a três centímetros superiormente ao ponto mais cefálico da cicatriz umbilical (nível supraumbilical) e o segundo, a dois centímetros inferiormente ao ponto mais caudal da cicatriz umbilical (nível infraumbilical), foram retirados quatro fragmentos de músculo reto do abdome, de um centímetro quadrado (Figura 1). Os fragmentos foram denominados de acordo com a associação das seguintes referências:

s = supraumbilical;

i = infraumbilical;

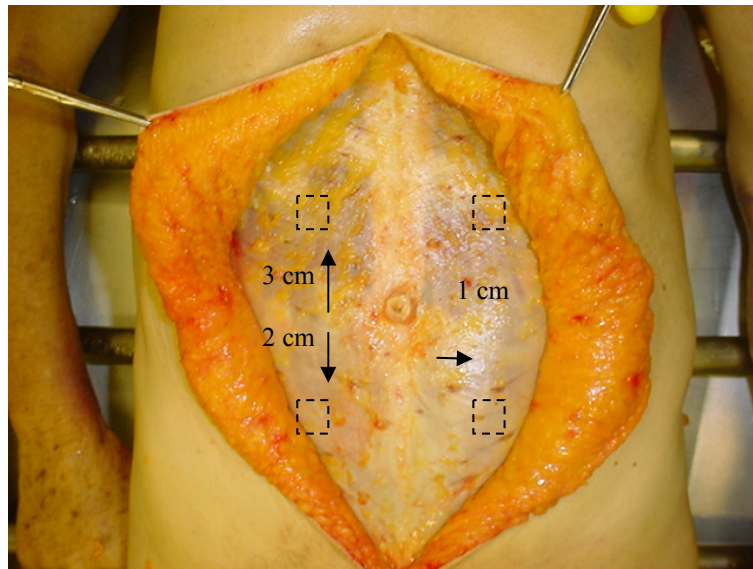
e = esquerdo;

d = direito.

Os dois fragmentos retirados no nível supraumbilical, foram denominados: sd (superior direito) e se (superior esquerdo). Da mesma maneira, os dois fragmentos retirados no nível infraumbilical, foram denominados: id (inferior direito) e ie (inferior esquerdo).



Esse material foi conservado em formol tamponado e enviado para exame de histologia e Imuno-histoquímica para avaliação do tipo de fibra de colágeno, no Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM.



**Figura 1. Local de retirada dos fragmentos do músculo reto do abdome do cadáver.**

#### 4.3 Procedimentos histológicos

Os fragmentos obtidos foram identificados em ordem numérica crescente para que, no momento da análise das lâminas, a idade permanecesse desconhecida pelo pesquisador (estudo cego). Foram então fixados em solução de formaldeído a 10% (tampão fosfato) por 24 horas. Após a fixação, foram desidratados em álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina a 60° C. Os 160 blocos foram, então, submetidos a cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura em micrótomo modelo rotativo (Leica®, Alemanha), e submetidos a colorações

específicas no Setor de Técnica Histológica do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Os cortes histológicos foram corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) para identificação de alterações histopatológicas, sendo esta análise utilizada como critério de inclusão das amostras, onde eram incluídas somente aquelas que não apresentavam alterações histopatológicas.

Foram realizadas as seguintes colorações especiais, segundo no quadro 1:

**Quadro 1. Método histológico para cada tipo de fibra corada**

<b>Coloração</b>	<b>Tricômio de <i>Masson</i></b>	<b><i>Picro Sirius red</i></b>
Tipo de fibra corada	Colágeno I	Colágeno I e III

**4.3.1 Coloração de *Picro Sirius red***

Foi utilizada a coloração de *Picro Sirius red* em amostras obtidas de todas as porções com a finalidade de quantificar os tipos de colágeno tipo I e III, sem diferenciá-los.

**4.3.2 Coloração de *Masson***

Foi utilizada a coloração de *Masson* em amostras obtidas de todas as porções com a finalidade de quantificar os tipos de colágeno tipo I.

### 4.3.3 Técnica de Imuno-histoquímica

Foi utilizada a técnica de Imuno-histoquímica com cada fragmento das peças com a finalidade de visualização e quantificação das fibras de colágeno (I, II, III, IV e V), onde foram utilizados os anticorpos primários (Quadro 2) e o Kit LSAB (anticorpo secundário e Estreptavidina conjugada com Peroxidase – Dako Cytomation, UK).

**Quadro 2. Anticorpo primário para cada tipo de colágeno para o Método de Imuno-histoquímica**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Código</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fornecedor</b>
<b>Type I collagen (policlonal)</b>	2150-0020	Coelho	1:50	Biogenesis
<b>Type II collagen (policlonal)</b>	20211	Coelho	1:100	Novotec
<b>Type III collagen (policlonal)</b>	2150-0100	Placenta humana	1:50	Biogenesis
<b>Type IV collagen (policlonal)</b>	20411	Coelho e placenta humana	1:100	Novotec
<b>Type V collagen (policlonal)</b>	251202	Rato, coelho e cabra	1:50	Abbotec

Com cortes de três  $\mu\text{m}$  de espessura em lâminas silanizadas, foi realizada a desparafinização à quente (xilol 30min) e desparafinização à frio (xilol 30min), feita três vezes a desidratação álcoois absolutos. A hidratação dos cortes: cinco min água corrente, cinco minutos de água destilada foi feito o bloqueio de peroxidase endógena, 130 volume de peróxido de hidrogênio, nove minutos 27,0ml +73,0ml de água destilada fazendo o processo por duas vezes, passagem de cinco minutos em água corrente, cinco minutos por duas vezes na água destilada e cinco minutos por duas vezes no tampão PBS.

Após este período os anticorpos primários foram incubados em solução de BSA à 1% (albumina bovina sérica) em tampão PBS, pH 7,4 (phosphate buffer solution) em câmara úmida à 4°C por 24 horas.

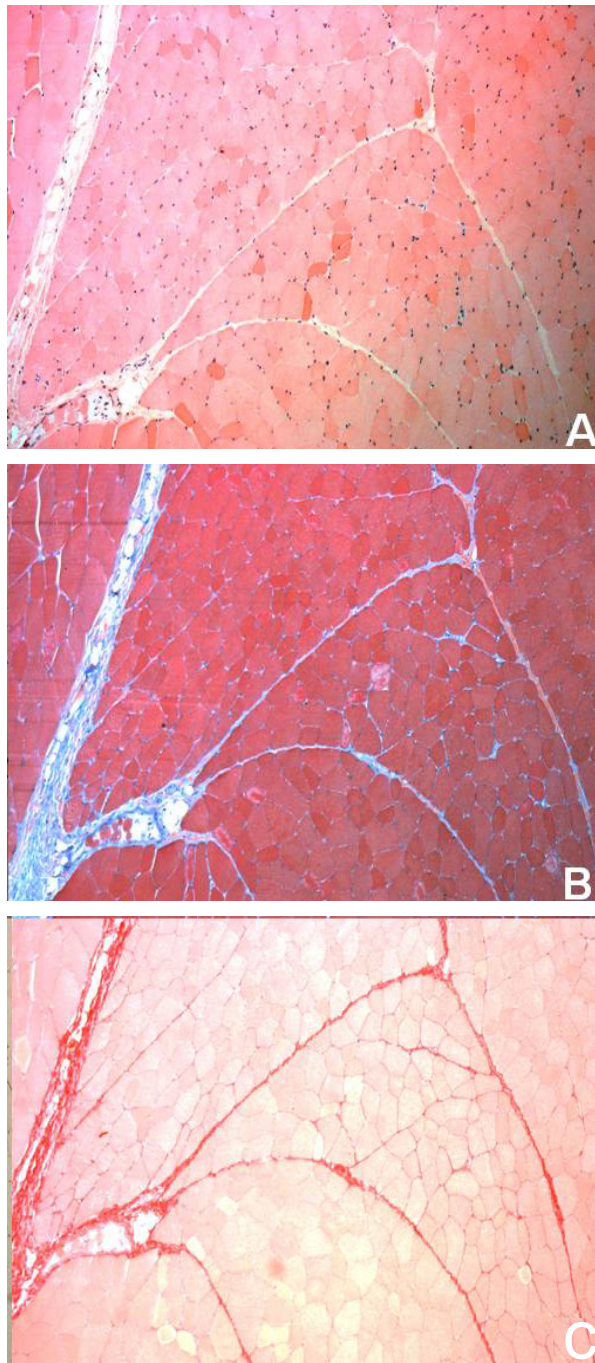
Após três lavagens em tampão PBS, efetuou-se a incubação com o anticorpo secundário biotilado do Kit DAKO LSAB-HRP (Dako Corporation, EUA) por 30 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente; três lavagens em tampão PBS, pH 7,4 e incubação com o conjugado streptavidina biotina peroxidase do Kit DAKO LSAB-HRP (Dako Corporation, EUA), por 30 minutos, câmara úmida e 3 lavagens com tampão PBS pH 7,4.

Para a revelação, utilizou-se o cromógeno DAB 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Aldrich Co. EUA) e peróxido de hidrogênio a 1% em tampão PBS, pH 7,4 por cinco minutos, a temperatura ambiente e lavagem extensiva em água corrente.

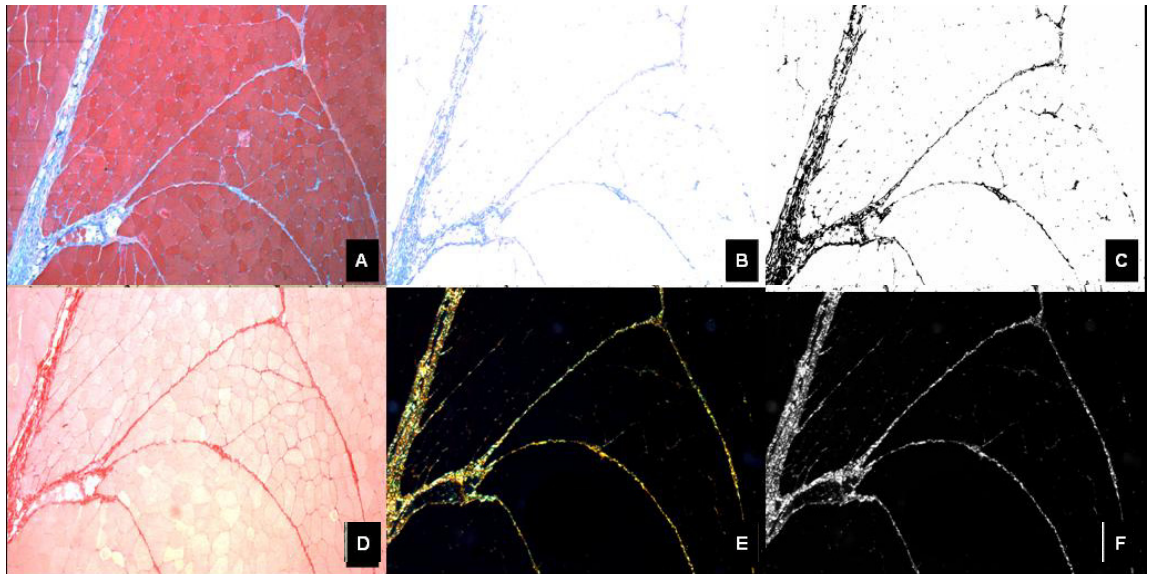
#### 4.4 Avaliação quantitativa do colágeno

A quantificação do colágeno pelos cortes histológicos corados pelo *Picro Sirius red* e por Tricrômio de *Masson* (Figura 2) bem como a quantificação de cada tipo de colágeno pelo método Imuno-histoquímico foram realizadas por método digital. Inicialmente foram visualizadas e digitalizadas com o uso de câmera digital Olympus® Q-Color3 com resolução de 200 dpi acoplada a microscópio óptico Olympus® BX-40, sob aumento de 100 vezes. As avaliações foram realizadas em 10 campos randomizados. A lente, a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador foram padronizadas, bem como os parâmetros de intensidade, brilho e contraste do programa de captura das imagens, para se obter uniformidade das características das imagens digitalizadas. As fibras de colágeno coradas com *Picro Sirius red* foram visualizadas com filtro de polarização (ANDREA, BLEGGI-TORRES, ALVES, 2008; CALVI *et al.*, 2012).

Com exceção do *Picro Sirius red* que foi utilizada a polarização, nas demais técnicas as imagens foram processadas no programa *Corel Photo Paint*®, criando-se uma máscara de cor para isolamento da área corada antes de serem transportadas para o *software ImageTool*® 3.0 (UTHSCA) para quantificação do colágeno. Estas imagens, com o colágeno isolado (Figura 3), foram transformadas em branco e preto e quantificadas as porcentagens de colágeno, a área, a quantidade de objetos e realizada também a avaliação da densidade.



**Figura 2.** Fotomicrografia de músculo reto do abdome corados por HE (A), Tricômio de *Masson* (B) e *Picro Sirius red* (C). Grupo 1. Identificação do colágeno 100x.



**Figura 3.** Fotomicrografia do músculo retro abdominal corados por *Masson* (A-C) e *Picro Sirius red* (D-F). Áreas de interesse selecionadas no programa *Corel Photo Paint*<sup>®</sup> (B) ou submetidas à luz polarizada (E) e áreas demarcadas para quantificação no programa *ImageTool*<sup>®</sup> 3.0 (UTHSCA) (C, F). Grupo 1. 100x

#### 4.5 Avaliação qualitativa do colágeno

A avaliação qualitativa do colágeno ou semi-quantificação foi realizada pelo método de Imuno-histoquímica de acordo com o Quadro 3 por dois pesquisadores cegos:

**Quadro 3.** Padrão para avaliação da qualificação dos diferentes tipos de colágeno estudados pelo método de Imuno-histoquímica

Classificação	Número	Presença de colágeno
0	0	Ausente
+	1	Mínimo
++	2	Moderado
+++	3	Abundante

#### 4.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas (ZAR, 1997).

O teste de Wilcoxon (SIEGEL & CASTELANI, 2006) foi utilizado para os dados do Tricômio de *Masson* e *Picro Sirius red* emparelhados dentro de cada grupo (amostra direita e esquerda, supra e infraumbilical), com a finalidade de comparar separadamente cada grupo.

O teste de Mann-Whitney (SIEGEL & CASTELANI, 2006) foi utilizado para dados do *Picro Sirius red*, Tricômio de *Masson* e Imuno-histoquímica, com a finalidade de comparar os grupos em relação às diferenças percentuais ( $\Delta\%$ ).

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de significância.

As análises foram efetuadas empregando-se o programa de computador Prisma<sup>®</sup> (Califórnia, Estados Unidos da América) e Excel<sup>®</sup> (Microsoft).



## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

O grupo 1 foi composto por indivíduos com idade entre 18 a 30 anos (média 23,3 anos), enquanto o grupo 2 incluiu indivíduos entre 31 a 60 (média 46,25 anos).

Não foram observadas diferenças em relação aos fragmentos direito e esquerdo, supra e infraumbilical, em cada indivíduo, quando avaliados pelas colorações Tricrômio de *Masson* (Tabela 1) e *Picro Sirius red* (Tabela 3).

**Tabela 1. Quantificação do colágeno tipo I do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. Tricrômio de *Masson*.**

	GRUPO 1				GRUPO 2			
	Supraumbilical		Infraumbilical		Supraumbilical		Infraumbilical	
	D	E	D	E	D	E	D	E
<b>Média</b>	1,18	1,25	1,50	1,36	1,19	1,05	1,12	1,40
<b>Mediana</b>	1,15	0,99	1,01	1,19	0,82	0,92	1,13	1,50
	z= 0,07 p= 0,93		z= 0,28 p= 0,77		z= 1,26 p= 0,20		z= 1,05 p= 0,29	

Teste de Wilcoxon - Diferença está significativa para  $p < 0,05$   
(D x E)

Uma vez que a comparação direita e esquerda não mostrou diferença significativa, utilizou-se a média entre os valores simétricos para a comparação entre os grupos.

Não foram observadas diferenças entre os grupos pelo Método Histológico de *Masson* (Tabela 2).

**Tabela 2. Quantificação do colágeno tipo I do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. Tricrômio de *Masson***

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Supraumbilical	Infraumbilical	Supraumbilical	Infraumbilical
<b>Média</b>	1,22	1,43	1,12	1,26
<b>Mediana</b>	1,03	1,16	0,88	1,36

Teste de Mann-Whitney - Diferença está significativa para  $p < 0,05$   
(Grupo 1 x Grupo 2)

<u>Supraumbilical</u>	<u>Infraumbilical</u>
z= 0,71	z= 0,98
p= 0,47	p= 0,32

Quando comparados novamente os lados direito e esquerdo, supra e infraumbilical, pela técnica de *Picro Sirius red*, também não houve diferenças intragrupos, mostrando homogeneidade dos grupos (Tabela 2).

**Tabela 3. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2 corados por *Picro Sirius red*.**

	GRUPO 1				GRUPO 2			
	Supraumbilical		Infraumbilical		Supraumbilical		Infraumbilical	
	D	E	D	E	D	E	D	E
<b>Média</b>	1,04	1,10	1,08	1,11	0,55	0,57	0,65	0,52
<b>Mediana</b>	1,03	0,99	1,03	1,08	0,42	0,45	0,50	0,38

Teste de Wilcoxon - Diferença está significativa para  $p < 0,05$   
(D x E)

z= 0,40	z=0,53	z=0,40	z=0,80
p=0,68	p=0,59	p=0,68	p=0,42

Uma vez que a comparação direita e esquerda não mostrou diferença significativa, utilizou-se a média entre os valores simétricos para a comparação entre os grupos.

A técnica histológica do *Picro sirius red* avalia o colágeno total (I + III) e, apesar de estar descrita a possibilidade de diferenciação destes tipos de colágeno por esta técnica, não foi possível tal diferenciação no material do presente estudo. Todavia, verificou-se que o Grupo 2 (composto por cadáveres de maior faixa etária) apresentou uma quantidade de colágeno estatisticamente inferior à quantidade de colágeno do Grupo 1 (Tabela 4).

**Tabela 4. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. *Picro Sirius red***

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Supraumbilical	Infraumbilical	Supraumbilical	Infraumbilical
<b>Média</b>	1,07	1,09	0,56	0,59
<b>Mediana</b>	1,03	1,05	0,43	0,43

Teste de Mann-Whitney\* - Diferença está significativa para  $p < 0,05$  (Grupo 1 x Grupo 2)

Supraumbilical

$z = 3,30$

$p = 0,001^*$

grupo 1 > grupo 2

Infraumbilical

$z = 3,73$

$p = 0,0002^*$

grupo 1 > grupo 2

A Imuno-histoquímica é uma técnica mais específica e confirmou os resultados da histologia. Pode-se quantificar os diferentes tipos de colágenos, além de confirmar que não existe colágeno II no músculo reto do abdome. Foi possível observar a presença do colágeno V nos dois grupos. Entretanto, devido à coloração de outras estruturas, não foi possível

a quantificação do colágeno tipo V. Os colágenos do tipo I e III apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, o que não ocorreu com o colágeno IV (Tabela 5 e 6).

**Tabela 5. Avaliação qualitativa de colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome no Grupo 1 e Grupo 2. Imuno-histoquímica**

Caso	Colágeno I		Colágeno III		Colágeno IV	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
<b>Média</b>	2,70*	1,30	2,90*	1,30	2,30	2,20
<b>Mediana</b>	3,00	1,00	3,00	1,00	2,50	2,00

0 - ausência de colágeno; 1 - pouca ocorrência; 2 média ocorrência; 3 - grande ocorrência.

Teste de Mann-Whitney\* - Diferença está significante para  $p < 0,05$

**Tabela 6. Quantificação do colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome (% de colágeno) no Grupo 1 e Grupo 2. Imuno-histoquímica**

Caso	Colágeno I		Colágeno III		Colágeno IV	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
<b>Média</b>	1,34	0,72	0,99	0,60	1,85	2,22
<b>Mediana</b>	1,03	0,43	0,81	0,59	1,42	2,29
	$\chi^2 = 13,50$ $p = 0,0012^*$		$\chi^2 = 17,00$ $p = 0,0002^*$		$\chi^2 = 1,83$ $p = 0,3998$	

Teste de Mann-Whitney\* - Diferença está significante para  $p < 0,05$

## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

O tecido muscular estriado esquelético é constituído por dois tipos básicos de fibras com diferentes características morfológicas, metabólicas e contráteis (DE BRITO *et al.*, 2007). A frequência e a distribuição dos tipos de fibras de colágeno nos diferentes músculos é variável entre espécies, etnias, indivíduos, idade, gênero, grupo muscular, prática de atividade física, desuso, desnutrição, denervação e estresse fisiológico crônico. Neste campo da investigação a utilização de métodos morfológicos e histoquímicos tem-se mostrado importante na avaliação da anatomia e fisiologia muscular (ORPHEU *et al.*, 2010).

Além de fornecer suporte estrutural para os tecidos, a matriz extracelular é meio pelo qual transitam informações entre as células, que por sua vez são responsáveis por processos como morfogênese, diferenciação e migração celulares, reparo e fibrose tecidual, ela é dividida em três tipos de fibras: colágeno, reticulina e elásticas (USHIKI, 2002). As diversas concentrações e associações dos componentes da matriz extracelular resultam em adaptações específicas para determinados órgãos, permitindo a manutenção da homeostase, diferenciações celulares em cada estágio da vida e adaptações frente a diferentes estímulos (MONTES, 1996; READ, 2009).

O termo colágeno refere-se a uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares, sendo a mais abundante proteína fibrosa extracelular dos seres humanos, formando cerca de 25% de todas as suas proteínas (TAKALA & VIRTANEN, 2000) e 1 a 9% da massa não gordurosa do músculo esquelético (KOVANEN, SUOMINEN, PELTONEN, 1987; DE SOUZA, 2002).

A concentração de colágeno, presente no espaço extracelular é controlada antes e após a sua secreção. A renovação do colágeno intracelular, o pró-colágeno, é dependente da relação entre a síntese e a taxa de degradação. No espaço extracelular, a tripla hélice de colágeno é fragmentada pela ação das metaloproteínases (MMPs), ou colagenases, e esses fragmentos são degradados por proteinases. As MMPs são uma família de endopeptídasas que coletivamente são capazes de degradar todos os componentes da matriz (KOVANEN, SUOMINEN, PELTONEN, 1987).

No presente estudo, o músculo reto do abdome revelou-se constituído por fibras de colágeno de diferentes diâmetros, tendo contornos poligonais, com um ou mais núcleos periféricos. Essa morfologia confirma o que existe descrito na literatura (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O colágeno é um importante componente de fâscias e músculos, conferindo resistência a estas estruturas (NAHAS, BARBOSA, FERREIRA, 2009). Até o momento, mais de 19 tipos de colágeno já foram descritos (MYERS *et al.*, 1997), sendo os tipos I e III os mais estudados. No músculo existe colágeno tipo I, III, IV e V e na fâscia apenas I e III (NAHAS, BARBOSA, FERREIRA, 2009).

No músculo esquelético, o colágeno se apresenta em três formas fibrilares (I, III e V) e uma forma não fibrilar (IV). Os colágenos do tipo I e III são os mais abundantes, o tipo I corresponde a 80% e o tipo III a 19%, além disso, os colágenos II, XI, XIII, XIV, XV e XVII também têm sido encontrados no músculo esquelético e o colágeno tipo VI no músculo cardíaco (TAKALA & VIRTANEN, 2000). O colágeno é um material resistente, com grande força tênsil. Essa característica depende de muitos fatores, incluindo sua concentração no tecido, seu alinhamento espacial, o



diâmetro das fibras e o tipo de colágeno. As diferentes propriedades dos diversos tipos de colágeno, dentro do músculo esquelético, capacitam cada um a desempenhar uma função específica (KOVANEN, SUOMINEN, PELTONEN, 1987).

Apesar da identificação de diversos tipos de colágeno, o papel exato de suas funções estruturais em vários tecidos, particularmente no músculo, não está plenamente esclarecido. Sabe-se, no entanto, que o colágeno, no músculo estriado, desempenha principalmente uma função estrutural, ligando as fibras musculares de modo a garantir um alinhamento apropriado, uma vez que a força de tensão do colágeno decorre da estrutura única de suas fibras, fibrilas e moléculas. Em particular, ela decorre das ligações cruzadas intermoleculares e intramoleculares, da orientação, da densidade e das forças de fricção, além de suas interações físicas e químicas com os outros componentes estruturais da matriz extracelular (IMAMURA, IMAMURA, HIROSE-PASTOR, 1999).

A avaliação das fibras de colágeno, especialmente dos subtipos, tem-se mostrado essencial para fins de diagnóstico (HECKMAN & JAMASBI, 1999) nas análises de biópsias musculares associadas a diferentes doenças e em condições experimentais, tais como: a hipertrofia provocada pelo estresse repetitivo, trabalho sustentado, atrofia por desuso ou denervação e a divisão longitudinal de fibras (DE BRITO *et al.*, 2007).

O colágeno tipo I é o mais comum em todos os tecidos, não apenas no músculo esquelético. Constituem 90% do colágeno no organismo e forma fibras colágenas no osso, dentina, cemento, tendões, fâscias, cápsulas de órgãos, ligamentos e na região profunda da derme. Sua principal função é proporcionar resistência à tensão, graças à suas grossas

fibras densamente empacotadas e de diâmetro heterogêneo (MONTES & JUNQUEIRA, 1991; EL SHERIF *et al.*, 2006; MINAMOTO, 2007).

O colágeno tipo III é o principal constituinte do tecido de granulação e cicatrizes precoces. É mais imaturo, ao passo que apenas uma pequena quantidade de colágeno do tipo I está presente nesta fase precoce. Esta relação muda conforme prossegue a cura. O colágeno tipo I é responsável principalmente para a resistência à tração enquanto o colágeno tipo III consiste em fibras mais finas, sendo considerado como uma matriz temporária durante a remodelação do tecido (DONAHUE, HIATT, BUSUTTIL, 2006; EL SHERIF *et al.*, 2006; CALALUCE *et al.*, 2013).

O colágeno tipo III está geralmente distribuído com o colágeno tipo I. Está presente em órgãos e tecidos que precisam de arcabouço estrutural variável, como a região superficial da pele, a camada média dos vasos sanguíneos, a mucosa dos órgãos do trato digestório, respiratório, reprodutor e em órgãos parenquimatosos. Durante os processos de reparo e nas fibroses em geral, o colágeno tipo III é o primeiro a ser depositado, e posteriormente é substituído pelo tipo I nas regiões sujeitas às grandes forças de tensão. O colágeno tipo III forma fibrilas de 35nm a 55nm de diâmetro, frouxamente empacotadas, com grande quantidade de substância amorfa entre si, e forma fibras frouxas e flexíveis de 0,5µm a 2µm de diâmetro conhecidas como fibras reticulares (MONTES, 1996).

Os colágenos tipos IV e V estão associados com membranas de base e os outros com uma variedade de tecidos, incluindo cartilagem e algumas linhagens tumorais. Os principais tipos de colágeno são os tipos I e III que constituem cerca de 95% de todo o colágeno, como por exemplo, na pele saudável que ocorrem numa proporção de aproximadamente quatro para um (EL SHERIF *et al.*, 2006).

Um dos problemas que advém da utilização de tecidos humanos obtidos de cadáveres para estudos histológicos é o tempo decorrido entre o óbito e a fixação do material, uma vez que ocorrem modificações teciduais após a morte. Por isso, nos estudos onde o tecido muscular foi o principal foco de análise utilizou-se um tempo menor entre o óbito e a fixação do material para minimizar as alterações da histoarquitetura tecidual (ROSENFELD *et al.*, 1982). Por esta razão no presente estudo foram utilizados tecidos removidos e fixados com menos de 24 horas de óbito. Durante este período de tempo, a atividade enzimática mantém-se preservada e os artefatos pós-morte são ausentes ou mínimos (FACHINELLI, TRINDADE, FACHINELLI, 2011).

Este modelo experimental foi baseado no descrito de NAHAS & FERREIRA (2003) onde os níveis estudados foram de três centímetros superior e dois centímetros inferior a cicatriz umbilical. Estes níveis foram utilizados para medir a tensão aponeurótica em uma série de estudos posteriores (AMORIM *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2011), enquanto que neste trabalho foi retirado das mesmas regiões um fragmento do músculo de um centímetro quadrado.

Foram utilizados critérios de inclusão e exclusão rigorosos no intuito de reduzir viés no estudo. Devido a estas observações e a dificuldade de obter esses fragmentos de indivíduos saudáveis, optou-se por realizá-lo em cadáveres, o gênero masculino foi critério de inclusão da pesquisa a fim de não haver interferência do número de gestações e possíveis diástases do abdome mais comum em mulheres.

Ainda de acordo com KLINGE, BINNEBOSEL, MERTENS (2006) a prevalência da hérnia incisional é amplamente independente do gênero e quase idêntica para homens e mulheres. Assim, a configuração contradiz

um defeito genético causal e sugere um processo biológico multifatorial, sendo que a hérnia inguinal em pacientes do gênero feminino têm taxas de prevalência semelhantes aos de hérnias incisionais de ambos os gêneros e, portanto, pode refletir uma patogênese similar.

Tomou-se o cuidado adicional de se identificar todos os fragmentos em ordem numérica crescente de forma que a variável idade dos cadáveres permanecesse desconhecida pelo pesquisador avaliador. Desta forma, procurou-se limitar a introdução de viés de observação, pelo cegamento do avaliador quanto a esta variável no momento de quantificação do colágeno.

Um ponto importante na seleção dos casos foi a de se obter uma amostra representativa da população. Foram incluídos indivíduos adultos cujas idades variaram de 18 a 60 anos, divididos em dois grupos contendo 20 indivíduos em cada grupo, sendo o Grupo 1 com idade entre 18 e 30 anos (média 23,45 - mediana 24) e Grupo 2 com idade entre 31 e 60 anos (média 46,25 - mediana 47,50).

A fim de quantificar os tipos de colágeno presentes no reto do abdome foram realizados os exames histológicos com as técnicas de Hematoxilina-Eosina para observar o estado da peça e a viabilidade do material. A coloração de Tricômio de *Masson* foi utilizada com a finalidade de se observar o colágeno tipo I. A técnica de *Picro Sirius red* foi empregada para avaliar o colágeno tipo I e III, sendo que em cada lâmina foram observadas dez imagens aleatórias. Na maioria da literatura esses exames são os mais realizados, porém são observadas de três a quatro imagens (MONTES & JUNQUEIRA, 1991; GONÇALVES *et al.*, 2003). Neste estudo optou-se por realizar dez imagens para que fossem obtidos resultados mais fidedignos, com isso obteve-se um total de 1600 imagens de cada técnica.

Existem diversos métodos histoquímicos para a detecção do colágeno nos tecidos, dentre eles, o método *Picro Sirius red* e a Imuno-histoquímica contribuíram significativamente para uma melhor compreensão da função e patologia do colágeno, já as colorações Tricrômio pelos métodos Mallory, *Masson* e Van Giesen, embora bastante utilizadas, não são tão sensíveis (MONTES, 1996).

O método *Picro Sirius red* baseia-se na coloração tecidual por um corante ácido, o *Sirius Red*. As moléculas de colágeno, que são ricas em aminoácidos básicos, reagem fortemente com corantes ácidos como o *Sirius Red*. Além desta forte reação, a molécula deste corante é longa e promove intensificação da birrefringência natural do colágeno, pelo fato de muitas das moléculas do corante se alinharem paralelamente ao eixo longitudinal de cada molécula de colágeno (MONTES, 1996).

O método de Imuno-histoquímica, usa anticorpos específicos e têm sido utilizado para determinar os tipos de colágenos presentes na matriz extracelular e fornece quantificações baseando-se numa reação antígeno-anticorpo. Para a identificação de uma proteína (antígeno) específica, seu determinado anticorpo reconhecerá o domínio levando a reação positiva final à coloração acastanhada.

A análise quantitativa isolada dos elementos da matriz extracelular não permite concluir a respeito da influência desses elementos nas propriedades mecânicas e viscoelásticas do tecido. A integração do sistema de fibras elásticas e colágenas, por exemplo, é importante para a manutenção da resistência tecidual normal. Alterando-se a composição do colágeno, da elastina ou alterando-se seu arranjo arquitetural, certamente a complacência tecidual será comprometida (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2002).

A complacência tecidual é influenciada, em parte, pela quantidade de ligações cruzadas entre as cadeias de aminoácidos do colágeno. Com a idade, ocorre um aumento da maturação dessas ligações cruzadas, o que levaria a uma maior agregação das fibrilas e tornaria o colágeno mais resistente à tensão (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2002).

A análise quantitativa foi realizada com o auxílio de *softwares* que permitem a graduação da imagem selecionada e, conseqüentemente, a contagem proporcional das estruturas analisadas. O *software Image Pro-Plus*<sup>®</sup>, tem sido utilizado para este tipo de análise, apresentando como principais limitações a complexidade no funcionamento e o custo elevado. Além disso, o tempo de análise é intensificado porque as imagens devem ser processadas individualmente (BOSI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). No presente estudo foi utilizado o *software ImageTool*<sup>®</sup> v. 3.0 que apresenta a mesma fidedignidade nos resultados, mas possui baixo custo, interface simples e aplicável à análise de amostras biológicas, sendo capaz de quantificar as fibras de colágeno e classificá-las em função de um único limiar selecionado pelo usuário, conseguindo padronizar a avaliação.

Existem vários estudos (GONÇALVES *et al.*, 2003; WOLWACZ JÚNIOR, TRINDADE, CERSKI, 2003; AMATO *et al.*, 2009) com pacientes com hérnia e cadáveres, onde avaliaram a quantidade de colágeno, geralmente tentando relacionar com doenças, porém não foi avaliada a presença de colágeno nas diferentes faixas etárias.

A hérnia incisional ou eventração é a protusão do conteúdo abdominal através de um ponto fraco da parede constituído pela cicatriz de intervenção cirúrgica anterior, sendo mais comum em incisões verticais, na linha mediana em sua porção infra e supraumbilical e após operações ginecológicas e obstétricas, sendo resultante muitas vezes do excesso de

tensão e da cicatrização inadequada da parede, sendo ainda relatados como fatores de risco a desnutrição, obesidade, diabetes, cardiopatias, doença pulmonar obstrutiva crônica, gravidez, córtico/quimioterapia prévia e, sobretudo no aparecimento tardio da hérnia, acredita-se que existam desordens do tecido conjuntivo devido à alterações dos colágenos tipo I e III e em metaloproteinases da matriz extracelular (PANS *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2007; HIDALGO *et al.*, 2011; ABDALLA *et al.*, 2012; PONTEN, SOMERS, NIENHUIJS, 2012; MONTGOMERY, PETERSSON, AUSTRUMS, 2013).

Alterações desfavoráveis ocorrem no músculo esquelético com a senescência, sendo o processo de envelhecimento acompanhado pela diminuição da função muscular decorrente da perda da massa, da capacidade de estiramento e da força do músculo (IMAMURA, IMAMURA, HIROSE-PASTOR, 1999).

A literatura especializada consigna poucos trabalhos relacionando os efeitos do envelhecimento no músculo humano, provavelmente devido às dificuldades inerentes à realização de pesquisas seriadas na musculatura humana, razão pela qual a grande maioria de trabalhos é realizada em modelos animais (IMAMURA, IMAMURA, HIROSE-PASTOR, 1999; BIONDO-SIMOES MDE *et al.*, 2005).

GOLDSPINK *et al.* (1994) observaram a redução da degradação da fibra colágena, enquanto MAYS *et al.* (1991) demonstraram a redução da síntese de colágeno com a idade, o que está de acordo com o observado no músculo reto do abdome de cadáveres.

Estudos em necropsia sobre a composição de fibras musculares no músculo vasto lateral mostraram perda de fibras musculares a partir da quarta década de vida (KOVANEN, SUOMINEN, PELTONEN, 1987).

Não obstante, a massa muscular não é o único determinante da função muscular, sendo que essas alterações podem ser decorrentes da substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo que também muda com a idade e exercem influência sobre o comportamento celular (LABAT-ROBERT, BIHARI-VARGA, ROBERT, 1990). Neste trabalho foi nítida a diferença já na terceira década da vida, quando a diminuição do colágeno pode ser verificada já na avaliação qualitativa como foi o caso da Imuno-histoquímica e confirmada pela avaliação quantitativa tanto na histologia com o método de *Picro Sirius red*, como na Imuno-histoquímica.

Tanto o envelhecimento quanto o tipo de atividade física levam a alterações quantitativas e qualitativas nas propriedades do tecido conjuntivo em órgãos. A biossíntese de colágeno, por exemplo, diminui com uma atividade muscular menor porque depende do equilíbrio entre produção e consumo de proteínas (TAKALA & VIRTANEN, 2000).

Alterações relacionadas com a idade, na distribuição das fibras colágenas em diversos órgãos, não especificamente o músculo reto do abdome, têm sido estudadas de modo amplo e apresentam resultados conflitantes. No entanto, a maioria dos autores concorda que essas alterações estão muito mais relacionadas ao estado de agregação da molécula e à organização tecidual das fibras de colágeno do que às alterações quantitativas (AMATO *et al.*, 2012).

Segundo AMATO *et al.*(2012) o colágeno em muitos órgãos, incluindo tendões, músculos e pulmões, sofre alterações tanto quantitativas como qualitativas com o avançar da idade. Em muitos tecidos ocorre um aumento na quantidade de colágeno total, sua solubilidade à temperatura de 65° C diminui e a estabilidade da estrutura aumenta. Isto resulta do



aumento das ligações cruzadas entre suas moléculas, tornando-o mais estável, rígido e resistente às collagenases.

Segundo COUPPE *et al.* (2009) a idade está associada com o declínio da massa muscular, força e função física.

Segundo IMAMURA, IMAMURA, HIROSE-PASTOR (1999) o efeito da imobilização e do desuso que, habitualmente, ocorre em músculos esqueléticos em idosos pode resultar em alterações do conteúdo dos elementos da matriz extracelular, principalmente o colágeno.

FACHINELLI, TRINDADE, FACHINELLI(2011); FACHINELLI & MACIEL TRINDADE (2007); MEYER *et al.* (2007); BÓRQUEZ MORALES (2005); GONÇALVES *et al.* (2003); WOLWACZ JÚNIOR, TRINDADE, CERSKI (2003); RODRIGUES JUNIOR *et al.* (2002) e PANS, PIÉRARD, ALBERT (1999) estudaram a relação do colágeno com a hérnia, algumas vezes inclusive com tipos diferentes de hérnias, utilizando os gêneros masculino e feminino, além das diversas faixas etárias, isso provavelmente pela dificuldade de realizar pesquisa com indivíduos, porém na fáscia e não no músculo, e não relacionaram com a idade, apenas compararam pacientes com hérnia com cadáveres sem hérnia, sendo utilizado algumas vezes avaliações semi-quantitativas ou quantitativas, utilizando na maioria das vezes o método histológico *Picro Sirius red*, em todas essas pesquisas foi encontrado que os cadáveres sem hérnia possuíam maior quantidade de colágeno do que os pacientes com hérnia.

Nas lâminas coradas pelo Tricômio de *Masson* não foi observado diferença entre o colágeno tipo I, porém *Picro Sirius red* onde foi observado a diminuição do colágeno I e III, sendo mais utilizado em pesquisas. Alguns estudos, como o de FACHINELLI & MACIEL

TRINDADE (2007) e CARNEIRO *et al.* (2005) afirmaram que estes tipos de colágeno até podem ser diferenciados pelo método do *Picro Sirius red*, mas no presente estudo encontravam-se muito entrelaçados, por isso optou-se por avaliá-los em conjunto e foram observados valores mais elevados de colágeno no grupo de indivíduos jovens. Estes resultados mantiveram-se tanto na avaliação qualitativa quanto na quantitativa com a porcentagem do colágeno pela Imuno-histoquímica. Portanto, verificou-se que no Grupo I (adultos jovens) há maior quantidade tanto de colágeno tipo I quanto de colágeno tipo III.

A avaliação qualitativa do método de Imuno-histoquímica foi realizada por dois pesquisadores cegos e ficou de acordo com os achados na avaliação quantitativa da Imuno-histoquímica, onde o colágeno I e III foi menor no grupo 2 e o colágeno IV se manteve, sendo a avaliação quantitativa mais precisa, pois por meio do programa *Image Tool* representa a porcentagem de colágeno na imagem.

É difícil determinar as contribuições individuais dos componentes biológicos da matriz extracelular nas propriedades mecânicas do músculo, mas é importante entender como os constituintes químicos, como por exemplo o colágeno fornecem seus atributos aos tecidos.

Estes resultados sugerem que pode haver uma relação com a diminuição da força muscular abdominal em faixas etárias maiores e uma maior predisposição ao aparecimento de hérnias abdominais devido à fragilidade da estrutura anatômica.

O colágeno é um importante componente para diferentes tecidos e, para tal, se comporta de forma diferente de acordo com a idade e fatores intrínsecos e extrínsecos, sendo necessário um estudo aprofundado em cada

tipo, para que seja possível prevenir e tratar alterações fisiológicas e patológicas.

Como perspectiva pode ser avaliada as fibras de colágeno na fáscia do músculo reto do abdome de cadáveres de acordo com a idade, avaliar as fibras de colágeno em outros músculos de acordo com a idade e avaliar o efeito do exercício físico no colágeno.

## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

1. Há quantidade menor de colágeno tipo I e III no grupo com faixa etária mais elevada.
2. Não há alteração de quantidade de colágeno tipo IV.

## **8. REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

Abdalla RZ, Garcia RB, Costa RI, Luca CR, Abdalla BM. Procedimento de Rives/Stoppa modificado robô-assistido para correção de hernias ventrais da linha média. *Arq Bras Cir Dig.* 2012 Apr-Jun;25(2):129-32.

Amato G, Marasa L, Sciacchitano T, Bell SG, Romano G, Gioviale MC, et al. Histological findings of the internal inguinal ring in patients having indirect inguinal hernia. *Hernia.* 2009 Jun;13(3):259-62.

Amato G, Agrusa A, Romano G, Salamone G, Gulotta G, Silvestri F, et al. Muscle degeneration in inguinal hernia specimens. *Hernia.* 2012 Jun;16(3):327-31.

Amorim CR, Nahas FX, Souza VC, Ely PB, Silveira RA, Novo NF, et al. Tensile strength of the posterior and anterior layer of the rectus abdominis muscle sheath in cadavers. *Acta Cir Bras.* 2007 Jul-Aug;22(4):255-9.

Andrea CE, Bleggi-Torres LF, Alves MT. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab.* 2008;44(1):51-7.

Barbosa MV, Nahas FX, Garcia EB, Ayaviri NA, Juliano Y, Ferreira LM. Use of the anterior rectus sheath for abdominal wall reconstruction: a study in cadavers. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2007;41(6):273-7.

Barbosa MV, Nahas FX, de Oliveira Filho RS, Ayaviri NA, Novo NF, Ferreira LM. A variation in the component separation technique that preserves linea semilunaris: a study in cadavers and a clinical case. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010 Mar;63(3):524-31.

Biondo-Simoes Mde L, Westphal VL, Paula JB, Borsato KS, Noronha L. Síntese de colágeno após a implantação de telas de polipropileno em parede abdominal de ratos jovens e velhos. *Acta Cir Bras.* 2005 Jul-Aug;20(4):300-4.

Bórquez Morales P. Estudio inmunohistoquímico del colágeno tipo I y tipo III en piel de pacientes con hernia inguinal primaria. *Rev Chil Cir.* 2005;57(6):489-94.

- Bosi PL, Delfino GB, Durigan JL, Cancelliero KM, Polacow ML, Silva CA. Metformina minimiza as alterações morfométricas no músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização articular. *Rev Bras Med Esporte*. 2008;14(5):436-9.
- Calaluce R, Davis JW, Bachman SL, Gubin MM, Brown JA, Magee JD, et al. Incisional hernia recurrence through genomic profiling: a pilot study. *Hernia*. 2013 Apr;17(2):193-202.
- Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Ihara SS, Calil JA, Ferreira LM. Immunohistochemical analysis of collagen content and types in the rectus abdominis muscle of cadavers of different ages. *Acta Cir Bras*. 2011;26 Suppl 2:3-7.
- Calvi EN, Nahas FX, Barbosa MV, Calil JA, Ihara SS, Silva Mde S, et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir Bras*. 2012 Oct;27(10):681-6.
- Carneiro CG, Sennes LU, Saldiva PH, Tsuji DH, Ximenes Filho JA. Assessment of collagen deposits after implant of fascia lata and fat in the vocal folds of rabbits: histomorphometric study. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005 Nov-Dec;71(6):798-802.
- Casanova AB, Trindade EN, Trindade MR. Collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernia: a case-control study. *Am J Surg*. 2009 Jul;198(1):1-5.
- Claus CM, Loureiro MP, Dimbarre D, Cury AM, Campos AC, Coelho JC. Hernioplastia incisional laparoscópica: experiência de 45 casos. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)*. 2011;24(2):121-5.
- Coupe C, Hansen P, Kongsgaard M, Kovanen V, Suetta C, Aagaard P, et al. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. *J Appl Physiol*. 2009 Sep;107(3):880-6.
- de Brito MJ, Nahas FX, Barbosa MV, Dini GM, Kimura AK, Farah AB, et al. Abdominoplasty and its effect on body image, self-esteem, and mental health. *Ann Plast Surg*. 2010 Jul;65(1):5-10.



- de Brito MK, Carvalho Junior CG, Dal Pai A, Dal Pai V, Giacometti JA. Morfologia e morfometria dos tipos de fibras do músculo reto abdominal de cadelas (*Canis familiaris*) durante a gestação. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2007;44(4):254-60.
- de Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*. 2002;3(6):325-35.
- Donahue TR, Hiatt JR, Busuttil RW. Collagenase and surgical disease. *Hernia*. 2006 Dec;10(6):478-85.
- DuBay DA, Wang X, Adamson B, Kuzon WM, Jr., Dennis RG, Franz MG. Mesh incisional herniorrhaphy increases abdominal wall elastic properties: a mechanism for decreased hernia recurrences in comparison with suture repair. *Surgery*. 2006 Jul;140(1):14-24.
- El Sherif A, Yano F, Mittal S, Filipi CJ. Collagen metabolism and recurrent hiatal hernia: cause and effect? *Hernia*. 2006 Dec;10(6):511-20.
- Fachinelli A, Maciel Trindade MR. Qualitative and quantitative evaluation of total and types I and III collagens in patients with ventral hernias. *Langenbecks Arch Surg*. 2007 Jul;392(4):459-64.
- Fachinelli A, Trindade MR, Fachinelli FA. Elastic fibers in the anterior abdominal wall. *Hernia*. 2011 Aug;15(4):409-15.
- Gao Y, Kostrominova TY, Faulkner JA, Wineman AS. Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. *J Biomech*. 2008;41(2):465-9.
- Goldspink G, Fernandes K, Williams PE, Wells DJ. Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. *Neuromuscul Disord*. 1994 May;4(3):183-91.
- Gonçalves RO, Silva EM, Marques TC, Lopes Filho GJ. Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal. *Rev Col Bras Cir*. 2003;30(4):286-92.

Heckman CA, Jamasbi RJ. Describing shape dynamics in transformed cells through latent factors. *Exp Cell Res*. 1999 Jan 10;246(1):69-82.

Hidalgo MP, Ferrero EH, Ortiz MA, Castillo JM, Hidalgo AG. Incisional hernia in patients at risk: can it be prevented? *Hernia*. 2011 Aug;15(4):371-5.

Imamura ST, Imamura M, Hirose-Pastor E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Rev Bras Reumatol*. 1999;39(1):35-40.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Klinge U, Binnebosel M, Mertens PR. Are collagens the culprits in the development of incisional and inguinal hernia disease? *Hernia*. 2006 Dec;10(6):472-7.

Kovanen V, Suominen H, Peltonen L. Effects of aging and life-long physical training on collagen in slow and fast skeletal muscle in rats. A morphometric and immuno-histochemical study. *Cell Tissue Res*. 1987 May;248(2):247-55.

Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, Miller MJ, Robb G, Evans G. Abdominal wall strength, bulging, and hernia after TRAM flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1995 Sep;96(3):616-9.

Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett*. 1990 Aug 1;268(2):386-93.

Lázaro da Silva A, Guerra AJ, Castro MA. Hérnia incisional. In: Lázaro da Silva A, editor. *Hérnias*. 2a ed. São Paulo: Roca; 2006. p. 398-420.

Lima JM. Tratamento cirúrgico das hérnias incisionais: experiência pessoal usando a malha de polipropileno monofilamentar-márlex. *Rev Col Bras Cir*. 2002;29(2):78-82.

Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation

- of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J.* 1991 Jun 1;276 ( Pt 2):307-13.
- Menezes FH, Guillaumon AT. Hérnias incisionais no pós-operatório de correção de aneurisma de aorta abdominal. *J Vasc Bras.* 2012;11(3):182-6.
- Meyer AL, Berger E, Monteiro Jr O, Alonso PA, Stavale JN, Goncalves MP. Quantitative and qualitative analysis of collagen types in the fascia transversalis of inguinal hernia patients. *Arq Gastroenterol.* 2007 Jul-Sep;44(3):230-4.
- Minamoto VB. Efeitos da desnervação no músculo esquelético: uma revisão. *Fisioter Mov.* 2007;20(3):63-9.
- Montes GS, Junqueira LC. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86 Suppl 3:1-11.
- Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996 Jan;20(1):15-27.
- Montgomery A, Petersson U, Austrums E. The arcuate line hernia: operative treatment and a review of the literature. *Hernia.* 2013 Jun;17(3):391-6.
- Myers JC, Li D, Bageris A, Abraham V, Dion AS, Amenta PS. Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens. *Am J Pathol.* 1997 Dec;151(6):1729-40.
- Nahas FX, Ishida J, Gemperli R, Ferreira MC. Abdominal wall closure after selective aponeurotic incision and undermining. *Ann Plast Surg.* 1998 Dec;41(6):606-13; discussion 13-7.
- Nahas FX, Ferreira LM. Cadaver as an experimental model to study abdominal wall tension. *Acta Cir Bras.* 2003;18 Spec No:37-45.
- Nahas FX, Barbosa MV, Ferreira LM. Factors that may influence failure of the correction of the musculoaponeurotic deformities of the abdomen. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Jul;124(1):334; author reply -5.

- Nahas FX, Kimura AK, Barbosa MV, Juliano Y, Ferreira LM. Components separation technique with limited subcutaneous undermining: a cadaver study. *Ann Plast Surg.* 2011 Sep;67(3):303-8.
- Naufel AM, Czezko NG, Mafafaia O, Ribas-Filho JM, Naufel-Junior CR, Dietz UA, et al. Comparative study between meshes of polyester with collagen and polytetrafluoroethylene in the repair of defects produced in abdominal wall of rats. *Acta Cir Bras.* 2012 Jul;27(7):454-9.
- Norton PA. Pelvic floor disorders: the role of fascia and ligaments. *Clin Obstet Gynecol.* 1993 Dec;36(4):926-38.
- Oliveira CC, Teodoro WR, Velosa AP, Yoshinari NH. Auto-imunidade e colágeno V. *Rev Bras Reumatol.* 2006;46(3):194-8.
- Oliveira DF, Gonçalves LF, Cláudio-da-Silva CS, Porchat CA, Franco T. Pneumoperitônio progressivo no pré-operatório de hérnias incisionais volumosas. *Rev Col Bras Cir.* 2003;30(4):297-301.
- Orpheu SC, Coltro PS, Scopel GP, Gomez DS, Rodrigues CJ, Modolin ML, et al. Collagen and elastic content of abdominal skin after surgical weight loss. *Obes Surg.* 2010 Apr;20(4):480-6.
- Pans A, Piérard GE, Albert A. Immunohistochemical study of the rectus sheath and transversalis fascia in adult groin hernias. *Hernia.* 1999;3(2):45-51.
- Pans A, Albert A, Lapiere CM, Nussgens B. Biochemical study of collagen in adult groin hernias. *J Surg Res.* 2001 Feb;95(2):107-13.
- Ponten JE, Somers KY, Nienhuijs SW. Pathogenesis of the epigastric hernia. *Hernia.* 2012 Dec;16(6):627-33.
- Ramos FZ, Signore FL, Ribas-Filho JM, Thiele ES, Dobrowolski S, Salles GS, Jr., et al. Perfil epidemiológico de pacientes com hérnia incisional. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2007;20(4):230-3.
- Read RC. Herniology: past, present, and future. *Hernia.* 2009 Dec;13(6):577-80.

Rodrigues Junior AJ, Rodrigues CJ, da Cunha AC, Jin Y. Quantitative analysis of collagen and elastic fibers in the transversalis fascia in direct and indirect inguinal hernia. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002 Nov-Dec;57(6):265-70.

Rosenfield DB, Miller RH, Sessions RB, Patten BM. Morphologic and histochemical characteristics of laryngeal muscle. *Arch Otolaryngol*. 1982 Oct;108(10):662-6.

Sahm M, Kube R, Rose J, Kubo G, Pross M, Lippert H. Rectusbanding: a method for the repair of incisional hernias. *Hernia*. 2009 Oct;13(5):481-6.

Schumpelick V. Special issue: collagen. *Hernia*. 2006;10(6):453-.

Siegel S, Castelani JR. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Silva FH, Ferreira LM, Nahas FX, Barbosa MV, Calvi EN, Lurk LK. Imuno-histoquímica do colágeno do músculo reto do abdome. *Rev Bras Cir Plást*. 2012;27(Supl):3.

Silva WW, Watanabe WT, Cruz AN, Bonvent JJ, Bissaco MA. Quantificação e classificação automática de fibras colágenas tipos I e III. 21th Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica; 2008 Nov 16-20; Salvador, BA. São Paulo: Sociedade Brasileira de Informatica em Saúde; 2008. p. 1535-8. Disponível em: <http://www.sbis.org.br/cbis11/arquivos/765.pdf>.

Silveira RA, Nahas FX, Hochman B, Bazzano FC, Amorim CR, Juliano Y, et al. Mapping traction strength of the anterior rectus sheath in cadaver. *Acta Cir Bras*. 2010 Aug;25(4):347-9.

Silveira RA, Nahas FX, Hochman B, Bazzano FC, Amorim CR, Ferreira LM. Cadaver as an experimental a model for the study of midline incisional hernia. *Acta Cir Bras*. 2011 Aug;26(4):310-3.

Speranzini MB, Deutsch CR. Grandes hérnias incisionais. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)*. 2010;23(4):280-6.

Szczesny W, Cerkaska K, Tretyn A, Dabrowiecki S. Etiology of inguinal hernia: ultrastructure of rectus sheath revisited. *Hernia*. 2006 Jun;10(3):266-71.

Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000 Dec;10(6):321-5.

Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol*. 2002 Jun;65(2):109-26.

Vaz M, Krebs RK, Trindade EN, Trindade MR. Fibroplasia after polypropylene mesh implantation for abdominal wall hernia repair in rats. *Acta Cir Bras*. 2009 Jan-Feb;24(1):19-25.

Wolwacz Júnior I, Trindade MRM, Cerski CT. O colágeno em fáscia transversal de pacientes com hérnia inguinal direta submetidos à videolaparoscopia. *Acta Cir Bras*. 2003;18(3):196-202.

Zar JH. *Bioestatistical analysis*. Englewood: Prentice-Hall, INC; 1997.

## **NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MV, Ely PB. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [Internet]. Vancouver (CA); 2007 Oct [cited 2013 Jul 18]. Available from: <http://www.icmje.org/>

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001.



## **ABSTRACT**

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The most frequent abdominal wall defects are represented by hernias. The collagen is an important fascia and muscle component that provides structural strength in tissues. **PURPOSE:** Evaluate the collagen fibers of abdominal rectus muscle in cadavers of different age groups. **METHODS:** Forty fresh male cadavers from the Institute of Legal Medicine of Franca were dissected within 24 hours of death. The cadavers were divided in two groups: Group 1 (n = 20) - 18 to 30 years old; Group 2 (n = 20) - 31 to 60 years old. Umbilicus was used as anatomical reference. The incisions were made in the middle portion of anterior rectus muscle 3 cm superiorly and 2 cm inferiorly to the umbilicus. Histological sections were performed with *Masson's* trichrome, *Picro Sirius red* and immunohistochemistry analysis. **RESULTS:** The *Masson's* trichrome didn't present significant difference among Group 1 and 2. However, the *Picro Sirius red* (collagen I + III), showed higher collagen amount in Group 1 than in Group 2 ( $p < 0,05$ ); the immunohistochemistry did not show type II collagen and there was no difference in the amount of type IV collagen between the groups. The type I and III collagen presented significant reduction in Group 2 in comparison to Group 1 ( $p < 0,05$ ). The type V collagen was identified in the immunohistochemistry, but there was not possible to identify due to background color of reaction. **CONCLUSION:** There is reduction in type I and III collagen in the higher age group and there were no variations in amount of type IV collagen.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**1 - Título do projeto: FIBRAS DE COLÁGENO DO MÚSCULO RETO DO ABDOME EM CADÁVERES**

**2 - Desenho do estudo e objetivo:** Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária de cadáver neste estudo, visando avaliar as fibras de colágeno do músculo reto abdominal em cadáveres em diferentes faixas etárias.

**3- Descrição dos procedimentos:** Será retirado um fragmento de forma quadrada de 1cm<sup>2</sup> de cada lado de cada músculo reto abdominal em dois níveis: 3cm superior e 2cm inferior à cicatriz umbilical.

**4- Relação dos procedimentos rotineiros:** Esse material será conservado e enviado para exame histológico com coloração HE, Picro Sirius, Masson e Imuno-histoquímica.

**5- Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos: nenhum.**

**6 - Benefícios para o cadáver ou representante:** Não há benefício direto.

**7 - Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, o representante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Eliziane Nitz de Carvalho Calvi, que pode ser encontrado no endereço Rua Napoleão de Barros, n 715, 4 andar. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp.

**8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento** a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo

**9 - Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação.

**10 - Direito de ser mantido atualizado** sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

**11 - Despesas e compensações:** não há despesas pessoais, incluindo exames. Também não há compensação financeira relacionada à participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

**12 - Compromisso do pesquisador** de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” **FIBRAS DE COLÁGENO DO MÚSCULO RETO DO ABDOME EM CADÁVERES**”.

Eu discuti com o professor sobre a minha decisão de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do cadáver é isenta de despesas. Autorizo voluntariamente \_\_\_\_\_ participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do representante legal

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## APÊNDICE 2

**Tabela 7. Quantidade de colágeno tipo I do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 – Masson. Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação dos lados direito e esquerdo, supra e infraumbilical intragrupos. Teste de Wilcoxon**

	GRUPO 1				GRUPO 2			
	Supra umbilical		Infra umbilical		Supra umbilical		Infra umbilical	
	D	E	D	E	D	E	D	E
	1,68	0,70	1,01	1,00	2,79	1,66	1,50	2,08
	1,92	5,63	2,26	2,09	2,79	1,95	1,58	1,77
	0,80	1,02	5,02	3,00	1,40	0,95	0,68	1,81
	1,50	2,55	4,50	2,61	2,94	1,65	2,20	1,63
	0,49	0,69	0,63	1,18	1,68	1,05	2,32	1,93
	0,35	0,96	0,75	0,47	2,63	1,73	1,55	4,38
	1,12	1,92	2,36	1,72	1,40	1,88	1,98	1,91
	0,91	1,58	1,47	1,51	0,43	1,76	1,99	1,78
	1,18	1,23	1,94	1,15	2,90	2,62	1,71	3,17
	1,55	3,06	1,09	1,58	0,39	0,70	0,30	0,38
	2,77	0,19	0,80	0,99	0,16	0,89	0,22	0,46
	2,23	0,92	0,49	2,59	0,86	0,36	0,75	0,51
	0,55	1,03	2,99	1,76	0,07	0,35	0,11	0,26
	1,46	1,19	1,55	1,19	0,29	0,11	0,49	0,23
	2,02	1,14	0,53	1,13	0,09	0,23	0,25	0,49
	1,24	0,50	1,01	1,59	0,06	0,35	0,22	0,20
	0,27	0,28	0,53	0,02	0,23	0,24	2,14	1,81
	0,16	0,31	0,26	0,15	1,55	0,72	1,32	1,35
	1,00	0,13	0,16	0,22	0,77	1,62	0,93	1,36
	0,41	0,01	0,65	1,17	0,32	0,27	0,09	0,47
<b>Média</b>	<b>1,18</b>	<b>1,25</b>	<b>1,50</b>	<b>1,36</b>	<b>1,19</b>	<b>1,05</b>	<b>1,12</b>	<b>1,40</b>
<b>Mediana</b>	<b>1,15</b>	<b>0,99</b>	<b>1,01</b>	<b>1,19</b>	<b>0,82</b>	<b>0,92</b>	<b>1,13</b>	<b>1,50</b>
	z= 0,07		z= 0,28		z= 1,26		z= 1,05	
	p= 0,93		p= 0,77		p= 0,20		p= 0,29	

Teste de Wilcoxon - D x E - Diferença está significativa para  $p < 0,05$

Uma vez que a comparação D x E não mostrou diferença significativa, juntamos D + E para a comparação do G1 x G2

<u>Supraumbilical</u>		<u>Infraumbilical</u>	
G1	G2	G1	G2
X= 1,22	X= 1,12	X= 1,43	X= 1,26
N= 40	N= 40	N= 40	N= 40

Teste de Mann-Whitney

z= 0,71

p= 0,47

z= 0,98

p= 0,32

**Tabela 8. Quantificação do colágeno tipo I do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2– *Masson*. Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação do grupo 1 com o grupo 2. Teste de Mann-Whitney**

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Supra	Infra	Supra	Infra
	1,68	1,01	2,79	1,50
	1,92	2,26	2,79	1,58
	0,80	5,02	1,40	0,68
	1,50	4,50	2,94	2,20
	0,49	0,63	1,68	2,32
	0,35	0,75	2,63	1,55
	1,12	2,36	1,40	1,98
	0,91	1,47	0,43	1,99
	1,18	1,94	2,90	1,71
	1,55	1,09	0,39	0,30
	2,77	0,80	0,16	0,22
	2,23	0,49	0,86	0,75
	0,55	2,99	0,07	0,11
	1,46	1,55	0,29	0,49
	2,02	0,53	0,09	0,25
	1,24	1,01	0,06	0,22
	0,27	0,53	0,23	2,14
	0,16	0,26	1,55	1,32
	1,00	0,16	0,77	0,93
	0,41	0,65	0,32	0,09
	0,70	1,00	1,66	2,08
	5,63	2,09	1,95	1,77
	1,02	3,00	0,95	1,81
	2,55	2,61	1,65	1,63
	0,69	1,18	1,05	1,93
	0,96	0,47	1,73	4,38
	1,92	1,72	1,88	1,91
	1,58	1,51	1,76	1,78
	1,23	1,15	2,62	3,17
	3,06	1,58	0,70	0,38
	0,19	0,99	0,89	0,46
	0,92	2,59	0,36	0,51
	1,03	1,76	0,35	0,26
	1,19	1,19	0,11	0,23
	1,14	1,13	0,23	0,49
	0,50	1,59	0,35	0,20
	0,28	0,02	0,24	1,81
	0,31	0,15	0,72	1,35
	0,13	0,22	1,62	1,36
	0,01	1,17	0,27	0,47
<b>Média</b>	<b>1,22</b>	<b>1,43</b>	<b>1,12</b>	<b>1,26</b>
<b>Mediana</b>	<b>1,03</b>	<b>1,16</b>	<b>0,88</b>	<b>1,36</b>

Teste de Mann-Whitney - Diferença está significativa para  $p < 0,05$  (grupo 1 x grupo 2)

<u>Supraumbilical</u>	<u>Infraumbilical</u>
$z = 0,71$	$z = 0,98$
( $p = 0,4764$ )	( $p = 0,3263$ )



**Tabela 9. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 corados por *Picro Sirius red*. Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação dos lados direito e esquerdo, supra e infraumbilical intragrupos. Teste de Wilcoxon**

	GRUPO 1				GRUPO 2			
	Supra umbilical		Infra umbilical		Supra umbilical		Infra umbilical	
	D	E	D	E	D	E	D	E
	0,54	0,76	1,39	0,61	0,38	0,20	2,33	0,21
	1,09	1,39	1,33	1,54	1,02	0,81	0,84	1,05
	1,64	2,00	1,04	1,88	0,14	0,14	0,15	0,30
	1,31	1,55	1,17	1,16	0,43	0,51	0,62	0,31
	1,03	1,26	1,96	1,73	0,23	0,19	0,35	0,63
	0,87	1,05	1,08	1,58	0,15	0,46	0,31	0,11
	1,26	1,48	1,20	1,37	0,88	1,01	1,15	0,97
	1,03	1,15	1,02	1,06	0,38	0,30	0,57	0,14
	0,88	0,96	1,00	1,10	0,89	1,50	0,42	0,93
	0,88	0,96	1,00	1,10	1,30	0,95	1,19	1,18
	1,36	0,90	0,69	1,15	0,93	0,85	0,75	0,83
	1,21	1,22	1,25	1,09	0,87	0,86	0,63	0,46
	0,84	0,89	0,89	0,93	0,54	0,62	0,97	0,56
	0,99	0,97	0,92	0,78	0,43	0,35	0,26	0,32
	0,87	0,88	0,83	0,96	0,41	0,44	0,43	0,23
	1,12	0,52	1,28	0,87	0,28	0,22	0,30	0,23
	1,08	0,54	0,64	0,58	0,17	0,32	0,34	0,36
	1,13	1,81	1,03	1,06	0,37	0,27	0,35	0,32
	1,02	1,01	0,97	0,87	0,94	1,06	0,73	0,87
	0,74	0,73	0,91	0,69	0,24	0,33	0,40	0,39
<b>Média</b>	<b>1,04</b>	<b>1,10</b>	<b>1,08</b>	<b>1,11</b>	<b>0,55</b>	<b>0,57</b>	<b>0,65</b>	<b>0,52</b>
<b>Mediana</b>	<b>1,03</b>	<b>0,99</b>	<b>1,03</b>	<b>1,08</b>	<b>0,42</b>	<b>0,45</b>	<b>0,50</b>	<b>0,38</b>
	z= 0,40		z= 0,53		z= 0,40		z= 0,80	
	p= 0,68		p= 0,59		p= 0,68		p= 0,42	

Teste de Wilcoxon\*

D x E

Diferença está significante para  $< 0,05$

Uma vez que a comparação D x E não mostrou diferença significante, juntamos D + E para a comparação do G1 x G2

<u>Supraumbilical</u>		<u>Infraumbilical</u>	
G1	G2	G1	G2
X= 1,07	X= 0,56	X= 1,09	X= 0,59
N= 40	N= 40	N= 40	N= 40

Teste de Mann-Whitney\*

z= 32,95

p= 0,001\*

z= 37,28

p= 0,0002\*

**Tabela 10. Quantificação do colágeno tipo I e III do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 – *Picro Sirius red*. Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação do grupo 1 com o grupo 2. Teste de Mann-Whitney**

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Supra	Infra	Supra	Infra
	0,54	1,39	0,38	2,33
	1,09	1,33	1,02	0,84
	1,64	1,04	0,14	0,15
	1,31	1,17	0,43	0,62
	1,03	1,96	0,23	0,35
	0,87	1,08	0,15	0,31
	1,26	1,20	0,88	1,15
	1,03	1,02	0,38	0,57
	0,88	1,00	0,89	0,42
	0,88	1,00	1,30	1,19
	1,36	0,69	0,93	0,75
	1,21	1,25	0,87	0,63
	0,84	0,89	0,54	0,97
	0,99	0,92	0,43	0,26
	0,87	0,83	0,41	0,43
	1,12	1,28	0,28	0,30
	1,08	0,64	0,17	0,34
	1,13	1,03	0,37	0,35
	1,02	0,97	0,94	0,73
	0,74	0,91	0,24	0,40
	0,76	0,61	0,20	0,21
	1,39	1,54	0,81	1,05
	2,00	1,88	0,14	0,30
	1,55	1,16	0,51	0,31
	1,26	1,73	0,19	0,63
	1,05	1,58	0,46	0,11
	1,48	1,37	1,01	0,97
	1,15	1,06	0,30	0,14
	0,96	1,10	1,50	0,93
	0,96	1,10	0,95	1,18
	0,90	1,15	0,85	0,83
	1,22	1,09	0,86	0,46
	0,89	0,93	0,62	0,56
	0,97	0,78	0,35	0,32
	0,88	0,96	0,44	0,23
	0,52	0,87	0,22	0,23
	0,54	0,58	0,32	0,36
	1,81	1,06	0,27	0,32
	1,01	0,87	1,06	0,87
	0,73	0,69	0,33	0,39
<b>Média</b>	<b>1,07</b>	<b>1,09</b>	<b>0,56</b>	<b>0,59</b>
<b>Mediana</b>	<b>1,03</b>	<b>1,05</b>	<b>0,43</b>	<b>0,43</b>

Teste de Mann-Whitney\* - Diferença está significativa para  $p < 0,05$  (grupo 1 x grupo 2)

Supraumbilical

$z = 3,30$

( $p = 0,001^*$ )

grupo 1 > grupo 2

Infraumbilical

$z = 3,73$

( $p = 0,0002^*$ )

grupo 1 > grupo 2

**Tabela 11. Avaliação qualitativa de colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome nos Grupo 1 e Grupo 2 – Imuno-histoquímica.**

Caso	Colágeno I		Colágeno III		Colágeno IV	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
1	3	1	3	1	3	2
2	3	1	3	1	2	1
3	1	1	3	1	1	2
4	3	2	3	1	3	2
5	3	1	3	1	1	3
6	3	1	3	1	3	2
7	3	2	3	2	3	2
8	3	2	3	2	3	3
9	3	1	3	1	2	2
10	2	1	2	2	2	3
<b>Média</b>	<b>2,7</b>	<b>1,3</b>	<b>2,9</b>	<b>1,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,2</b>
<b>Mediana</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>2</b>

0 - ausência de colágeno; 1 - pouca ocorrência; 2 média ocorrência; 3-grande ocorrência.

Teste de Mann-Whitney\*.- Diferença está significativa para  $p < 0,05^*$

**Tabela 12. Quantificação do colágeno tipo I, III e IV do músculo reto do abdome nos grupos 1 e grupo 2 – Imuno-histoquímica. Os resultados estão expressos em % de colágeno. Comparação do grupo 1 com o grupo 2. (n= 20). Teste de Mann-Whitney**

Caso	Colágeno I		Colágeno III		Colágeno IV	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
1	0,94	0,40	0,54	0,28	3,61	2,14
2	0,30	0,21	0,43	0,01	1,12	1,38
3	2,24	1,26	2,60	0,62	3,02	1,84
4	0,77	0,29	0,78	0,83	0,58	2,70
5	1,12	0,19	0,84	0,57	0,40	2,44
6	1,17	0,39	0,60	0,17	2,47	1,55
7	2,42	1,17	1,22	0,60	1,71	2,47
8	3,79	1,26	1,00	0,78	0,80	4,19
9	0,39	0,45	1,32	0,26	4,44	0,52
10	0,25	1,58	0,59	1,86	0,34	2,99
<b>Média</b>	<b>1,34</b>	<b>0,72</b>	<b>0,99</b>	<b>0,60</b>	<b>1,85</b>	<b>2,22</b>
<b>Mediana</b>	<b>1,03</b>	<b>0,43</b>	<b>0,81</b>	<b>0,59</b>	<b>1,42</b>	<b>2,29</b>
	$\chi^2 = 13,50$ (p= 0,0012*)		$\chi^2 = 17,00$ (p= 0,0002*)		$\chi^2 = 1,83$ (p= 0,3998)	

Teste de Mann-Whitney - Diferença está significativa para  $p < 0,05^*$ .

### APÊNDICE 3

**Tabela 13. Lâminas Histológicas**

CASOS	Lâmina	IDADE	ALTURA	PESO
1	ID 264 IE 265 SD 266 SE 267	28	1,60	80
2	ID 346 IE 347 SD 348 SE 349	23	1,75	70
3	ID 350 IE 351 SD 352 SE 353	18	1,70	60
4	ID 354 IE 355 SD 356 SE 357	25	1,75	72
5	ID 358 IE 359 SD 360 SE 361	58	1,70	70
6	ID 362 IE 363 SD 364 SE 364	32	1,70	80
7	ID 366 IE 367 SD 368 SE 369	60	1,75	82
8	ID 584 IE 585 SD 586 SE 587	41	1,65	70

<b>CASOS</b>	<b>Lâmina</b>	<b>IDADE</b>	<b>ALTURA</b>	<b>PESO</b>
9	ID 588 IE 589 SD 590 SE 591	18	1,80	75
10	ID 592 IE 593 SD 594 SE 595	35	1,80	82
11	ID 596 IE 597 SD 598 SE 599	33	1,65	73
12	ID 600 IE 601 SD 602 SE 603	32	1,70	76
13	ID 604 IE 605 SD 606 SE 607	50	1,70	68
14	ID 608 IE 609 SD 610 SE 611	59	1,65	59
15	ID 780 IE 781 SD 778 SE 779	32	1,85	80
16	ID 784 IE 785 SD 782 SE 783	60	1,70	65
17	ID 788 IE 789 SD 786 SE 787	33	1,75	72

<b>CASOS</b>	<b>Lâmina</b>	<b>IDADE</b>	<b>ALTURA</b>	<b>PESO</b>
18	ID 843 IE 844 SD 841 SE 842	29	1,88	95
19	ID 847 IE 848 SD 845 SE 846	52	1,70	85
20	ID 868 IE 869 SD 866 SE 867	60	1,65	55
21	ID 872 IE 873 SD 870 SE 871	52	1,77	85
22	ID 876 IE 877 SD 874 SE 875	36	1,65	85
23	ID 880 IE 881 SD 878 SE 879	60	1,75	75
24	ID 884 IE 885 SD 882 SE 883	37	1,83	78
25	ID 888 IE 889 SD 886 SE 887	45	1,65	60
26	ID 892 IE 893 SD 890 SE 891	18	1,72	55

<b>CASOS</b>	<b>Lâmina</b>	<b>IDADE</b>	<b>ALTURA</b>	<b>PESO</b>
27	ID 896 IE 897 SD 894 SE 895	20	1,75	70
28	ID 900 IE 901 SD 898 SE 899	24	1,75	63
29	ID 904 IE 905 SD 902 SE 903	25	1,80	83
30	ID 936 IE 935 SD 932 SE 933	21	1,60	70
31	ID 938 IE 939 SD 936 SE 937	25	1,90	80
32	ID 942 IE 943 SD 940 SE 941	21	1,70	83
33	ID 946 IE 947 SD 944 SE 945	29	1,72	85
34	ID 950 IE 951 SD 948 SE 949	58	1,65	85
35	ID 954 IE 955 SD 952 SE 953	20	1,70	90



---

<b>CASOS</b>	<b>Lâmina</b>	<b>IDADE</b>	<b>ALTURA</b>	<b>PESO</b>
36	ID 996 IE 997 SD 998 SE 999	27	1,70	70
37	ID 1000 IE 1001 SD 1002 SE 1003	20	1,70	80
38	ID 1004 IE 1005 SD 1006 SE 1007	24	1,82	87
39	ID 1008 IE 1009 SD 1010 SE 1011	25	1,75	80
40	ID 1012 IE 1013 SD 1014 SE 1015	29	1,75	70

---

## APÊNDICE 4

### PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

#### 1. FIXAÇÃO:

A fixação é a operação destinada a matar as células, ao mesmo tempo, a conservar, dentro do possível, a forma e a estrutura que tinham durante a vida. Fixadores são substâncias químicas que mantêm a integridade do tecido após a morte, evitando ao máximo possível alterações da constituição química celular, fixar proteínas e inativar enzimas proteolíticas, o mais rapidamente possível, pois são as responsáveis pelos fenômenos de autólise.

O tempo de fixação depende do fixador e da temperatura em que se encontra para uma adequada fixação é necessário que o volume do fixador seja, pelo menos, 30 vezes maior que o volume de tecido nele mergulhado. O formol é o aldeído fórmico, corpo gasoso, em solução aquosa a 40%. é um líquido cristalino e incolor que liberta vapores irritantes, é o fixador mais usado e indicado sobretudo para peças de grandes volumes e para material proveniente de necropsias, requerendo pelo menos 12 horas para exercer sua atividade.

#### 2. DESIDRATAÇÃO:

Processo de retirada da água do interior da célula, pois os tecidos contém cerca de 85% de líquido, ou seja, água, que fica neles retida, mesmo depois da fixação, não sendo miscíveis em parafina, a desidratação é feita pelo álcool etílico.

### **3. DIAFANIZAÇÃO:**

É a operação pela qual o álcool da peça é substituído por um dissolvente da parafina. Essas substâncias são representadas, em geral, pelo Xilol, Benzol e Toluol, que têm a propriedade de dissolver perfeitamente a parafina, além da capacidade de eliminar o álcool retido nas peças.

### **4. PENETRAÇÃO OU IMPREGNAÇÃO DA PARAFINA**

Após o procedimento da diafanização do tecido com Xilol ou Benzol, até que ela se torne clara, o tecido estará pronto para a operação seguinte. Para penetração da parafina em todos os interstícios de tecido é necessário que esta deve estar aquecida em estufas reguladas um pouco acima de sua temperatura de fusão, isto é, entre 58° - 60°C.

### **5. INCLUSÃO, MOLDAGEM OU FORMAÇÃO DO BLOCO:**

Depois de impregnadas, as peças precisam ser incluídas num bloco de parafina solidificado. Em geral, são constituídas caixinhas de papel, o tecido é retirado do banho de parafina e depositado no fundo da caixinha. A orientação e posição do tecido colocado no fundo da caixinha têm grande importância, porque conforme sua posição serão os cortes orientados ao micrótomo. A seguir procede-se a moldagem e o prepara para microtomia.

### **PREPARO DAS PEÇAS PARA INCLUSÃO EM PARAFINA**

Os tecidos contém água, e a parafina é o produto derivado dos resíduos da destilação do petróleo. É insolúvel na água e praticamente no álcool, mas bem solúvel nos derivados do petróleo (Xilol, Benzol, Toluol).

É preciso, portanto, passar as peças por uma série de operações prévias relacionadas com as propriedades da parafina.

As peças para serem incluídas em parafina sofrem as seguintes operações:

- 1. Desidratação**
- 2. Diafanização**
- 3. Penetração ou Impregnação da Parafina**
- 4. Inclusão, Moldagem ou Formação do Bloco.**

## **ETAPAS DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO**

### **1. FIXAÇÃO**

Formol tamponado a 10% - 24 horas

### **2. DESIDRATAÇÃO**

Álcool Absoluto 4x - 10'

### **3. DIAFANIZAÇÃO**

Xilol 4x - 10'

### **4. PENETRAÇÃO OU IMPREGNAÇÃO DA PARAFINA**

Parafina aquecida (58-60°C) <sup>(2x)</sup> -45'

### **5. INCLUSÃO, MOLDAGEM OU FORMAÇÃO DO BLOCO**

Parafina aquecida (58 - 60°C) depositada em caixinha de papel com o tecido posicionado para microtomia.

## HEMATOXILINA

Hematoxilina .....	5g
Álcool Absoluto .....	50ml
Alúmem de Potássio .....	100g
Água destilada .....	1000ml
Óxido Vermelho de Mercúrio .....	2,5g

### Preparo:

Dissolver a Hematoxilina no álcool absoluto e o Alumem na água destilada à quente até a dissolução total do sal.

Deixar em repouso 24 horas.

Misturar as duas soluções e acrescentar o óxido vermelho de mercúrio.

Levar ao fogo e deixar ferver por 5 minutos.

Pronto para uso após 24 horas.

## EOSINA

Eosina amarelada hidrossolúvel .....	1g
Água destilada .....	20ml
Álcool 95° gl. ....	180ml

### Preparo:

Dissolver a eosina na água destilada e acrescentar o álcool

Diferenciador - álcool - ácido

Álcool 70° gl .....	100ml
---------------------	-------

Ácido clorídrico (HCL) .....	20 gotas
------------------------------	----------

## TÉCNICA DE COLORAÇÃO

### Hematoxilina - Eosina

1. Desparafinar e hidratar
2. Água corrente
3. Hematoxilina ..... 2'
4. Água corrente ..... 2'
5. Diferenciador (álcool - ácido)..... 2X (rápida imersão)
6. Água corrente ..... 5'
7. Eosina ..... 2'
8. Álcool absoluto ..... 3X (banho rápido)
9. Xilol ..... 3X

Montagem

### PICRO SIRIUS ( colágeno)

- Solução saturada de Ácido Pítrico
- + Solução aquosa saturada ..... 100,0 ml
- Picro Sirius ..... 0,1 g

Obs.: Solução saturada de Ácido Pítrico, a quantidade de soluto maior que a densidade do solvente, ocorrendo a precipitação do soluto no fundo (acima de 2/100).

1. Desparafinar e Desidratar
2. Água corrente 3'
3. Solução saturada Ácido Picrico – 15'
4. Picro Sirius 20'

5. Solução saturada Ácido Picrico – 10'
6. Desidratar, diafanizar e montar

#### **Formol tamponado**

Formol puro 40%	100 ml
Água destilada	900 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5g

### **TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA**

- 1 Cortes 3 µm e pescados em lâminas silanizadas
- 2 Desparafinização à quente - xilol 30 min.
- 3 Desparafinização à frio - xilol 30 min
- 4 Desidratação álcoois absolutos 3x
- 5 Hidratação dos cortes  
água corrente - 5 min.  
água destilada - 5 min.
- 6 Bloqueio da peroxidase endógena  
Peróxido de hidrogênio - 130 vol.  
27,0 ml + 73,0 ml de água destilada - 2x - 9 min.
- 7 Passagens em:  
água corrente - 5 min.  
água destilada - 2x - 5 min.  
tampão PBS 74 - 2x - 5 min.
- 8 Incubação com anticorpo primário - 18 horas em geladeira à 4°  
C  
Diluir anticorpos em BSA 1%

- RAM 11 (macrófago) - 1/200  
SMA( actina musc. liso) - 1/200
- 9 Passagens em PBS - 3x - 5 min.
  - 10 Incubação com anticorpo secundário 30 min - estufa 37° C  
Goat anti-mouse biotinilado - 1/200
  - 11 Passagens em PBS - 3x - 5 min
  - 12 Incubação com o Complexo Avidina-Biotina-peroxidase ABC  
—  
30 min - estufa 37°C  
k377A/B 1/100 preparar 30 min antes
  - 13 Passagens em PBS 3x - 5 min
  - 14 Revelação da Peroxidase com Substrato Cromógeno  
60 mg DAB + 100 ml PBS + 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. -.  
5 min
  - 15 Passagem em água corrente - 5 min.
  - 16 Contra coloração de fundo com hematoxilina de Harris - 1,30 min
  - 17 Passagem em água corrente - 2 min.
  - 18 Diferenciação em água amoniacal a 2% - 2x
  - 19 Passagem em água corrente - 5 min.
  - 20 Desidratação em álcoois absolutos, diafanização em xilol emontagem em Entellan



## APÊNDICE 5

Tabela 14. Porcentagem de colágeno pelo programa *ImageTool*

Lâmina	Observação	Negro	Branco	% Negro	Branco %
		Black Count	White Count	Black %	White %
346	Mean	3103950,1	41777,9	98,67	1,33
346	Std. Dev.	17316,74	17316,74	0,55	0,55
346	A	3080479	65249	97,93	2,07
346	B	3121190	24538	99,22	0,78
346	C	3123751	21977	99,30	0,70
346	D	3116575	29153	99,07	0,93
346	E	3102440	43288	98,62	1,38
346	F	3087412	58316	98,15	1,85
346	G	3105181	40547	98,71	1,29
346	H	3113151	32577	98,96	1,04
346	I	3075107	70621	97,76	2,24
346	J	3114215	31513	99,00	1,00
347		Black Count	White Count	Black %	White %
347	Mean	3097330,3	48397,7	98,46	1,54
347	Std. Dev.	26355,22	26355,22	0,84	0,84
347	A	3077458	68270	97,83	2,17
347	B	3031220	114508	96,36	3,64
347	C	3096273	49455	98,43	1,57
347	D	3118825	26903	99,14	0,86
347	E	3111050	34678	98,9	1,1
347	F	3115533	30195	99,04	0,96
347	G	3106197	39531	98,74	1,26
347	H	3110304	35424	98,87	1,13
347	I	3112887	32841	98,96	1,04
347	J	3093556	52172	98,34	1,66
348		Black Count	White Count	Black %	White %
348	Mean	3111341,5	34386,5	98,91	1,09
348	Std. Dev.	30945,58	30945,58	0,98	0,98
348	A	3041045	104683	96,67	3,33

348 B	3142684	3044	99,9	0,1
348 C	3075039	70689	97,75	2,25
348 D	3126459	19269	99,39	0,61
348 E	3126459	19269	99,39	0,61
348 F	3135565	10163	99,68	0,32
348 G	3125604	20124	99,36	0,64
348 H	3113459	32269	98,97	1,03
348 I	3105957	39771	98,74	1,26
348 J	3121144	24584	99,22	0,78
<hr/>				
349	Black Count	White Count	Black %	White %
<hr/>				
349 Mean	3102167,8	43560,2	98,62	1,39
349 Std. Dev.	15845,25	15845,25	0,5	0,5
349 A	3108332	37396	98,81	1,19
349 B	3135803	9925	99,68	0,32
349 C	3119729	25999	99,17	0,83
349 D	3089031	56697	98,2	1,8
349 E	3105750	39978	98,73	1,27
349 F	3097473	48255	98,47	1,53
349 G	3083714	62014	98,03	1,97
349 H	3090635	55093	98,25	1,75
349 I	3092885	52843	98,32	1,68
349 J	3098326	47402	98,49	1,51
<hr/>				
354	Black Count	White Count	Black %	White %
<hr/>				
354 Mean	3109029,9	36698,1	98,83	1,17
354 Std. Dev.	15166,99	15166,99	0,48	0,48
354 A	3106060	39668	98,74	1,26
354 B	3101002	44726	98,58	1,42
354 C	3079562	66166	97,9	2,1
354 D	3117064	28664	99,09	0,91
354 E	3117948	27780	99,12	0,88
354 F	3123285	22443	99,29	0,71
354 G	3131599	14129	99,55	0,45
354 H	3092888	52840	98,32	1,68
354 I	3112381	33347	98,94	1,06
354 J	3108510	37218	98,82	1,18
<hr/>				
355	Black Count	White Count	Black %	White %
<hr/>				

355 Mean	3109168,3	36559,7	98,84	1,16
355 Std. Dev.	16421,36	16421,36	0,52	0,52
355 A	3076115	69613	97,79	2,21
355 B	3085296	60432	98,08	1,92
355 C	3106789	38939	98,76	1,24
355 D	3111974	33754	98,93	1,07
355 E	3122391	23337	99,26	0,74
355 F	3118931	26797	99,15	0,85
355 G	3106646	39082	98,76	1,24
355 H	3116537	29191	99,07	0,93
355 I	3125657	20071	99,36	0,64
355 J	3121347	24381	99,22	0,78

356	Black Count	White Count	Black %	White %
356 Mean	3104493	41235	98,69	1,31
356 Std. Dev.	16387,82	16387,82	0,52	0,52
356 A	3096209	49519	98,43	1,57
356 B	3103295	42433	98,65	1,35
356 C	3114146	31582	99	1
356 D	3126968	18760	99,4	0,6
356 E	3127074	18654	99,41	0,59
356 F	3090404	55324	98,24	1,76
356 G	3116369	29359	99,07	0,93
356 H	3092128	53600	98,3	1,7
356 I	3100930	44798	98,58	1,42
356 J	3077407	68321	97,83	2,17

357	Black Count	White Count	Black %	White %
357 Mean	3096954	48774	98,45	1,55
357 Std. Dev.	19892,24	19892,24	0,63	0,63
357 A	3076482	69246	97,8	2,2
357 B	3116770	28958	99,08	0,92
357 C	3113944	31784	98,99	1,01
357 D	3086655	59073	98,12	1,88
357 E	3069178	76550	97,57	2,43
357 F	3130571	15157	99,52	0,48
357 G	3080742	64986	97,93	2,07
357 H	3087856	57872	98,16	1,84
357 I	3106617	39111	98,76	1,24

357 J	3100725	45003	98,57	1,43
592	Black Count	White Count	Black %	White %
592 Mean	3134815,2	10912,8	99,65	0,35
592 Std. Dev.	9950,47	9950,47	0,32	0,32
592 A	3135386	10342	99,67	0,33
592 B	3137443	8285	99,74	0,26
592 C	3133145	12583	99,6	0,4
592 D	3137933	7795	99,75	0,25
592 E	3138579	7149	99,77	0,23
592 F	3132532	13196	99,58	0,42
592 G	3108666	37062	98,82	1,18
592 H	3144957	771	99,98	0,02
592 I	3136880	8848	99,72	0,28
592 J	3142631	3097	99,9	0,1
593	Black Count	White Count	Black %	White %
593 Mean	3125742,7	19985,3	99,37	0,63
593 Std. Dev.	14759,01	14759,01	0,47	0,47
593 A	3134286	11442	99,64	0,36
593 B	3132169	13559	99,57	0,43
593 C	3138067	7661	99,76	0,24
593 D	3117339	28389	99,1	0,9
593 E	3105810	39918	98,73	1,27
593 F	3097658	48070	98,47	1,53
593 G	3140045	5683	99,82	0,18
593 H	3138143	7585	99,76	0,24
593 I	3133133	12595	99,6	0,4
593 J	3120777	24951	99,21	0,79
594	Black Count	White Count	Black %	White %
594 Mean	3138456,4	7271,6	99,77	0,23
594 Std. Dev.	3383,98	3383,98	0,11	0,11
594 A	3132671	13057	99,58	0,42
594 B	3134616	11112	99,65	0,35
594 C	3141310	4418	99,86	0,14
594 D	3139113	6615	99,79	0,21
594 E	3143050	2678	99,91	0,09
594 F	3138456	7272	99,77	0,23

594 G	3139191	6537	99,79	0,21
594 H	3135854	9874	99,69	0,31
594 I	3137691	8037	99,74	0,26
594 J	3142612	3116	99,9	0,1

---

595	Black Count	White Count	Black %	White %
595 Mean	3139714,4	6013,6	99,81	0,19
595 Std. Dev.	2925,69	2925,69	0,09	0,09
595 A	3142789	2939	99,91	0,09
595 B	3140643	5085	99,84	0,16
595 C	3139998	5730	99,82	0,18
595 D	3137689	8039	99,74	0,26
595 E	3133303	12425	99,61	0,39
595 F	3137179	8549	99,73	0,27
595 G	3141972	3756	99,88	0,12
595 H	3142434	3294	99,9	0,1
595 I	3139843	5885	99,81	0,19
595 J	3141294	4434	99,86	0,14

---

596	Black Count	White Count	Black %	White %
596 Mean	3136009,4	9718,6	99,69	0,31
596 Std. Dev.	5672,66	5672,66	0,18	0,18
596 A	3132492	13236	99,58	0,42
596 B	3139120	6608	99,79	0,21
596 C	3124235	21493	99,32	0,68
596 D	3144418	1310	99,96	0,04
596 E	3138428	7300	99,77	0,23
596 F	3133186	12542	99,6	0,4
596 G	3131996	13732	99,56	0,44
596 H	3139862	5866	99,81	0,19
596 I	3139600	6128	99,81	0,19
596 J	3136757	8971	99,71	0,29

---

597	Black Count	White Count	Black %	White %
597 Mean	3142375,5	3352,5	99,89	0,11
597 Std. Dev.	2056,29	2056,29	0,06	0,06
597 A	3143516	2212	99,93	0,07
597 B	3139211	6517	99,79	0,21
597 C	3141600	4128	99,87	0,13

597 D	3141347	4381	99,86	0,14
597 E	3141587	4141	99,87	0,13
597 F	3145182	546	99,98	0,02
597 G	3143991	1737	99,94	0,06
597 H	3143924	1804	99,94	0,06
597 I	3144007	1721	99,95	0,05
597 J	3139390	6338	99,8	0,2
<hr/>				
598	Black Count	White Count	Black %	White %
598 Mean	3140998,9	4729,1	99,85	0,15
598 Std. Dev.	2649,59	2649,59	0,08	0,08
598 A	3145495	233	99,99	0,01
598 B	3138192	7536	99,76	0,24
598 C	3140027	5701	99,82	0,18
598 D	3142087	3641	99,88	0,12
598 E	3140475	5253	99,83	0,17
598 F	3141511	4217	99,87	0,13
598 G	3141297	4431	99,86	0,14
598 H	3144468	1260	99,96	0,04
598 I	3136663	9065	99,71	0,29
598 J	3139774	5954	99,81	0,19
<hr/>				
599	Black Count	White Count	Black %	White %
599 Mean	3131173,5	14554,5	99,54	0,46
599 Std. Dev.	10610,58	10610,58	0,34	0,34
599 A	3117504	28224	99,1	0,9
599 B	3131148	14580	99,54	0,46
599 C	3131148	14580	99,54	0,46
599 D	3141811	3917	99,88	0,12
599 E	3139824	5904	99,81	0,19
599 F	3143507	2221	99,93	0,07
599 G	3133793	11935	99,62	0,38
599 H	3123871	21857	99,31	0,69
599 I	3137579	8149	99,74	0,26
599 J	3111550	34178	98,91	1,09
<hr/>				
362	Black Count	White Count	Black %	White %
362 Mean	3119435,3	26292,7	99,16	0,84
362 Std. Dev.	10208,62	10208,62	0,32	0,32

362 A	3119821	25907	99,18	0,82
362 B	3117026	28702	99,09	0,91
362 C	3108187	37541	98,81	1,19
362 D	3119426	26302	99,16	0,84
362 E	3113569	32159	98,98	1,02
362 F	3127538	18190	99,42	0,58
362 G	3136670	9058	99,71	0,29
362 H	3131807	13921	99,56	0,44
362 I	3103711	42017	98,66	1,34
362 J	3116598	29130	99,07	0,93

363	Black Count	White Count	Black %	White %
363 Mean	3112678,7	33049,3	98,95	1,05
363 Std. Dev.	22416,42	22416,42	0,71	0,71
363 A	3100448	45280	98,56	1,44
363 B	3126871	18857	99,4	0,6
363 C	3119314	26414	99,16	0,84
363 D	3070487	75241	97,61	2,39
363 E	3076177	69551	97,79	2,21
363 F	3131241	14487	99,54	0,46
363 G	3126802	18926	99,4	0,6
363 H	3123445	22283	99,29	0,71
363 I	3126051	19677	99,37	0,63
363 J	3125951	19777	99,37	0,63

364	Black Count	White Count	Black %	White %
364 Mean	3113599	32129	98,98	1,02
364 Std. Dev.	28998,03	28998,03	0,92	0,92
364 A	3139505	6223	99,8	0,2
364 B	3040804	104924	96,66	3,34
364 C	3097237	48491	98,46	1,54
364 D	3129070	16658	99,47	0,53
364 E	3118374	27354	99,13	0,87
364 F	3115516	30212	99,04	0,96
364 G	3102086	43642	98,61	1,39
364 H	3132362	13366	99,58	0,42
364 I	3132401	13327	99,58	0,42
364 J	3128635	17093	99,46	0,54

365	Black Count	White Count	Black %	White %
365 Mean	3120327,3	25400,7	99,19	0,81
365 Std. Dev.	12569,73	12569,73	0,4	0,4
365 A	3135293	10435	99,67	0,33
365 B	3118768	26960	99,14	0,86
365 C	3136707	9021	99,71	0,29
365 D	3123338	22390	99,29	0,71
365 E	3114053	31675	98,99	1,01
365 F	3132413	13315	99,58	0,42
365 G	3115981	29747	99,05	0,95
365 H	3107263	38465	98,78	1,22
365 I	3097108	48620	98,45	1,55
365 J	3122349	23379	99,26	0,74

358	Black Count	White Count	Black %	White %
358 Mean	3072452,5	73275,5	97,67	2,33
358 Std. Dev.	26566,19	26566,19	0,84	0,84
358 A	3098182	47546	98,49	1,51
358 B	3085875	59853	98,1	1,9
358 C	3076367	69361	97,8	2,2
358 D	3047475	98253	96,88	3,12
358 E	3079110	66618	97,88	2,12
358 F	3118182	27546	99,12	0,88
358 G	3081082	64646	97,94	2,06
358 H	3065651	80077	97,45	2,55
358 I	3036702	109026	96,53	3,47
358 J	3035899	109829	96,51	3,49

359	Black Count	White Count	Black %	White %
359 Mean	3139247	6481	99,79	0,21
359 Std. Dev.	3207,34	3207,34	0,1	0,1
359 A	3137145	8583	99,73	0,27
359 B	3132435	13293	99,58	0,42
359 C	3135577	10151	99,68	0,32
359 D	3141134	4594	99,85	0,15
359 E	3140513	5215	99,83	0,17
359 F	3142519	3209	99,9	0,1
359 G	3139557	6171	99,8	0,2



359 H	3141701	4027	99,87	0,13
359 I	3141465	4263	99,86	0,14
359 J	3140424	5304	99,83	0,17
<hr/>				
360	Black Count	White Count	Black %	White %
360 Mean	3133710,8	12017,2	99,62	0,38
360 Std. Dev.	4848,57	4848,57	0,16	0,16
360 A	3136084	9644	99,69	0,31
360 B	3138682	7046	99,78	0,22
360 C	3138670	7058	99,78	0,22
360 D	3130054	15674	99,5	0,5
360 E	3127891	17837	99,43	0,57
360 F	3131659	14069	99,55	0,45
360 G	3139944	5784	99,82	0,18
360 H	3136825	8903	99,72	0,28
360 I	3130293	15435	99,51	0,49
360 J	3127006	18722	99,4	0,6
<hr/>				
361	Black Count	White Count	Black %	White %
361 Mean	3139610,5	6117,5	99,8	0,2
361 Std. Dev.	5155,98	5155,98	0,17	0,17
361 A	3141642	4086	99,87	0,13
361 B	3139064	6664	99,79	0,21
361 C	3138250	7478	99,76	0,24
361 D	3144097	1631	99,95	0,05
361 E	3145072	656	99,98	0,02
361 F	3142773	2955	99,91	0,09
361 G	3139247	6481	99,79	0,21
361 H	3126611	19117	99,39	0,61
361 I	3138279	7449	99,76	0,24
361 J	3141070	4658	99,85	0,15
<hr/>				
366	Black Count	White Count	Black %	White %
366 Mean	3141057,2	4670,8	99,85	0,15
366 Std. Dev.	2054,23	2054,23	0,07	0,07
366 A	3137593	8135	99,74	0,26
366 B	3141203	4525	99,86	0,14
366 C	3140230	5498	99,83	0,17
366 D	3138414	7314	99,77	0,23

366 E	3140733	4995	99,84	0,16
366 F	3143723	2005	99,94	0,06
366 G	3142342	3386	99,89	0,11
366 H	3140484	5244	99,83	0,17
366 I	3143954	1774	99,94	0,06
366 J	3141896	3832	99,88	0,12

367	Black Count	White Count	Black %	White %
367 Mean	3136262	9466	99,7	0,3
367 Std. Dev.	7432,62	7432,62	0,24	0,24
367 A	3126459	19269	99,39	0,61
367 B	3141477	4251	99,86	0,14
367 C	3145728	0	100	0
367 D	3133232	12496	99,6	0,4
367 E	3144650	1078	99,97	0,03
367 F	3139641	6087	99,81	0,19
367 G	3131482	14246	99,55	0,45
367 H	3143096	2632	99,92	0,08
367 I	3127711	18017	99,43	0,57
367 J	3129144	16584	99,47	0,53

368	Black Count	White Count	Black %	White %
368 Mean	3141461,09	4266,91	99,86	0,14
368 Std. Dev.	2496,99	2496,99	0,08	0,08
368 A	3145727	1	100	0
368 B	3141586	4142	99,87	0,13
368 C	3139121	6607	99,79	0,21
368 D	3142485	3243	99,9	0,1
368 E	3141470	4258	99,86	0,14
368 F	3137478	8250	99,74	0,26
368 G	3139222	6506	99,79	0,21
368 H	3140764	4964	99,84	0,16
368 I	3145384	344	99,99	0,01
368 J	3142071	3657	99,88	0,12

369	Black Count	White Count	Black %	White %
369 Mean	3141308,7	4419,3	99,86	0,14
369 Std. Dev.	2609,1	2609,1	0,08	0,08
369 A	3145391	337	99,99	0,01

369 B	3144018	1710	99,95	0,05
369 C	3143988	1740	99,94	0,06
369 D	3138888	6840	99,78	0,22
369 E	3142058	3670	99,88	0,12
369 F	3139559	6169	99,8	0,2
369 G	3141811	3917	99,88	0,12
369 H	3139927	5801	99,82	0,18
369 I	3137131	8597	99,73	0,27
369 J	3140316	5412	99,83	0,17

584	Black Count	White Count	Black %	White %
584 Mean	3126091,1	19636,9	99,38	0,62
584 Std. Dev.	7528,2	7528,2	0,24	0,24
584 A	3114793	30935	99,02	0,98
584 B	3123612	22116	99,3	0,7
584 C	3122076	23652	99,25	0,75
584 D	3130652	15076	99,52	0,48
584 E	3117758	27970	99,11	0,89
584 F	3126924	18804	99,4	0,6
584 G	3132686	13042	99,59	0,41
584 H	3122099	23629	99,25	0,75
584 I	3130388	15340	99,51	0,49
584 J	3139923	5805	99,82	0,18

585	Black Count	White Count	Black %	White %
585 Mean	3136150,7	9577,3	99,69	0,31
585 Std. Dev.	2378,64	2378,64	0,08	0,08
585 A	3134246	11482	99,63	0,37
585 B	3133946	11782	99,63	0,37
585 C	3140039	5689	99,82	0,18
585 D	3135125	10603	99,66	0,34
585 E	3134961	10767	99,66	0,34
585 F	3140634	5094	99,84	0,16
585 G	3137241	8487	99,73	0,27
585 H	3135457	10271	99,67	0,33
585 I	3135143	10585	99,66	0,34
585 J	3134715	11013	99,65	0,35

586	Black Count	White Count	Black %	White %
-----	-------------	-------------	---------	---------

586 Mean	3132111,4	13616,6	99,57	0,43
586 Std. Dev.	5119,99	5119,99	0,16	0,16
586 A	3121949	23779	99,24	0,76
586 B	3125315	20413	99,35	0,65
586 C	3128318	17410	99,45	0,55
586 D	3136532	9196	99,71	0,29
586 E	3136093	9635	99,69	0,31
586 F	3134436	11292	99,64	0,36
586 G	3135210	10518	99,67	0,33
586 H	3133857	11871	99,62	0,38
586 I	3133089	12639	99,6	0,4
586 J	3136315	9413	99,7	0,3

587	Black Count	White Count	Black %	White %
587 Mean	3129593,4	16134,6	99,49	0,51
587 Std. Dev.	4475,55	4475,55	0,14	0,14
587 A	3124569	21159	99,33	0,67
587 B	3128061	17667	99,44	0,56
587 C	3123355	22373	99,29	0,71
587 D	3127610	18118	99,42	0,58
587 E	3131022	14706	99,53	0,47
587 F	3129989	15739	99,5	0,5
587 G	3131905	13823	99,56	0,44
587 H	3128015	17713	99,44	0,56
587 I	3139248	6480	99,79	0,21
587 J	3132160	13568	99,57	0,43

604	Black Count	White Count	Black %	White %
604 Mean	3127854,1	17873,9	99,43	0,57
604 Std. Dev.	6233,8	6233,8	0,2	0,2
604 A	3125089	20639	99,34	0,66
604 B	3127179	18549	99,41	0,59
604 C	3114361	31367	99	1
604 D	3135977	9751	99,69	0,31
604 E	3122064	23664	99,25	0,75
604 F	3130495	15233	99,52	0,48
604 G	3134437	11291	99,64	0,36
604 H	3129549	16179	99,49	0,51
604 I	3129460	16268	99,48	0,52

604 J	3129930	15798	99,5	0,5
605	Black Count	White Count	Black %	White %
605 Mean	3141193,2	4534,8	99,86	0,14
605 Std. Dev.	2546,95	2546,95	0,08	0,08
605 A	3143086	2642	99,92	0,08
605 B	3142472	3256	99,9	0,1
605 C	3141305	4423	99,86	0,14
605 D	3143375	2353	99,93	0,07
605 E	3141681	4047	99,87	0,13
605 F	3141370	4358	99,86	0,14
605 G	3135624	10104	99,68	0,32
605 H	3139323	6405	99,8	0,2
605 I	3139323	6405	99,8	0,2
605 J	3144373	1355	99,96	0,04
606	Black Count	White Count	Black %	White %
606 Mean	3133725,5	12002,5	99,62	0,38
606 Std. Dev.	11987,15	11987,15	0,38	0,38
606 A	3132861	12867	99,59	0,41
606 B	3136131	9597	99,69	0,31
606 C	3137326	8402	99,73	0,27
606 D	3142301	3427	99,89	0,11
606 E	3134306	11422	99,64	0,36
606 F	3139381	6347	99,8	0,2
606 G	3100863	44865	98,57	1,43
606 H	3135616	10112	99,68	0,32
606 I	3135797	9931	99,68	0,32
606 J	3142673	3055	99,9	0,1
607	Black Count	White Count	Black %	White %
607 Mean	3136159,5	9568,5	99,7	0,3
607 Std. Dev.	5422,85	5422,85	0,17	0,17
607 A	3131113	14615	99,54	0,46
607 B	3141505	4223	99,87	0,13
607 C	3134639	11089	99,65	0,35
607 D	3130768	14960	99,52	0,48
607 E	3137256	8472	99,73	0,27
607 F	3144139	1589	99,95	0,05

607 G	3136539	9189	99,71	0,29
607 H	3129142	16586	99,47	0,53
607 I	3143551	2177	99,93	0,07
607 J	3132943	12785	99,59	0,41
<hr/>				
608	Black Count	White Count	Black %	White %
608 Mean	3132619,2	13108,8	99,58	0,42
608 Std. Dev.	6467,18	6467,18	0,21	0,21
608 A	3124101	21627	99,31	0,69
608 B	3125312	20416	99,35	0,65
608 C	3129496	16232	99,48	0,52
608 D	3130810	14918	99,53	0,47
608 E	3124940	20788	99,34	0,66
608 F	3137030	8698	99,72	0,28
608 G	3141217	4511	99,86	0,14
608 H	3139201	6527	99,79	0,21
608 I	3135894	9834	99,69	0,31
608 J	3138191	7537	99,76	0,24
<hr/>				
609	Black Count	White Count	Black %	White %
609 Mean	3116425,8	29302,2	99,07	0,93
609 Std. Dev.	17837,48	17837,48	0,57	0,57
609 A	3089472	56256	98,21	1,79
609 B	3091939	53789	98,29	1,71
609 C	3132492	13236	99,58	0,42
609 D	3106575	39153	98,76	1,24
609 E	3101775	43953	98,6	1,4
609 F	3138380	7348	99,77	0,23
609 G	3132348	13380	99,57	0,43
609 H	3130571	15157	99,52	0,48
609 I	3119570	26158	99,17	0,83
609 J	3121136	24592	99,22	0,78
<hr/>				
610	Black Count	White Count	Black %	White %
610 Mean	3117703,7	28024,3	99,11	0,89
610 Std. Dev.	16598,35	16598,35	0,53	0,53
610 A	3110697	35031	98,89	1,11
610 B	3104440	41288	98,69	1,31
610 C	3109636	36092	98,85	1,15

610 D	3121369	24359	99,23	0,77
610 E	3124268	21460	99,32	0,68
610 F	3083857	61871	98,03	1,97
610 G	3115574	30154	99,04	0,96
610 H	3133827	11901	99,62	0,38
610 I	3135617	10111	99,68	0,32
610 J	3137752	7976	99,75	0,25
<hr/>				
611	Black Count	White Count	Black %	White %
611 Mean	3098595,7	47132,3	98,5	1,5
611 Std. Dev.	39718,36	39718,36	1,26	1,26
611 A	3121048	24680	99,22	0,78
611 B	3125348	20380	99,35	0,65
611 C	3066241	79487	97,47	2,53
611 D	3127199	18529	99,41	0,59
611 E	3128498	17230	99,45	0,55
611 F	3136812	8916	99,72	0,28
611 G	3120590	25138	99,2	0,8
611 H	3091254	54474	98,27	1,73
611 I	3034222	111506	96,46	3,54
611 J	3034745	110983	96,47	3,53
<hr/>				
346	Black Count	White Count	Black %	White %
346 Mean	3103950,1	41777,9	98,67	1,33
346 Std. Dev.	17316,74	17316,74	0,55	0,55
346 A	3080479	65249	97,93	2,07
346 B	3121190	24538	99,22	0,78
346 C	3123751	21977	99,30	0,70
346 D	3116575	29153	99,07	0,93
346 E	3102440	43288	98,62	1,38
346 F	3087412	58316	98,15	1,85
346 G	3105181	40547	98,71	1,29
346 H	3113151	32577	98,96	1,04
346 I	3075107	70621	97,76	2,24
346 J	3114215	31513	99,00	1,00
<hr/>				
347	Black Count	White Count	Black %	White %
347 Mean	3097330,3	48397,7	98,46	1,54
347 Std. Dev.	26355,22	26355,22	0,84	0,84

347 A	3077458	68270	97,83	2,17
347 B	3031220	114508	96,36	3,64
347 C	3096273	49455	98,43	1,57
347 D	3118825	26903	99,14	0,86
347 E	3111050	34678	98,9	1,1
347 F	3115533	30195	99,04	0,96
347 G	3106197	39531	98,74	1,26
347 H	3110304	35424	98,87	1,13
347 I	3112887	32841	98,96	1,04
347 J	3093556	52172	98,34	1,66

348	Black Count	White Count	Black %	White %
348 Mean	3111341,5	34386,5	98,91	1,09
348 Std. Dev.	30945,58	30945,58	0,98	0,98
348 A	3041045	104683	96,67	3,33
348 B	3142684	3044	99,9	0,1
348 C	3075039	70689	97,75	2,25
348 D	3126459	19269	99,39	0,61
348 E	3126459	19269	99,39	0,61
348 F	3135565	10163	99,68	0,32
348 G	3125604	20124	99,36	0,64
348 H	3113459	32269	98,97	1,03
348 I	3105957	39771	98,74	1,26
348 J	3121144	24584	99,22	0,78

349	Black Count	White Count	Black %	White %
349 Mean	3102167,8	43560,2	98,62	1,39
349 Std. Dev.	15845,25	15845,25	0,5	0,5
349 A	3108332	37396	98,81	1,19
349 B	3135803	9925	99,68	0,32
349 C	3119729	25999	99,17	0,83
349 D	3089031	56697	98,2	1,8
349 E	3105750	39978	98,73	1,27
349 F	3097473	48255	98,47	1,53
349 G	3083714	62014	98,03	1,97
349 H	3090635	55093	98,25	1,75
349 I	3092885	52843	98,32	1,68
349 J	3098326	47402	98,49	1,51



354	Black Count	White Count	Black %	White %
354 Mean	3109029,9	36698,1	98,83	1,17
354 Std. Dev.	15166,99	15166,99	0,48	0,48
354 A	3106060	39668	98,74	1,26
354 B	3101002	44726	98,58	1,42
354 C	3079562	66166	97,9	2,1
354 D	3117064	28664	99,09	0,91
354 E	3117948	27780	99,12	0,88
354 F	3123285	22443	99,29	0,71
354 G	3131599	14129	99,55	0,45
354 H	3092888	52840	98,32	1,68
354 I	3112381	33347	98,94	1,06
354 J	3108510	37218	98,82	1,18

355	Black Count	White Count	Black %	White %
355 Mean	3109168,3	36559,7	98,84	1,16
355 Std. Dev.	16421,36	16421,36	0,52	0,52
355 A	3076115	69613	97,79	2,21
355 B	3085296	60432	98,08	1,92
355 C	3106789	38939	98,76	1,24
355 D	3111974	33754	98,93	1,07
355 E	3122391	23337	99,26	0,74
355 F	3118931	26797	99,15	0,85
355 G	3106646	39082	98,76	1,24
355 H	3116537	29191	99,07	0,93
355 I	3125657	20071	99,36	0,64
355 J	3121347	24381	99,22	0,78

356	Black Count	White Count	Black %	White %
356 Mean	3104493	41235	98,69	1,31
356 Std. Dev.	16387,82	16387,82	0,52	0,52
356 A	3096209	49519	98,43	1,57
356 B	3103295	42433	98,65	1,35
356 C	3114146	31582	99	1
356 D	3126968	18760	99,4	0,6
356 E	3127074	18654	99,41	0,59
356 F	3090404	55324	98,24	1,76
356 G	3116369	29359	99,07	0,93
356 H	3092128	53600	98,3	1,7

356 I	3100930	44798	98,58	1,42
356 J	3077407	68321	97,83	2,17
357	Black Count	White Count	Black %	White %
357 Mean	3096954	48774	98,45	1,55
357 Std. Dev.	19892,24	19892,24	0,63	0,63
357 A	3076482	69246	97,8	2,2
357 B	3116770	28958	99,08	0,92
357 C	3113944	31784	98,99	1,01
357 D	3086655	59073	98,12	1,88
357 E	3069178	76550	97,57	2,43
357 F	3130571	15157	99,52	0,48
357 G	3080742	64986	97,93	2,07
357 H	3087856	57872	98,16	1,84
357 I	3106617	39111	98,76	1,24
357 J	3100725	45003	98,57	1,43
592	Black Count	White Count	Black %	White %
592 Mean	3134815,2	10912,8	99,65	0,35
592 Std. Dev.	9950,47	9950,47	0,32	0,32
592 A	3135386	10342	99,67	0,33
592 B	3137443	8285	99,74	0,26
592 C	3133145	12583	99,6	0,4
592 D	3137933	7795	99,75	0,25
592 E	3138579	7149	99,77	0,23
592 F	3132532	13196	99,58	0,42
592 G	3108666	37062	98,82	1,18
592 H	3144957	771	99,98	0,02
592 I	3136880	8848	99,72	0,28
592 J	3142631	3097	99,9	0,1
593	Black Count	White Count	Black %	White %
593 Mean	3125742,7	19985,3	99,37	0,63
593 Std. Dev.	14759,01	14759,01	0,47	0,47
593 A	3134286	11442	99,64	0,36
593 B	3132169	13559	99,57	0,43
593 C	3138067	7661	99,76	0,24
593 D	3117339	28389	99,1	0,9
593 E	3105810	39918	98,73	1,27

593 F	3097658	48070	98,47	1,53
593 G	3140045	5683	99,82	0,18
593 H	3138143	7585	99,76	0,24
593 I	3133133	12595	99,6	0,4
593 J	3120777	24951	99,21	0,79
<hr/>				
594	Black Count	White Count	Black %	White %
594 Mean	3138456,4	7271,6	99,77	0,23
594 Std. Dev.	3383,98	3383,98	0,11	0,11
594 A	3132671	13057	99,58	0,42
594 B	3134616	11112	99,65	0,35
594 C	3141310	4418	99,86	0,14
594 D	3139113	6615	99,79	0,21
594 E	3143050	2678	99,91	0,09
594 F	3138456	7272	99,77	0,23
594 G	3139191	6537	99,79	0,21
594 H	3135854	9874	99,69	0,31
594 I	3137691	8037	99,74	0,26
594 J	3142612	3116	99,9	0,1
<hr/>				
595	Black Count	White Count	Black %	White %
595 Mean	3139714,4	6013,6	99,81	0,19
595 Std. Dev.	2925,69	2925,69	0,09	0,09
595 A	3142789	2939	99,91	0,09
595 B	3140643	5085	99,84	0,16
595 C	3139998	5730	99,82	0,18
595 D	3137689	8039	99,74	0,26
595 E	3133303	12425	99,61	0,39
595 F	3137179	8549	99,73	0,27
595 G	3141972	3756	99,88	0,12
595 H	3142434	3294	99,9	0,1
595 I	3139843	5885	99,81	0,19
595 J	3141294	4434	99,86	0,14
<hr/>				
596	Black Count	White Count	Black %	White %
596 Mean	3136009,4	9718,6	99,69	0,31
596 Std. Dev.	5672,66	5672,66	0,18	0,18
596 A	3132492	13236	99,58	0,42
596 B	3139120	6608	99,79	0,21

596 C	3124235	21493	99,32	0,68
596 D	3144418	1310	99,96	0,04
596 E	3138428	7300	99,77	0,23
596 F	3133186	12542	99,6	0,4
596 G	3131996	13732	99,56	0,44
596 H	3139862	5866	99,81	0,19
596 I	3139600	6128	99,81	0,19
596 J	3136757	8971	99,71	0,29
<hr/>				
597	Black Count	White Count	Black %	White %
597 Mean	3142375,5	3352,5	99,89	0,11
597 Std. Dev.	2056,29	2056,29	0,06	0,06
597 A	3143516	2212	99,93	0,07
597 B	3139211	6517	99,79	0,21
597 C	3141600	4128	99,87	0,13
597 D	3141347	4381	99,86	0,14
597 E	3141587	4141	99,87	0,13
597 F	3145182	546	99,98	0,02
597 G	3143991	1737	99,94	0,06
597 H	3143924	1804	99,94	0,06
597 I	3144007	1721	99,95	0,05
597 J	3139390	6338	99,8	0,2
<hr/>				
598	Black Count	White Count	Black %	White %
598 Mean	3140998,9	4729,1	99,85	0,15
598 Std. Dev.	2649,59	2649,59	0,08	0,08
598 A	3145495	233	99,99	0,01
598 B	3138192	7536	99,76	0,24
598 C	3140027	5701	99,82	0,18
598 D	3142087	3641	99,88	0,12
598 E	3140475	5253	99,83	0,17
598 F	3141511	4217	99,87	0,13
598 G	3141297	4431	99,86	0,14
598 H	3144468	1260	99,96	0,04
598 I	3136663	9065	99,71	0,29
598 J	3139774	5954	99,81	0,19
<hr/>				
599	Black Count	White Count	Black %	White %
599 Mean	3131173,5	14554,5	99,54	0,46

599 Std. Dev.	10610,58	10610,58	0,34	0,34
599 A	3117504	28224	99,1	0,9
599 B	3131148	14580	99,54	0,46
599 C	3131148	14580	99,54	0,46
599 D	3141811	3917	99,88	0,12
599 E	3139824	5904	99,81	0,19
599 F	3143507	2221	99,93	0,07
599 G	3133793	11935	99,62	0,38
599 H	3123871	21857	99,31	0,69
599 I	3137579	8149	99,74	0,26
599 J	3111550	34178	98,91	1,09

362	Black Count	White Count	Black %	White %
362 Mean	3119435,3	26292,7	99,16	0,84
362 Std. Dev.	10208,62	10208,62	0,32	0,32
362 A	3119821	25907	99,18	0,82
362 B	3117026	28702	99,09	0,91
362 C	3108187	37541	98,81	1,19
362 D	3119426	26302	99,16	0,84
362 E	3113569	32159	98,98	1,02
362 F	3127538	18190	99,42	0,58
362 G	3136670	9058	99,71	0,29
362 H	3131807	13921	99,56	0,44
362 I	3103711	42017	98,66	1,34
362 J	3116598	29130	99,07	0,93

363	Black Count	White Count	Black %	White %
363 Mean	3112678,7	33049,3	98,95	1,05
363 Std. Dev.	22416,42	22416,42	0,71	0,71
363 A	3100448	45280	98,56	1,44
363 B	3126871	18857	99,4	0,6
363 C	3119314	26414	99,16	0,84
363 D	3070487	75241	97,61	2,39
363 E	3076177	69551	97,79	2,21
363 F	3131241	14487	99,54	0,46
363 G	3126802	18926	99,4	0,6
363 H	3123445	22283	99,29	0,71
363 I	3126051	19677	99,37	0,63
363 J	3125951	19777	99,37	0,63

364	Black Count	White Count	Black %	White %
364 Mean	3113599	32129	98,98	1,02
364 Std. Dev.	28998,03	28998,03	0,92	0,92
364 A	3139505	6223	99,8	0,2
364 B	3040804	104924	96,66	3,34
364 C	3097237	48491	98,46	1,54
364 D	3129070	16658	99,47	0,53
364 E	3118374	27354	99,13	0,87
364 F	3115516	30212	99,04	0,96
364 G	3102086	43642	98,61	1,39
364 H	3132362	13366	99,58	0,42
364 I	3132401	13327	99,58	0,42
364 J	3128635	17093	99,46	0,54

365	Black Count	White Count	Black %	White %
365 Mean	3120327,3	25400,7	99,19	0,81
365 Std. Dev.	12569,73	12569,73	0,4	0,4
365 A	3135293	10435	99,67	0,33
365 B	3118768	26960	99,14	0,86
365 C	3136707	9021	99,71	0,29
365 D	3123338	22390	99,29	0,71
365 E	3114053	31675	98,99	1,01
365 F	3132413	13315	99,58	0,42
365 G	3115981	29747	99,05	0,95
365 H	3107263	38465	98,78	1,22
365 I	3097108	48620	98,45	1,55
365 J	3122349	23379	99,26	0,74

358	Black Count	White Count	Black %	White %
358 Mean	3072452,5	73275,5	97,67	2,33
358 Std. Dev.	26566,19	26566,19	0,84	0,84
358 A	3098182	47546	98,49	1,51
358 B	3085875	59853	98,1	1,9
358 C	3076367	69361	97,8	2,2
358 D	3047475	98253	96,88	3,12
358 E	3079110	66618	97,88	2,12
358 F	3118182	27546	99,12	0,88
358 G	3081082	64646	97,94	2,06

358 H	3065651	80077	97,45	2,55
358 I	3036702	109026	96,53	3,47
358 J	3035899	109829	96,51	3,49
<hr/>				
359	Black Count	White Count	Black %	White %
359 Mean	3139247	6481	99,79	0,21
359 Std. Dev.	3207,34	3207,34	0,1	0,1
359 A	3137145	8583	99,73	0,27
359 B	3132435	13293	99,58	0,42
359 C	3135577	10151	99,68	0,32
359 D	3141134	4594	99,85	0,15
359 E	3140513	5215	99,83	0,17
359 F	3142519	3209	99,9	0,1
359 G	3139557	6171	99,8	0,2
359 H	3141701	4027	99,87	0,13
359 I	3141465	4263	99,86	0,14
359 J	3140424	5304	99,83	0,17
<hr/>				
360	Black Count	White Count	Black %	White %
360 Mean	3133710,8	12017,2	99,62	0,38
360 Std. Dev.	4848,57	4848,57	0,16	0,16
360 A	3136084	9644	99,69	0,31
360 B	3138682	7046	99,78	0,22
360 C	3138670	7058	99,78	0,22
360 D	3130054	15674	99,5	0,5
360 E	3127891	17837	99,43	0,57
360 F	3131659	14069	99,55	0,45
360 G	3139944	5784	99,82	0,18
360 H	3136825	8903	99,72	0,28
360 I	3130293	15435	99,51	0,49
360 J	3127006	18722	99,4	0,6
<hr/>				
361	Black Count	White Count	Black %	White %
361 Mean	3139610,5	6117,5	99,8	0,2
361 Std. Dev.	5155,98	5155,98	0,17	0,17
361 A	3141642	4086	99,87	0,13
361 B	3139064	6664	99,79	0,21
361 C	3138250	7478	99,76	0,24
361 D	3144097	1631	99,95	0,05

361 E	3145072	656	99,98	0,02
361 F	3142773	2955	99,91	0,09
361 G	3139247	6481	99,79	0,21
361 H	3126611	19117	99,39	0,61
361 I	3138279	7449	99,76	0,24
361 J	3141070	4658	99,85	0,15

366	Black Count	White Count	Black %	White %
366 Mean	3141057,2	4670,8	99,85	0,15
366 Std. Dev.	2054,23	2054,23	0,07	0,07
366 A	3137593	8135	99,74	0,26
366 B	3141203	4525	99,86	0,14
366 C	3140230	5498	99,83	0,17
366 D	3138414	7314	99,77	0,23
366 E	3140733	4995	99,84	0,16
366 F	3143723	2005	99,94	0,06
366 G	3142342	3386	99,89	0,11
366 H	3140484	5244	99,83	0,17
366 I	3143954	1774	99,94	0,06
366 J	3141896	3832	99,88	0,12

367	Black Count	White Count	Black %	White %
367 Mean	3136262	9466	99,7	0,3
367 Std. Dev.	7432,62	7432,62	0,24	0,24
367 A	3126459	19269	99,39	0,61
367 B	3141477	4251	99,86	0,14
367 C	3145728	0	100	0
367 D	3133232	12496	99,6	0,4
367 E	3144650	1078	99,97	0,03
367 F	3139641	6087	99,81	0,19
367 G	3131482	14246	99,55	0,45
367 H	3143096	2632	99,92	0,08
367 I	3127711	18017	99,43	0,57
367 J	3129144	16584	99,47	0,53

368	Black Count	White Count	Black %	White %
368 Mean	3141461,09	4266,91	99,86	0,14
368 Std. Dev.	2496,99	2496,99	0,08	0,08
368 A	3145727	1	100	0



368 B	3141586	4142	99,87	0,13
368 C	3139121	6607	99,79	0,21
368 D	3142485	3243	99,9	0,1
368 E	3141470	4258	99,86	0,14
368 F	3137478	8250	99,74	0,26
368 G	3139222	6506	99,79	0,21
368 H	3140764	4964	99,84	0,16
368 I	3145384	344	99,99	0,01
368 J	3142071	3657	99,88	0,12
<hr/>				
369	Black Count	White Count	Black %	White %
369 Mean	3141308,7	4419,3	99,86	0,14
369 Std. Dev.	2609,1	2609,1	0,08	0,08
369 A	3145391	337	99,99	0,01
369 B	3144018	1710	99,95	0,05
369 C	3143988	1740	99,94	0,06
369 D	3138888	6840	99,78	0,22
369 E	3142058	3670	99,88	0,12
369 F	3139559	6169	99,8	0,2
369 G	3141811	3917	99,88	0,12
369 H	3139927	5801	99,82	0,18
369 I	3137131	8597	99,73	0,27
369 J	3140316	5412	99,83	0,17
<hr/>				
584	Black Count	White Count	Black %	White %
584 Mean	3126091,1	19636,9	99,38	0,62
584 Std. Dev.	7528,2	7528,2	0,24	0,24
584 A	3114793	30935	99,02	0,98
584 B	3123612	22116	99,3	0,7
584 C	3122076	23652	99,25	0,75
584 D	3130652	15076	99,52	0,48
584 E	3117758	27970	99,11	0,89
584 F	3126924	18804	99,4	0,6
584 G	3132686	13042	99,59	0,41
584 H	3122099	23629	99,25	0,75
584 I	3130388	15340	99,51	0,49
584 J	3139923	5805	99,82	0,18
<hr/>				
585	Black Count	White Count	Black %	White %

585 Mean	3136150,7	9577,3	99,69	0,31
585 Std. Dev.	2378,64	2378,64	0,08	0,08
585 A	3134246	11482	99,63	0,37
585 B	3133946	11782	99,63	0,37
585 C	3140039	5689	99,82	0,18
585 D	3135125	10603	99,66	0,34
585 E	3134961	10767	99,66	0,34
585 F	3140634	5094	99,84	0,16
585 G	3137241	8487	99,73	0,27
585 H	3135457	10271	99,67	0,33
585 I	3135143	10585	99,66	0,34
585 J	3134715	11013	99,65	0,35

586	Black Count	White Count	Black %	White %
586 Mean	3132111,4	13616,6	99,57	0,43
586 Std. Dev.	5119,99	5119,99	0,16	0,16
586 A	3121949	23779	99,24	0,76
586 B	3125315	20413	99,35	0,65
586 C	3128318	17410	99,45	0,55
586 D	3136532	9196	99,71	0,29
586 E	3136093	9635	99,69	0,31
586 F	3134436	11292	99,64	0,36
586 G	3135210	10518	99,67	0,33
586 H	3133857	11871	99,62	0,38
586 I	3133089	12639	99,6	0,4
586 J	3136315	9413	99,7	0,3

587	Black Count	White Count	Black %	White %
587 Mean	3129593,4	16134,6	99,49	0,51
587 Std. Dev.	4475,55	4475,55	0,14	0,14
587 A	3124569	21159	99,33	0,67
587 B	3128061	17667	99,44	0,56
587 C	3123355	22373	99,29	0,71
587 D	3127610	18118	99,42	0,58
587 E	3131022	14706	99,53	0,47
587 F	3129989	15739	99,5	0,5
587 G	3131905	13823	99,56	0,44
587 H	3128015	17713	99,44	0,56
587 I	3139248	6480	99,79	0,21

587 J	3132160	13568	99,57	0,43
604	Black Count	White Count	Black %	White %
604 Mean	3127854,1	17873,9	99,43	0,57
604 Std. Dev.	6233,8	6233,8	0,2	0,2
604 A	3125089	20639	99,34	0,66
604 B	3127179	18549	99,41	0,59
604 C	3114361	31367	99	1
604 D	3135977	9751	99,69	0,31
604 E	3122064	23664	99,25	0,75
604 F	3130495	15233	99,52	0,48
604 G	3134437	11291	99,64	0,36
604 H	3129549	16179	99,49	0,51
604 I	3129460	16268	99,48	0,52
604 J	3129930	15798	99,5	0,5
605	Black Count	White Count	Black %	White %
605 Mean	3141193,2	4534,8	99,86	0,14
605 Std. Dev.	2546,95	2546,95	0,08	0,08
605 A	3143086	2642	99,92	0,08
605 B	3142472	3256	99,9	0,1
605 C	3141305	4423	99,86	0,14
605 D	3143375	2353	99,93	0,07
605 E	3141681	4047	99,87	0,13
605 F	3141370	4358	99,86	0,14
605 G	3135624	10104	99,68	0,32
605 H	3139323	6405	99,8	0,2
605 I	3139323	6405	99,8	0,2
605 J	3144373	1355	99,96	0,04
606	Black Count	White Count	Black %	White %
606 Mean	3133725,5	12002,5	99,62	0,38
606 Std. Dev.	11987,15	11987,15	0,38	0,38
606 A	3132861	12867	99,59	0,41
606 B	3136131	9597	99,69	0,31
606 C	3137326	8402	99,73	0,27
606 D	3142301	3427	99,89	0,11
606 E	3134306	11422	99,64	0,36
606 F	3139381	6347	99,8	0,2

606 G	3100863	44865	98,57	1,43
606 H	3135616	10112	99,68	0,32
606 I	3135797	9931	99,68	0,32
606 J	3142673	3055	99,9	0,1
<hr/>				
607	Black Count	White Count	Black %	White %
607 Mean	3136159,5	9568,5	99,7	0,3
607 Std. Dev.	5422,85	5422,85	0,17	0,17
607 A	3131113	14615	99,54	0,46
607 B	3141505	4223	99,87	0,13
607 C	3134639	11089	99,65	0,35
607 D	3130768	14960	99,52	0,48
607 E	3137256	8472	99,73	0,27
607 F	3144139	1589	99,95	0,05
607 G	3136539	9189	99,71	0,29
607 H	3129142	16586	99,47	0,53
607 I	3143551	2177	99,93	0,07
607 J	3132943	12785	99,59	0,41
<hr/>				
608	Black Count	White Count	Black %	White %
608 Mean	3132619,2	13108,8	99,58	0,42
608 Std. Dev.	6467,18	6467,18	0,21	0,21
608 A	3124101	21627	99,31	0,69
608 B	3125312	20416	99,35	0,65
608 C	3129496	16232	99,48	0,52
608 D	3130810	14918	99,53	0,47
608 E	3124940	20788	99,34	0,66
608 F	3137030	8698	99,72	0,28
608 G	3141217	4511	99,86	0,14
608 H	3139201	6527	99,79	0,21
608 I	3135894	9834	99,69	0,31
608 J	3138191	7537	99,76	0,24
<hr/>				
609	Black Count	White Count	Black %	White %
609 Mean	3116425,8	29302,2	99,07	0,93
609 Std. Dev.	17837,48	17837,48	0,57	0,57
609 A	3089472	56256	98,21	1,79
609 B	3091939	53789	98,29	1,71
609 C	3132492	13236	99,58	0,42

609 D	3106575	39153	98,76	1,24
609 E	3101775	43953	98,6	1,4
609 F	3138380	7348	99,77	0,23
609 G	3132348	13380	99,57	0,43
609 H	3130571	15157	99,52	0,48
609 I	3119570	26158	99,17	0,83
609 J	3121136	24592	99,22	0,78
<hr/>				
610	Black Count	White Count	Black %	White %
610 Mean	3117703,7	28024,3	99,11	0,89
610 Std. Dev.	16598,35	16598,35	0,53	0,53
610 A	3110697	35031	98,89	1,11
610 B	3104440	41288	98,69	1,31
610 C	3109636	36092	98,85	1,15
610 D	3121369	24359	99,23	0,77
610 E	3124268	21460	99,32	0,68
610 F	3083857	61871	98,03	1,97
610 G	3115574	30154	99,04	0,96
610 H	3133827	11901	99,62	0,38
610 I	3135617	10111	99,68	0,32
610 J	3137752	7976	99,75	0,25
<hr/>				
611	Black Count	White Count	Black %	White %
611 Mean	3098595,7	47132,3	98,5	1,5
611 Std. Dev.	39718,36	39718,36	1,26	1,26
611 A	3121048	24680	99,22	0,78
611 B	3125348	20380	99,35	0,65
611 C	3066241	79487	97,47	2,53
611 D	3127199	18529	99,41	0,59
611 E	3128498	17230	99,45	0,55
611 F	3136812	8916	99,72	0,28
611 G	3120590	25138	99,2	0,8
611 H	3091254	54474	98,27	1,73
611 I	3034222	111506	96,46	3,54
611 J	3034745	110983	96,47	3,53
<hr/>				
264	Black Count	White Count	Black %	White %
264 Mean	3102062	43666	98,61	1,39
264 Std. Dev.	23453,54	23453,54	0,74	0,74

264 A	3060643	85085	97,3	2,7
264 B	3097036	48692	98,45	1,55
264 C	3099330	46398	98,53	1,47
264 D	3065360	80368	97,45	2,55
264 E	3101457	44271	98,59	1,41
264 F	3124443	21285	99,32	0,68
264 G	3106189	39539	98,74	1,26
264 H	3116749	28979	99,08	0,92
264 I	3131626	14102	99,55	0,45
264 J	3117787	27941	99,11	0,89

265	Black Count	White Count	Black %	White %
265 Mean	3126450,9	19277,1	99,39	0,61
265 Std. Dev.	7279,67	7279,67	0,23	0,23
265 A	3117280	28448	99,1	0,9
265 B	3132084	13644	99,57	0,43
265 C	3131250	14478	99,54	0,46
265 D	3123779	21949	99,3	0,7
265 E	3125226	20502	99,35	0,65
265 F	3132085	13643	99,57	0,43
265 G	3112251	33477	98,94	1,06
265 H	3128519	17209	99,45	0,55
265 I	3136021	9707	99,69	0,31
265 J	3126014	19714	99,37	0,63

266	Black Count	White Count	Black %	White %
266 Mean	3128772	16956	99,46	0,54
266 Std. Dev.	8133,68	8133,68	0,26	0,26
266 A	3132727	13001	99,59	0,41
266 B	3114133	31595	99	1
266 C	3132487	13241	99,58	0,42
266 D	3139488	6240	99,8	0,2
266 E	3131592	14136	99,55	0,45
266 F	3123736	21992	99,3	0,7
266 G	3133629	12099	99,62	0,38
266 H	3126491	19237	99,39	0,61
266 I	3117600	28128	99,11	0,89
266 J	3135837	9891	99,69	0,31

267	Black Count	White Count	Black %	White %
267 Mean	3121954,6	23773,4	99,24	0,76
267 Std. Dev.	15388,79	15388,79	0,49	0,49
267 A	3099045	46683	98,52	1,48
267 B	3133697	12031	99,62	0,38
267 C	3096844	48884	98,45	1,55
267 D	3133085	12643	99,6	0,4
267 E	3111584	34144	98,91	1,09
267 F	3134619	11109	99,65	0,35
267 G	3136724	9004	99,71	0,29
267 H	3125913	19815	99,37	0,63
267 I	3134115	11613	99,63	0,37
267 J	3113920	31808	98,99	1,01

350	Black Count	White Count	Black %	White %
350 Mean	3112885,9	32842,1	98,95	1,04
350 Std. Dev.	20380,22	20380,22	0,65	0,65
350 A	3123489	22239	99,29	0,71
350 B	3064606	81122	97,42	2,58
350 C	3122706	23022	99,27	0,73
350 D	3130636	15092	99,52	0,48
350 E	3128833	16895	99,46	0,54
350 F	3124371	21357	99,32	0,68
350 G	3118591	27137	99,14	0,86
350 H	3092241	53487	98,3	1,7
350 I	3107481	38247	98,78	1,22
350 J	3115905	29823	99,05	0,95

351	Black Count	White Count	Black %	White %
351 Mean	3086574	59154	98,12	1,88
351 Std. Dev.	28139,32	28139,32	0,89	0,89
351 A	3119539	26189	99,17	0,83
351 B	3115164	30564	99,03	0,97
351 C	3107985	37743	98,8	1,2
351 D	3095650	50078	98,41	1,59
351 E	3028303	117425	96,27	3,73
351 F	3105259	40469	98,71	1,29
351 G	3070527	75201	97,61	2,39
351 H	3065680	80048	97,46	2,54

351 I	3086641	59087	98,12	1,88
351 J	3070992	74736	97,62	2,38
352	Black Count	White Count	Black %	White %
352 Mean	3094235,1	51492,9	98,36	1,64
352 Std. Dev.	16178,02	16178,02	0,52	0,52
352 A	3108171	37557	98,81	1,19
352 B	3086982	58746	98,13	1,87
352 C	3100252	45476	98,55	1,45
352 D	3060274	85454	97,28	2,72
352 E	3110976	34752	98,9	1,1
352 F	3090730	54998	98,25	1,75
352 G	3115331	30397	99,03	0,97
352 H	3090176	55552	98,23	1,77
352 I	3081839	63889	97,97	2,03
352 J	3097620	48108	98,47	1,53
353	Black Count	White Count	Black %	White %
353 Mean	3082697,6	63030,4	98	2
353 Std. Dev.	38352,37	38352,37	1,22	1,22
353 A	3055429	90299	97,13	2,87
353 B	3079559	66169	97,9	2,1
353 C	3119151	26577	99,16	0,84
353 D	3110287	35441	98,87	1,13
353 E	2989621	156107	95,04	4,96
353 F	3073000	72728	97,69	2,31
353 G	3086000	59728	98,1	1,9
353 H	3113886	31842	98,99	1,01
353 I	3094848	50880	98,38	1,62
353 J	3105195	40533	98,71	1,29
588	Black Count	White Count	Black %	White %
588 Mean	3084196,4	61531,6	98,05	1,96
588 Std. Dev.	14806	14806	0,47	0,47
588 A	3097503	48225	98,47	1,53
588 B	3072080	73648	97,66	2,34
588 C	3056033	89695	97,15	2,85
588 D	3096236	49492	98,43	1,57
588 E	3087375	58353	98,15	1,85



588 F	3105018	40710	98,71	1,29
588 G	3093880	51848	98,35	1,65
588 H	3081011	64717	97,94	2,06
588 I	3081011	64717	97,94	2,06
588 J	3071817	73911	97,65	2,35
<hr/>				
589	Black Count	White Count	Black %	White %
589 Mean	3091180,5	54547,5	98,27	1,73
589 Std. Dev.	37510,86	37510,86	1,19	1,19
589 A	3101006	44722	98,58	1,42
589 B	3115403	30325	99,04	0,96
589 C	3053518	92210	97,07	2,93
589 D	3009172	136556	95,66	4,34
589 E	3103266	42462	98,65	1,35
589 F	3086140	59588	98,11	1,89
589 G	3112037	33691	98,93	1,07
589 H	3080648	65080	97,93	2,07
589 I	3105436	40292	98,72	1,28
589 J	3145179	549	99,98	0,02
<hr/>				
590	Black Count	White Count	Black %	White %
590 Mean	3113267,9	32460,1	98,97	1,03
590 Std. Dev.	11960,57	11960,57	0,38	0,38
590 A	3130315	15413	99,51	0,49
590 B	3103791	41937	98,67	1,33
590 C	3123479	22249	99,29	0,71
590 D	3113744	31984	98,98	1,02
590 E	3104668	41060	98,69	1,31
590 F	3096679	49049	98,44	1,56
590 G	3114955	30773	99,02	0,98
590 H	3130259	15469	99,51	0,49
590 I	3114210	31518	99	1
590 J	3100579	45149	98,56	1,44
<hr/>				
591	Black Count	White Count	Black %	White %
591 Mean	3106039,2	39688,8	98,74	1,26
591 Std. Dev.	14829,73	14829,73	0,47	0,47
591 A	3132796	12932	99,59	0,41
591 B	3120288	25440	99,19	0,81

591 C	3082613	63115	97,99	2,01
591 D	3092718	53010	98,31	1,69
591 E	3108012	37716	98,8	1,2
591 F	3105758	39970	98,73	1,27
591 G	3096057	49671	98,42	1,58
591 H	3117324	28404	99,1	0,9
591 I	3096215	49513	98,43	1,57
591 J	3108611	37117	98,82	1,18

600	Black Count	White Count	Black %	White %
600 Mean	3109687,1	36040,9	98,85	1,15
600 Std. Dev.	18387,49	18387,49	0,58	0,58
600 A	3094352	51376	98,37	1,63
600 B	3105882	39846	98,73	1,27
600 C	3092686	53042	98,31	1,69
600 D	3073018	72710	97,69	2,31
600 E	3117887	27841	99,11	0,89
600 F	3131364	14364	99,54	0,46
600 G	3123407	22321	99,29	0,71
600 H	3112231	33497	98,94	1,06
600 I	3129027	16701	99,47	0,53
600 J	3117017	28711	99,09	0,91

601	Black Count	White Count	Black %	White %
601 Mean	3115207,4	30520,6	99,03	0,97
601 Std. Dev.	19466,36	19466,36	0,62	0,62
601 A	3115374	30354	99,04	0,96
601 B	3105694	40034	98,73	1,27
601 C	3073237	72491	97,7	2,3
601 D	3138920	6808	99,78	0,22
601 E	3127697	18031	99,43	0,57
601 F	3101872	43856	98,61	1,39
601 G	3137996	7732	99,75	0,25
601 H	3110969	34759	98,9	1,1
601 I	3126322	19406	99,38	0,62
601 J	3113993	31735	98,99	1,01

602	Black Count	White Count	Black %	White %
602 Mean	3117958,5	27769,5	99,12	0,88

602 Std. Dev.	15164,93	15164,93	0,48	0,48
602 A	3132326	13402	99,57	0,43
602 B	3138957	6771	99,78	0,22
602 C	3129764	15964	99,49	0,51
602 D	3116209	29519	99,06	0,94
602 E	3102811	42917	98,64	1,36
602 F	3088655	57073	98,19	1,81
602 G	3128146	17582	99,44	0,56
602 H	3109054	36674	98,83	1,17
602 I	3115067	30661	99,03	0,97
602 J	3118596	27132	99,14	0,86

603	Black Count	White Count	Black %	White %
603 Mean	3113970,5	31757,5	98,99	1,01
603 Std. Dev.	8093,36	8093,36	0,26	0,26
603 A	3108529	37199	98,82	1,18
603 B	3109320	36408	98,84	1,16
603 C	3116197	29531	99,06	0,94
603 D	3119552	26176	99,17	0,83
603 E	3101943	43785	98,61	1,39
603 F	3114655	31073	99,01	0,99
603 G	3119668	26060	99,17	0,83
603 H	3106462	39266	98,75	1,25
603 I	3113057	32671	98,96	1,04
603 J	3130322	15406	99,51	0,49

346	Black Count	White Count	Black %	White %
346 Mean	3103950,1	41777,9	98,67	1,33
346 Std. Dev.	17316,74	17316,74	0,55	0,55
346 A	3080479	65249	97,93	2,07
346 B	3121190	24538	99,22	0,78
346 C	3123751	21977	99,30	0,70
346 D	3116575	29153	99,07	0,93
346 E	3102440	43288	98,62	1,38
346 F	3087412	58316	98,15	1,85
346 G	3105181	40547	98,71	1,29
346 H	3113151	32577	98,96	1,04
346 I	3075107	70621	97,76	2,24
346 J	3114215	31513	99,00	1,00

347	Black Count	White Count	Black %	White %
347 Mean	3097330,3	48397,7	98,46	1,54
347 Std. Dev.	26355,22	26355,22	0,84	0,84
347 A	3077458	68270	97,83	2,17
347 B	3031220	114508	96,36	3,64
347 C	3096273	49455	98,43	1,57
347 D	3118825	26903	99,14	0,86
347 E	3111050	34678	98,9	1,1
347 F	3115533	30195	99,04	0,96
347 G	3106197	39531	98,74	1,26
347 H	3110304	35424	98,87	1,13
347 I	3112887	32841	98,96	1,04
347 J	3093556	52172	98,34	1,66

348	Black Count	White Count	Black %	White %
348 Mean	3111341,5	34386,5	98,91	1,09
348 Std. Dev.	30945,58	30945,58	0,98	0,98
348 A	3041045	104683	96,67	3,33
348 B	3142684	3044	99,9	0,1
348 C	3075039	70689	97,75	2,25
348 D	3126459	19269	99,39	0,61
348 E	3126459	19269	99,39	0,61
348 F	3135565	10163	99,68	0,32
348 G	3125604	20124	99,36	0,64
348 H	3113459	32269	98,97	1,03
348 I	3105957	39771	98,74	1,26
348 J	3121144	24584	99,22	0,78

349	Black Count	White Count	Black %	White %
349 Mean	3102167,8	43560,2	98,62	1,39
349 Std. Dev.	15845,25	15845,25	0,5	0,5
349 A	3108332	37396	98,81	1,19
349 B	3135803	9925	99,68	0,32
349 C	3119729	25999	99,17	0,83
349 D	3089031	56697	98,2	1,8
349 E	3105750	39978	98,73	1,27
349 F	3097473	48255	98,47	1,53
349 G	3083714	62014	98,03	1,97

349 H	3090635	55093	98,25	1,75
349 I	3092885	52843	98,32	1,68
349 J	3098326	47402	98,49	1,51
<hr/>				
354	Black Count	White Count	Black %	White %
354 Mean	3109029,9	36698,1	98,83	1,17
354 Std. Dev.	15166,99	15166,99	0,48	0,48
354 A	3106060	39668	98,74	1,26
354 B	3101002	44726	98,58	1,42
354 C	3079562	66166	97,9	2,1
354 D	3117064	28664	99,09	0,91
354 E	3117948	27780	99,12	0,88
354 F	3123285	22443	99,29	0,71
354 G	3131599	14129	99,55	0,45
354 H	3092888	52840	98,32	1,68
354 I	3112381	33347	98,94	1,06
354 J	3108510	37218	98,82	1,18
<hr/>				
355	Black Count	White Count	Black %	White %
355 Mean	3109168,3	36559,7	98,84	1,16
355 Std. Dev.	16421,36	16421,36	0,52	0,52
355 A	3076115	69613	97,79	2,21
355 B	3085296	60432	98,08	1,92
355 C	3106789	38939	98,76	1,24
355 D	3111974	33754	98,93	1,07
355 E	3122391	23337	99,26	0,74
355 F	3118931	26797	99,15	0,85
355 G	3106646	39082	98,76	1,24
355 H	3116537	29191	99,07	0,93
355 I	3125657	20071	99,36	0,64
355 J	3121347	24381	99,22	0,78
<hr/>				
356	Black Count	White Count	Black %	White %
356 Mean	3104493	41235	98,69	1,31
356 Std. Dev.	16387,82	16387,82	0,52	0,52
356 A	3096209	49519	98,43	1,57
356 B	3103295	42433	98,65	1,35
356 C	3114146	31582	99	1
356 D	3126968	18760	99,4	0,6

356 E	3127074	18654	99,41	0,59
356 F	3090404	55324	98,24	1,76
356 G	3116369	29359	99,07	0,93
356 H	3092128	53600	98,3	1,7
356 I	3100930	44798	98,58	1,42
356 J	3077407	68321	97,83	2,17
<hr/>				
357	Black Count	White Count	Black %	White %
357 Mean	3096954	48774	98,45	1,55
357 Std. Dev.	19892,24	19892,24	0,63	0,63
357 A	3076482	69246	97,8	2,2
357 B	3116770	28958	99,08	0,92
357 C	3113944	31784	98,99	1,01
357 D	3086655	59073	98,12	1,88
357 E	3069178	76550	97,57	2,43
357 F	3130571	15157	99,52	0,48
357 G	3080742	64986	97,93	2,07
357 H	3087856	57872	98,16	1,84
357 I	3106617	39111	98,76	1,24
357 J	3100725	45003	98,57	1,43
<hr/>				
592	Black Count	White Count	Black %	White %
592 Mean	3134815,2	10912,8	99,65	0,35
592 Std. Dev.	9950,47	9950,47	0,32	0,32
592 A	3135386	10342	99,67	0,33
592 B	3137443	8285	99,74	0,26
592 C	3133145	12583	99,6	0,4
592 D	3137933	7795	99,75	0,25
592 E	3138579	7149	99,77	0,23
592 F	3132532	13196	99,58	0,42
592 G	3108666	37062	98,82	1,18
592 H	3144957	771	99,98	0,02
592 I	3136880	8848	99,72	0,28
592 J	3142631	3097	99,9	0,1
<hr/>				
593	Black Count	White Count	Black %	White %
593 Mean	3125742,7	19985,3	99,37	0,63
593 Std. Dev.	14759,01	14759,01	0,47	0,47
593 A	3134286	11442	99,64	0,36

593 B	3132169	13559	99,57	0,43
593 C	3138067	7661	99,76	0,24
593 D	3117339	28389	99,1	0,9
593 E	3105810	39918	98,73	1,27
593 F	3097658	48070	98,47	1,53
593 G	3140045	5683	99,82	0,18
593 H	3138143	7585	99,76	0,24
593 I	3133133	12595	99,6	0,4
593 J	3120777	24951	99,21	0,79
<hr/>				
594	Black Count	White Count	Black %	White %
594 Mean	3138456,4	7271,6	99,77	0,23
594 Std. Dev.	3383,98	3383,98	0,11	0,11
594 A	3132671	13057	99,58	0,42
594 B	3134616	11112	99,65	0,35
594 C	3141310	4418	99,86	0,14
594 D	3139113	6615	99,79	0,21
594 E	3143050	2678	99,91	0,09
594 F	3138456	7272	99,77	0,23
594 G	3139191	6537	99,79	0,21
594 H	3135854	9874	99,69	0,31
594 I	3137691	8037	99,74	0,26
594 J	3142612	3116	99,9	0,1
<hr/>				
595	Black Count	White Count	Black %	White %
595 Mean	3139714,4	6013,6	99,81	0,19
595 Std. Dev.	2925,69	2925,69	0,09	0,09
595 A	3142789	2939	99,91	0,09
595 B	3140643	5085	99,84	0,16
595 C	3139998	5730	99,82	0,18
595 D	3137689	8039	99,74	0,26
595 E	3133303	12425	99,61	0,39
595 F	3137179	8549	99,73	0,27
595 G	3141972	3756	99,88	0,12
595 H	3142434	3294	99,9	0,1
595 I	3139843	5885	99,81	0,19
595 J	3141294	4434	99,86	0,14
<hr/>				
596	Black Count	White Count	Black %	White %

596 Mean	3136009,4	9718,6	99,69	0,31
596 Std. Dev.	5672,66	5672,66	0,18	0,18
596 A	3132492	13236	99,58	0,42
596 B	3139120	6608	99,79	0,21
596 C	3124235	21493	99,32	0,68
596 D	3144418	1310	99,96	0,04
596 E	3138428	7300	99,77	0,23
596 F	3133186	12542	99,6	0,4
596 G	3131996	13732	99,56	0,44
596 H	3139862	5866	99,81	0,19
596 I	3139600	6128	99,81	0,19
596 J	3136757	8971	99,71	0,29

597	Black Count	White Count	Black %	White %
597 Mean	3142375,5	3352,5	99,89	0,11
597 Std. Dev.	2056,29	2056,29	0,06	0,06
597 A	3143516	2212	99,93	0,07
597 B	3139211	6517	99,79	0,21
597 C	3141600	4128	99,87	0,13
597 D	3141347	4381	99,86	0,14
597 E	3141587	4141	99,87	0,13
597 F	3145182	546	99,98	0,02
597 G	3143991	1737	99,94	0,06
597 H	3143924	1804	99,94	0,06
597 I	3144007	1721	99,95	0,05
597 J	3139390	6338	99,8	0,2

598	Black Count	White Count	Black %	White %
598 Mean	3140998,9	4729,1	99,85	0,15
598 Std. Dev.	2649,59	2649,59	0,08	0,08
598 A	3145495	233	99,99	0,01
598 B	3138192	7536	99,76	0,24
598 C	3140027	5701	99,82	0,18
598 D	3142087	3641	99,88	0,12
598 E	3140475	5253	99,83	0,17
598 F	3141511	4217	99,87	0,13
598 G	3141297	4431	99,86	0,14
598 H	3144468	1260	99,96	0,04
598 I	3136663	9065	99,71	0,29



598 J	3139774	5954	99,81	0,19
599	Black Count	White Count	Black %	White %
599 Mean	3131173,5	14554,5	99,54	0,46
599 Std. Dev.	10610,58	10610,58	0,34	0,34
599 A	3117504	28224	99,1	0,9
599 B	3131148	14580	99,54	0,46
599 C	3131148	14580	99,54	0,46
599 D	3141811	3917	99,88	0,12
599 E	3139824	5904	99,81	0,19
599 F	3143507	2221	99,93	0,07
599 G	3133793	11935	99,62	0,38
599 H	3123871	21857	99,31	0,69
599 I	3137579	8149	99,74	0,26
599 J	3111550	34178	98,91	1,09
362	Black Count	White Count	Black %	White %
362 Mean	3119435,3	26292,7	99,16	0,84
362 Std. Dev.	10208,62	10208,62	0,32	0,32
362 A	3119821	25907	99,18	0,82
362 B	3117026	28702	99,09	0,91
362 C	3108187	37541	98,81	1,19
362 D	3119426	26302	99,16	0,84
362 E	3113569	32159	98,98	1,02
362 F	3127538	18190	99,42	0,58
362 G	3136670	9058	99,71	0,29
362 H	3131807	13921	99,56	0,44
362 I	3103711	42017	98,66	1,34
362 J	3116598	29130	99,07	0,93
363	Black Count	White Count	Black %	White %
363 Mean	3112678,7	33049,3	98,95	1,05
363 Std. Dev.	22416,42	22416,42	0,71	0,71
363 A	3100448	45280	98,56	1,44
363 B	3126871	18857	99,4	0,6
363 C	3119314	26414	99,16	0,84
363 D	3070487	75241	97,61	2,39
363 E	3076177	69551	97,79	2,21
363 F	3131241	14487	99,54	0,46

363 G	3126802	18926	99,4	0,6
363 H	3123445	22283	99,29	0,71
363 I	3126051	19677	99,37	0,63
363 J	3125951	19777	99,37	0,63

364	Black Count	White Count	Black %	White %
364 Mean	3113599	32129	98,98	1,02
364 Std. Dev.	28998,03	28998,03	0,92	0,92
364 A	3139505	6223	99,8	0,2
364 B	3040804	104924	96,66	3,34
364 C	3097237	48491	98,46	1,54
364 D	3129070	16658	99,47	0,53
364 E	3118374	27354	99,13	0,87
364 F	3115516	30212	99,04	0,96
364 G	3102086	43642	98,61	1,39
364 H	3132362	13366	99,58	0,42
364 I	3132401	13327	99,58	0,42
364 J	3128635	17093	99,46	0,54

365	Black Count	White Count	Black %	White %
365 Mean	3120327,3	25400,7	99,19	0,81
365 Std. Dev.	12569,73	12569,73	0,4	0,4
365 A	3135293	10435	99,67	0,33
365 B	3118768	26960	99,14	0,86
365 C	3136707	9021	99,71	0,29
365 D	3123338	22390	99,29	0,71
365 E	3114053	31675	98,99	1,01
365 F	3132413	13315	99,58	0,42
365 G	3115981	29747	99,05	0,95
365 H	3107263	38465	98,78	1,22
365 I	3097108	48620	98,45	1,55
365 J	3122349	23379	99,26	0,74

358	Black Count	White Count	Black %	White %
358 Mean	3072452,5	73275,5	97,67	2,33
358 Std. Dev.	26566,19	26566,19	0,84	0,84
358 A	3098182	47546	98,49	1,51
358 B	3085875	59853	98,1	1,9
358 C	3076367	69361	97,8	2,2

358 D	3047475	98253	96,88	3,12
358 E	3079110	66618	97,88	2,12
358 F	3118182	27546	99,12	0,88
358 G	3081082	64646	97,94	2,06
358 H	3065651	80077	97,45	2,55
358 I	3036702	109026	96,53	3,47
358 J	3035899	109829	96,51	3,49

359	Black Count	White Count	Black %	White %
359 Mean	3139247	6481	99,79	0,21
359 Std. Dev.	3207,34	3207,34	0,1	0,1
359 A	3137145	8583	99,73	0,27
359 B	3132435	13293	99,58	0,42
359 C	3135577	10151	99,68	0,32
359 D	3141134	4594	99,85	0,15
359 E	3140513	5215	99,83	0,17
359 F	3142519	3209	99,9	0,1
359 G	3139557	6171	99,8	0,2
359 H	3141701	4027	99,87	0,13
359 I	3141465	4263	99,86	0,14
359 J	3140424	5304	99,83	0,17

360	Black Count	White Count	Black %	White %
360 Mean	3133710,8	12017,2	99,62	0,38
360 Std. Dev.	4848,57	4848,57	0,16	0,16
360 A	3136084	9644	99,69	0,31
360 B	3138682	7046	99,78	0,22
360 C	3138670	7058	99,78	0,22
360 D	3130054	15674	99,5	0,5
360 E	3127891	17837	99,43	0,57
360 F	3131659	14069	99,55	0,45
360 G	3139944	5784	99,82	0,18
360 H	3136825	8903	99,72	0,28
360 I	3130293	15435	99,51	0,49
360 J	3127006	18722	99,4	0,6

361	Black Count	White Count	Black %	White %
361 Mean	3139610,5	6117,5	99,8	0,2
361 Std. Dev.	5155,98	5155,98	0,17	0,17

361 A	3141642	4086	99,87	0,13
361 B	3139064	6664	99,79	0,21
361 C	3138250	7478	99,76	0,24
361 D	3144097	1631	99,95	0,05
361 E	3145072	656	99,98	0,02
361 F	3142773	2955	99,91	0,09
361 G	3139247	6481	99,79	0,21
361 H	3126611	19117	99,39	0,61
361 I	3138279	7449	99,76	0,24
361 J	3141070	4658	99,85	0,15

366	Black Count	White Count	Black %	White %
366 Mean	3141057,2	4670,8	99,85	0,15
366 Std. Dev.	2054,23	2054,23	0,07	0,07
366 A	3137593	8135	99,74	0,26
366 B	3141203	4525	99,86	0,14
366 C	3140230	5498	99,83	0,17
366 D	3138414	7314	99,77	0,23
366 E	3140733	4995	99,84	0,16
366 F	3143723	2005	99,94	0,06
366 G	3142342	3386	99,89	0,11
366 H	3140484	5244	99,83	0,17
366 I	3143954	1774	99,94	0,06
366 J	3141896	3832	99,88	0,12

367	Black Count	White Count	Black %	White %
367 Mean	3136262	9466	99,7	0,3
367 Std. Dev.	7432,62	7432,62	0,24	0,24
367 A	3126459	19269	99,39	0,61
367 B	3141477	4251	99,86	0,14
367 C	3145728	0	100	0
367 D	3133232	12496	99,6	0,4
367 E	3144650	1078	99,97	0,03
367 F	3139641	6087	99,81	0,19
367 G	3131482	14246	99,55	0,45
367 H	3143096	2632	99,92	0,08
367 I	3127711	18017	99,43	0,57
367 J	3129144	16584	99,47	0,53

368	Black Count	White Count	Black %	White %
368 Mean	3141461,09	4266,91	99,86	0,14
368 Std. Dev.	2496,99	2496,99	0,08	0,08
368 A	3145727	1	100	0
368 B	3141586	4142	99,87	0,13
368 C	3139121	6607	99,79	0,21
368 D	3142485	3243	99,9	0,1
368 E	3141470	4258	99,86	0,14
368 F	3137478	8250	99,74	0,26
368 G	3139222	6506	99,79	0,21
368 H	3140764	4964	99,84	0,16
368 I	3145384	344	99,99	0,01
368 J	3142071	3657	99,88	0,12

369	Black Count	White Count	Black %	White %
369 Mean	3141308,7	4419,3	99,86	0,14
369 Std. Dev.	2609,1	2609,1	0,08	0,08
369 A	3145391	337	99,99	0,01
369 B	3144018	1710	99,95	0,05
369 C	3143988	1740	99,94	0,06
369 D	3138888	6840	99,78	0,22
369 E	3142058	3670	99,88	0,12
369 F	3139559	6169	99,8	0,2
369 G	3141811	3917	99,88	0,12
369 H	3139927	5801	99,82	0,18
369 I	3137131	8597	99,73	0,27
369 J	3140316	5412	99,83	0,17

584	Black Count	White Count	Black %	White %
584 Mean	3126091,1	19636,9	99,38	0,62
584 Std. Dev.	7528,2	7528,2	0,24	0,24
584 A	3114793	30935	99,02	0,98
584 B	3123612	22116	99,3	0,7
584 C	3122076	23652	99,25	0,75
584 D	3130652	15076	99,52	0,48
584 E	3117758	27970	99,11	0,89
584 F	3126924	18804	99,4	0,6
584 G	3132686	13042	99,59	0,41
584 H	3122099	23629	99,25	0,75

584 I	3130388	15340	99,51	0,49
584 J	3139923	5805	99,82	0,18
585	Black Count	White Count	Black %	White %
585 Mean	3136150,7	9577,3	99,69	0,31
585 Std. Dev.	2378,64	2378,64	0,08	0,08
585 A	3134246	11482	99,63	0,37
585 B	3133946	11782	99,63	0,37
585 C	3140039	5689	99,82	0,18
585 D	3135125	10603	99,66	0,34
585 E	3134961	10767	99,66	0,34
585 F	3140634	5094	99,84	0,16
585 G	3137241	8487	99,73	0,27
585 H	3135457	10271	99,67	0,33
585 I	3135143	10585	99,66	0,34
585 J	3134715	11013	99,65	0,35
586	Black Count	White Count	Black %	White %
586 Mean	3132111,4	13616,6	99,57	0,43
586 Std. Dev.	5119,99	5119,99	0,16	0,16
586 A	3121949	23779	99,24	0,76
586 B	3125315	20413	99,35	0,65
586 C	3128318	17410	99,45	0,55
586 D	3136532	9196	99,71	0,29
586 E	3136093	9635	99,69	0,31
586 F	3134436	11292	99,64	0,36
586 G	3135210	10518	99,67	0,33
586 H	3133857	11871	99,62	0,38
586 I	3133089	12639	99,6	0,4
586 J	3136315	9413	99,7	0,3
587	Black Count	White Count	Black %	White %
587 Mean	3129593,4	16134,6	99,49	0,51
587 Std. Dev.	4475,55	4475,55	0,14	0,14
587 A	3124569	21159	99,33	0,67
587 B	3128061	17667	99,44	0,56
587 C	3123355	22373	99,29	0,71
587 D	3127610	18118	99,42	0,58
587 E	3131022	14706	99,53	0,47

587 F	3129989	15739	99,5	0,5
587 G	3131905	13823	99,56	0,44
587 H	3128015	17713	99,44	0,56
587 I	3139248	6480	99,79	0,21
587 J	3132160	13568	99,57	0,43
<hr/>				
604	Black Count	White Count	Black %	White %
604 Mean	3127854,1	17873,9	99,43	0,57
604 Std. Dev.	6233,8	6233,8	0,2	0,2
604 A	3125089	20639	99,34	0,66
604 B	3127179	18549	99,41	0,59
604 C	3114361	31367	99	1
604 D	3135977	9751	99,69	0,31
604 E	3122064	23664	99,25	0,75
604 F	3130495	15233	99,52	0,48
604 G	3134437	11291	99,64	0,36
604 H	3129549	16179	99,49	0,51
604 I	3129460	16268	99,48	0,52
604 J	3129930	15798	99,5	0,5
<hr/>				
605	Black Count	White Count	Black %	White %
605 Mean	3141193,2	4534,8	99,86	0,14
605 Std. Dev.	2546,95	2546,95	0,08	0,08
605 A	3143086	2642	99,92	0,08
605 B	3142472	3256	99,9	0,1
605 C	3141305	4423	99,86	0,14
605 D	3143375	2353	99,93	0,07
605 E	3141681	4047	99,87	0,13
605 F	3141370	4358	99,86	0,14
605 G	3135624	10104	99,68	0,32
605 H	3139323	6405	99,8	0,2
605 I	3139323	6405	99,8	0,2
605 J	3144373	1355	99,96	0,04
<hr/>				
606	Black Count	White Count	Black %	White %
606 Mean	3133725,5	12002,5	99,62	0,38
606 Std. Dev.	11987,15	11987,15	0,38	0,38
606 A	3132861	12867	99,59	0,41
606 B	3136131	9597	99,69	0,31

606 C	3137326	8402	99,73	0,27
606 D	3142301	3427	99,89	0,11
606 E	3134306	11422	99,64	0,36
606 F	3139381	6347	99,8	0,2
606 G	3100863	44865	98,57	1,43
606 H	3135616	10112	99,68	0,32
606 I	3135797	9931	99,68	0,32
606 J	3142673	3055	99,9	0,1
<hr/>				
607	Black Count	White Count	Black %	White %
607 Mean	3136159,5	9568,5	99,7	0,3
607 Std. Dev.	5422,85	5422,85	0,17	0,17
607 A	3131113	14615	99,54	0,46
607 B	3141505	4223	99,87	0,13
607 C	3134639	11089	99,65	0,35
607 D	3130768	14960	99,52	0,48
607 E	3137256	8472	99,73	0,27
607 F	3144139	1589	99,95	0,05
607 G	3136539	9189	99,71	0,29
607 H	3129142	16586	99,47	0,53
607 I	3143551	2177	99,93	0,07
607 J	3132943	12785	99,59	0,41
<hr/>				
608	Black Count	White Count	Black %	White %
608 Mean	3132619,2	13108,8	99,58	0,42
608 Std. Dev.	6467,18	6467,18	0,21	0,21
608 A	3124101	21627	99,31	0,69
608 B	3125312	20416	99,35	0,65
608 C	3129496	16232	99,48	0,52
608 D	3130810	14918	99,53	0,47
608 E	3124940	20788	99,34	0,66
608 F	3137030	8698	99,72	0,28
608 G	3141217	4511	99,86	0,14
608 H	3139201	6527	99,79	0,21
608 I	3135894	9834	99,69	0,31
608 J	3138191	7537	99,76	0,24
<hr/>				
609	Black Count	White Count	Black %	White %
609 Mean	3116425,8	29302,2	99,07	0,93



609 Std. Dev.	17837,48	17837,48	0,57	0,57
609 A	3089472	56256	98,21	1,79
609 B	3091939	53789	98,29	1,71
609 C	3132492	13236	99,58	0,42
609 D	3106575	39153	98,76	1,24
609 E	3101775	43953	98,6	1,4
609 F	3138380	7348	99,77	0,23
609 G	3132348	13380	99,57	0,43
609 H	3130571	15157	99,52	0,48
609 I	3119570	26158	99,17	0,83
609 J	3121136	24592	99,22	0,78

610	Black Count	White Count	Black %	White %
610 Mean	3117703,7	28024,3	99,11	0,89
610 Std. Dev.	16598,35	16598,35	0,53	0,53
610 A	3110697	35031	98,89	1,11
610 B	3104440	41288	98,69	1,31
610 C	3109636	36092	98,85	1,15
610 D	3121369	24359	99,23	0,77
610 E	3124268	21460	99,32	0,68
610 F	3083857	61871	98,03	1,97
610 G	3115574	30154	99,04	0,96
610 H	3133827	11901	99,62	0,38
610 I	3135617	10111	99,68	0,32
610 J	3137752	7976	99,75	0,25

611	Black Count	White Count	Black %	White %
611 Mean	3098595,7	47132,3	98,5	1,5
611 Std. Dev.	39718,36	39718,36	1,26	1,26
611 A	3121048	24680	99,22	0,78
611 B	3125348	20380	99,35	0,65
611 C	3066241	79487	97,47	2,53
611 D	3127199	18529	99,41	0,59
611 E	3128498	17230	99,45	0,55
611 F	3136812	8916	99,72	0,28
611 G	3120590	25138	99,2	0,8
611 H	3091254	54474	98,27	1,73
611 I	3034222	111506	96,46	3,54
611 J	3034745	110983	96,47	3,53

264	Black Count	White Count	Black %	White %
264 Mean	3102062	43666	98,61	1,39
264 Std. Dev.	23453,54	23453,54	0,74	0,74
264 A	3060643	85085	97,3	2,7
264 B	3097036	48692	98,45	1,55
264 C	3099330	46398	98,53	1,47
264 D	3065360	80368	97,45	2,55
264 E	3101457	44271	98,59	1,41
264 F	3124443	21285	99,32	0,68
264 G	3106189	39539	98,74	1,26
264 H	3116749	28979	99,08	0,92
264 I	3131626	14102	99,55	0,45
264 J	3117787	27941	99,11	0,89

	Black Count	White Count	Black %	White %
265 Mean	3126450,9	19277,1	99,39	0,61
265 Std. Dev.	7279,67	7279,67	0,23	0,23
265 A	3117280	28448	99,1	0,9
265 B	3132084	13644	99,57	0,43
265 C	3131250	14478	99,54	0,46
265 D	3123779	21949	99,3	0,7
265 E	3125226	20502	99,35	0,65
265 F	3132085	13643	99,57	0,43
265 G	3112251	33477	98,94	1,06
265 H	3128519	17209	99,45	0,55
265 I	3136021	9707	99,69	0,31
265 J	3126014	19714	99,37	0,63

266	Black Count	White Count	Black %	White %
266 Mean	3128772	16956	99,46	0,54
266 Std. Dev.	8133,68	8133,68	0,26	0,26
266 A	3132727	13001	99,59	0,41
266 B	3114133	31595	99	1
266 C	3132487	13241	99,58	0,42
266 D	3139488	6240	99,8	0,2
266 E	3131592	14136	99,55	0,45
266 F	3123736	21992	99,3	0,7
266 G	3133629	12099	99,62	0,38

266 H	3126491	19237	99,39	0,61
266 I	3117600	28128	99,11	0,89
266 J	3135837	9891	99,69	0,31
<hr/>				
267	Black Count	White Count	Black %	White %
267 Mean	3121954,6	23773,4	99,24	0,76
267 Std. Dev.	15388,79	15388,79	0,49	0,49
267 A	3099045	46683	98,52	1,48
267 B	3133697	12031	99,62	0,38
267 C	3096844	48884	98,45	1,55
267 D	3133085	12643	99,6	0,4
267 E	3111584	34144	98,91	1,09
267 F	3134619	11109	99,65	0,35
267 G	3136724	9004	99,71	0,29
267 H	3125913	19815	99,37	0,63
267 I	3134115	11613	99,63	0,37
267 J	3113920	31808	98,99	1,01
<hr/>				
350	Black Count	White Count	Black %	White %
350 Mean	3112885,9	32842,1	98,95	1,04
350 Std. Dev.	20380,22	20380,22	0,65	0,65
350 A	3123489	22239	99,29	0,71
350 B	3064606	81122	97,42	2,58
350 C	3122706	23022	99,27	0,73
350 D	3130636	15092	99,52	0,48
350 E	3128833	16895	99,46	0,54
350 F	3124371	21357	99,32	0,68
350 G	3118591	27137	99,14	0,86
350 H	3092241	53487	98,3	1,7
350 I	3107481	38247	98,78	1,22
350 J	3115905	29823	99,05	0,95
<hr/>				
351	Black Count	White Count	Black %	White %
351 Mean	3086574	59154	98,12	1,88
351 Std. Dev.	28139,32	28139,32	0,89	0,89
351 A	3119539	26189	99,17	0,83
351 B	3115164	30564	99,03	0,97
351 C	3107985	37743	98,8	1,2
351 D	3095650	50078	98,41	1,59

351 E	3028303	117425	96,27	3,73
351 F	3105259	40469	98,71	1,29
351 G	3070527	75201	97,61	2,39
351 H	3065680	80048	97,46	2,54
351 I	3086641	59087	98,12	1,88
351 J	3070992	74736	97,62	2,38

352	Black Count	White Count	Black %	White %
352 Mean	3094235,1	51492,9	98,36	1,64
352 Std. Dev.	16178,02	16178,02	0,52	0,52
352 A	3108171	37557	98,81	1,19
352 B	3086982	58746	98,13	1,87
352 C	3100252	45476	98,55	1,45
352 D	3060274	85454	97,28	2,72
352 E	3110976	34752	98,9	1,1
352 F	3090730	54998	98,25	1,75
352 G	3115331	30397	99,03	0,97
352 H	3090176	55552	98,23	1,77
352 I	3081839	63889	97,97	2,03
352 J	3097620	48108	98,47	1,53

353	Black Count	White Count	Black %	White %
353 Mean	3082697,6	63030,4	98	2
353 Std. Dev.	38352,37	38352,37	1,22	1,22
353 A	3055429	90299	97,13	2,87
353 B	3079559	66169	97,9	2,1
353 C	3119151	26577	99,16	0,84
353 D	3110287	35441	98,87	1,13
353 E	2989621	156107	95,04	4,96
353 F	3073000	72728	97,69	2,31
353 G	3086000	59728	98,1	1,9
353 H	3113886	31842	98,99	1,01
353 I	3094848	50880	98,38	1,62
353 J	3105195	40533	98,71	1,29

588	Black Count	White Count	Black %	White %
588 Mean	3084196,4	61531,6	98,05	1,96
588 Std. Dev.	14806	14806	0,47	0,47
588 A	3097503	48225	98,47	1,53

588 B	3072080	73648	97,66	2,34
588 C	3056033	89695	97,15	2,85
588 D	3096236	49492	98,43	1,57
588 E	3087375	58353	98,15	1,85
588 F	3105018	40710	98,71	1,29
588 G	3093880	51848	98,35	1,65
588 H	3081011	64717	97,94	2,06
588 I	3081011	64717	97,94	2,06
588 J	3071817	73911	97,65	2,35
<hr/>				
589	Black Count	White Count	Black %	White %
589 Mean	3091180,5	54547,5	98,27	1,73
589 Std. Dev.	37510,86	37510,86	1,19	1,19
589 A	3101006	44722	98,58	1,42
589 B	3115403	30325	99,04	0,96
589 C	3053518	92210	97,07	2,93
589 D	3009172	136556	95,66	4,34
589 E	3103266	42462	98,65	1,35
589 F	3086140	59588	98,11	1,89
589 G	3112037	33691	98,93	1,07
589 H	3080648	65080	97,93	2,07
589 I	3105436	40292	98,72	1,28
589 J	3145179	549	99,98	0,02
<hr/>				
590	Black Count	White Count	Black %	White %
590 Mean	3113267,9	32460,1	98,97	1,03
590 Std. Dev.	11960,57	11960,57	0,38	0,38
590 A	3130315	15413	99,51	0,49
590 B	3103791	41937	98,67	1,33
590 C	3123479	22249	99,29	0,71
590 D	3113744	31984	98,98	1,02
590 E	3104668	41060	98,69	1,31
590 F	3096679	49049	98,44	1,56
590 G	3114955	30773	99,02	0,98
590 H	3130259	15469	99,51	0,49
590 I	3114210	31518	99	1
590 J	3100579	45149	98,56	1,44
<hr/>				
591	Black Count	White Count	Black %	White %

591 Mean	3106039,2	39688,8	98,74	1,26
591 Std. Dev.	14829,73	14829,73	0,47	0,47
591 A	3132796	12932	99,59	0,41
591 B	3120288	25440	99,19	0,81
591 C	3082613	63115	97,99	2,01
591 D	3092718	53010	98,31	1,69
591 E	3108012	37716	98,8	1,2
591 F	3105758	39970	98,73	1,27
591 G	3096057	49671	98,42	1,58
591 H	3117324	28404	99,1	0,9
591 I	3096215	49513	98,43	1,57
591 J	3108611	37117	98,82	1,18

600	Black Count	White Count	Black %	White %
600 Mean	3109687,1	36040,9	98,85	1,15
600 Std. Dev.	18387,49	18387,49	0,58	0,58
600 A	3094352	51376	98,37	1,63
600 B	3105882	39846	98,73	1,27
600 C	3092686	53042	98,31	1,69
600 D	3073018	72710	97,69	2,31
600 E	3117887	27841	99,11	0,89
600 F	3131364	14364	99,54	0,46
600 G	3123407	22321	99,29	0,71
600 H	3112231	33497	98,94	1,06
600 I	3129027	16701	99,47	0,53
600 J	3117017	28711	99,09	0,91

601	Black Count	White Count	Black %	White %
601 Mean	3115207,4	30520,6	99,03	0,97
601 Std. Dev.	19466,36	19466,36	0,62	0,62
601 A	3115374	30354	99,04	0,96
601 B	3105694	40034	98,73	1,27
601 C	3073237	72491	97,7	2,3
601 D	3138920	6808	99,78	0,22
601 E	3127697	18031	99,43	0,57
601 F	3101872	43856	98,61	1,39
601 G	3137996	7732	99,75	0,25
601 H	3110969	34759	98,9	1,1
601 I	3126322	19406	99,38	0,62

601 J	3113993	31735	98,99	1,01
602	Black Count	White Count	Black %	White %
602 Mean	3117958,5	27769,5	99,12	0,88
602 Std. Dev.	15164,93	15164,93	0,48	0,48
602 A	3132326	13402	99,57	0,43
602 B	3138957	6771	99,78	0,22
602 C	3129764	15964	99,49	0,51
602 D	3116209	29519	99,06	0,94
602 E	3102811	42917	98,64	1,36
602 F	3088655	57073	98,19	1,81
602 G	3128146	17582	99,44	0,56
602 H	3109054	36674	98,83	1,17
602 I	3115067	30661	99,03	0,97
602 J	3118596	27132	99,14	0,86
603	Black Count	White Count	Black %	White %
603 Mean	3113970,5	31757,5	98,99	1,01
603 Std. Dev.	8093,36	8093,36	0,26	0,26
603 A	3108529	37199	98,82	1,18
603 B	3109320	36408	98,84	1,16
603 C	3116197	29531	99,06	0,94
603 D	3119552	26176	99,17	0,83
603 E	3101943	43785	98,61	1,39
603 F	3114655	31073	99,01	0,99
603 G	3119668	26060	99,17	0,83
603 H	3106462	39266	98,75	1,25
603 I	3113057	32671	98,96	1,04
603 J	3130322	15406	99,51	0,49
778	Black Count	White Count	Black %	White %
778 Mean	3104893,6	40834,4	98,7	1,3
778 Std. Dev.	10721,88	10721,88	0,34	0,34
778 A	3106587	39141	98,76	1,24
778 B	3095593	50135	98,41	1,59
778 C	3110133	35595	98,87	1,13
778 D	3111973	33755	98,93	1,07
778 E	3102094	43634	98,61	1,39
778 F	3081983	63745	97,97	2,03

778 G	3101587	44141	98,6	1,4
778 H	3118613	27115	99,14	0,86
778 I	3103871	41857	98,67	1,33
778 J	3116502	29226	99,07	0,93

779	Black Count	White Count	Black %	White %
779 Mean	3115885,3	29842,7	99,05	0,95
779 Std. Dev.	12608,1	12608,1	0,4	0,4
779 A	3124373	21355	99,32	0,68
779 B	3108166	37562	98,81	1,19
779 C	3103895	41833	98,67	1,33
779 D	3101817	43911	98,6	1,4
779 E	3099586	46142	98,53	1,47
779 F	3137240	8488	99,73	0,27
779 G	3113889	31839	98,99	1,01
779 H	3119142	26586	99,15	0,85
779 I	3120841	24887	99,21	0,79
779 J	3129904	15824	99,5	0,5

780	Black Count	White Count	Black %	White %
780 Mean	3108427,1	37300,9	98,81	1,19
780 Std. Dev.	13336,91	13336,91	0,42	0,42
780 A	3113699	32029	98,98	1,02
780 B	3110244	35484	98,87	1,13
780 C	3112542	33186	98,95	1,05
780 D	3109349	36379	98,84	1,16
780 E	3123204	22524	99,28	0,72
780 F	3120144	25584	99,19	0,81
780 G	3098161	47567	98,49	1,51
780 H	3112504	33224	98,94	1,06
780 I	3108772	36956	98,83	1,17
780 J	3075652	70076	97,77	2,23

781	Black Count	White Count	Black %	White %
781 Mean	3108748,2	36979,8	98,82	1,18
781 Std. Dev.	11248,08	11248,08	0,36	0,36
781 A	3110527	35201	98,88	1,12
781 B	3103354	42374	98,65	1,35
781 C	3113013	32715	98,96	1,04



781 D	3107677	38051	98,79	1,21
781 E	3105960	39768	98,74	1,26
781 F	3110150	35578	98,87	1,13
781 G	3116935	28793	99,08	0,92
781 H	3122134	23594	99,25	0,75
781 I	3116696	29032	99,08	0,92
781 J	3081036	64692	97,94	2,06

---

782	Black Count	White Count	Black %	White %
782 Mean	3116329,7	29398,3	99,07	0,93
782 Std. Dev.	10670,11	10670,11	0,34	0,34
782 A	3129049	16679	99,47	0,53
782 B	3122618	23110	99,27	0,73
782 C	3117056	28672	99,09	0,91
782 D	3123542	22186	99,29	0,71
782 E	3091820	53908	98,29	1,71
782 F	3127057	18671	99,41	0,59
782 G	3110268	35460	98,87	1,13
782 H	3114801	30927	99,02	0,98
782 I	3113979	31749	98,99	1,01
782 J	3113107	32621	98,96	1,04

---

783	Black Count	White Count	Black %	White %
783 Mean	3118877,1	26850,9	99,15	0,85
783 Std. Dev.	14108,64	14108,64	0,45	0,45
783 A	3128105	17623	99,44	0,56
783 B	3102722	43006	98,63	1,37
783 C	3132120	13608	99,57	0,43
783 D	3103060	42668	98,64	1,36
783 E	3112877	32851	98,96	1,04
783 F	3128689	17039	99,46	0,54
783 G	3127241	18487	99,41	0,59
783 H	3097667	48061	98,47	1,53
783 I	3138042	7686	99,76	0,24
783 J	3118248	27480	99,13	0,87

---

784	Black Count	White Count	Black %	White %
784 Mean	3122087,1	23640,9	99,25	0,75
784 Std. Dev.	12802,81	12802,81	0,41	0,41

784 A	3102590	43138	98,63	1,37
784 B	3116663	29065	99,08	0,92
784 C	3126685	19043	99,39	0,61
784 D	3124359	21369	99,32	0,68
784 E	3099324	46404	98,52	1,48
784 F	3139291	6437	99,8	0,2
784 G	3130198	15530	99,51	0,49
784 H	3134449	11279	99,64	0,36
784 I	3124575	21153	99,33	0,67
784 J	3122737	22991	99,27	0,73

785	Black Count	White Count	Black %	White %
785 Mean	3119632,5	26095,5	99,17	0,83
785 Std. Dev.	8199,55	8199,55	0,26	0,26
785 A	3123670	22058	99,3	0,7
785 B	3134960	10768	99,66	0,34
785 C	3120941	24787	99,21	0,79
785 D	3108430	37298	98,81	1,19
785 E	3117833	27895	99,11	0,89
785 F	3115072	30656	99,03	0,97
785 G	3109132	36596	98,84	1,16
785 H	3120842	24886	99,21	0,79
785 I	3116731	28997	99,08	0,92
785 J	3128714	17014	99,46	0,54

786	Black Count	White Count	Black %	White %
786 Mean	3118378,4	27349,6	99,13	0,87
786 Std. Dev.	9178,26	9178,26	0,29	0,29
786 A	3113330	32398	98,97	1,03
786 B	3127701	18027	99,43	0,57
786 C	3115681	30047	99,04	0,96
786 D	3113657	32071	98,98	1,02
786 E	3103340	42388	98,65	1,35
786 F	3123622	22106	99,3	0,7
786 G	3131533	14195	99,55	0,45
786 H	3117817	27911	99,11	0,89
786 I	3108827	36901	98,83	1,17
786 J	3128276	17452	99,45	0,55

787	Black Count	White Count	Black %	White %
787 Mean	3118593,7	27134,3	99,14	0,86
787 Std. Dev.	6508,7	6508,7	0,21	0,21
787 A	3117659	28069	99,11	0,89
787 B	3109201	36527	98,84	1,16
787 C	3126852	18876	99,4	0,6
787 D	3109398	36330	98,85	1,15
787 E	3124532	21196	99,33	0,67
787 F	3124065	21663	99,31	0,69
787 G	3120234	25494	99,19	0,81
787 H	3112054	33674	98,93	1,07
787 I	3123925	21803	99,31	0,69
787 J	3118017	27711	99,12	0,88

788	Black Count	White Count	Black %	White %
788 Mean	3125788,1	19939,9	99,37	0,63
788 Std. Dev.	7527,97	7527,97	0,24	0,24
788 A	3133223	12505	99,6	0,4
788 B	3127987	17741	99,44	0,56
788 C	3132282	13446	99,57	0,43
788 D	3129235	16493	99,48	0,52
788 E	3109060	36668	98,83	1,17
788 F	3132904	12824	99,59	0,41
788 G	3127125	18603	99,41	0,59
788 H	3124590	21138	99,33	0,67
788 I	3118375	27353	99,13	0,87
788 J	3123100	22628	99,28	0,72

789	Black Count	White Count	Black %	White %
789 Mean	3131295,3	14432,7	99,54	0,46
789 Std. Dev.	4426,33	4426,33	0,14	0,14
789 A	3128698	17030	99,46	0,54
789 B	3137116	8612	99,73	0,27
789 C	3124607	21121	99,33	0,67
789 D	3127311	18417	99,41	0,59
789 E	3130122	15606	99,5	0,5
789 F	3128548	17180	99,45	0,55
789 G	3134908	10820	99,66	0,34
789 H	3135747	9981	99,68	0,32

789 I	3129217	16511	99,48	0,52
789 J	3136679	9049	99,71	0,29

886	Black Count	White Count	Black %	White %
886 Mean	3116155,3	29572,7	99,06	0,94
886 Std. Dev.	19504,15	19504,15	0,62	0,62
886 A	3140538	5190	99,84	0,16
886 B	3067830	77898	97,52	2,48
886 C	3125929	19799	99,37	0,63
886 D	3119078	26650	99,15	0,85
886 E	3126461	19267	99,39	0,61
886 F	3107518	38210	98,79	1,21
886 G	3117971	27757	99,12	0,88
886 H	3108037	37691	98,8	1,2
886 I	3126711	19017	99,4	0,6
886 J	3121480	24248	99,23	0,77

887	Black Count	White Count	Black %	White %
887 Mean	3112527,9	33200,1	98,94	1,06
887 Std. Dev.	12682,13	12682,13	0,4	0,4
887 A	3121897	23831	99,24	0,76
887 B	3128163	17565	99,44	0,56
887 C	3124137	21591	99,31	0,69
887 D	3117283	28445	99,1	0,9
887 E	3109614	36114	98,85	1,15
887 F	3105301	40427	98,71	1,29
887 G	3116358	29370	99,07	0,93
887 H	3083105	62623	98,01	1,99
887 I	3110395	35333	98,88	1,12
887 J	3109026	36702	98,83	1,17

888	Black Count	White Count	Black %	White %
888 Mean	3122626,9	23101,1	99,27	0,73
888 Std. Dev.	7305,19	7305,19	0,23	0,23
888 A	3128058	17670	99,44	0,56
888 B	3104041	41687	98,67	1,33
888 C	3126528	19200	99,39	0,61
888 D	3127267	18461	99,41	0,59
888 E	3122091	23637	99,25	0,75

888 F	3124812	20916	99,34	0,66
888 G	3129698	16030	99,49	0,51
888 H	3119064	26664	99,15	0,85
888 I	3121761	23967	99,24	0,76
888 J	3122949	22779	99,28	0,72
889	Black Count	White Count	Black %	White %
889 Mean	3118404,1	27323,9	99,13	0,87
889 Std. Dev.	6066,81	6066,81	0,19	0,19
889 A	3125010	20718	99,34	0,66
889 B	3115738	29990	99,05	0,95
889 C	3124963	20765	99,34	0,66
889 D	3120724	25004	99,21	0,79
889 E	3110142	35586	98,87	1,13
889 F	3126590	19138	99,39	0,61
889 G	3114319	31409	99	1
889 H	3117896	27832	99,12	0,88
889 I	3119161	26567	99,16	0,84
889 J	3109498	36230	98,85	1,15
890	Black Count	White Count	Black %	White %
890 Mean	3118417,2	27310,8	99,13	0,87
890 Std. Dev.	8108,45	8108,45	0,26	0,26
890 A	3109237	36491	98,84	1,16
890 B	3122428	23300	99,26	0,74
890 C	3113576	32152	98,98	1,02
890 D	3124884	20844	99,34	0,66
890 E	3101766	43962	98,6	1,4
890 F	3125146	20582	99,35	0,65
890 G	3116390	29338	99,07	0,93
890 H	3127125	18603	99,41	0,59
890 I	3122361	23367	99,26	0,74
890 J	3121259	24469	99,22	0,78
891	Black Count	White Count	Black %	White %
891 Mean	3112857	32871	98,96	1,05
891 Std. Dev.	13960,1	13960,1	0,44	0,44
891 A	3117894	27834	99,12	0,88
891 B	3132279	13449	99,57	0,43

891 C	3103472	42256	98,66	1,34
891 D	3103075	42653	98,64	1,36
891 E	3093885	51843	98,35	1,65
891 F	3107061	38667	98,77	1,23
891 G	3097026	48702	98,45	1,55
891 H	3126028	19700	99,37	0,63
891 I	3131170	14558	99,54	0,46
891 J	3116680	29048	99,08	0,92

892	Black Count	White Count	Black %	White %
892 Mean	3111634,5	34093,5	98,92	1,08
892 Std. Dev.	16855,22	16855,22	0,54	0,54
892 A	3101697	44031	98,6	1,4
892 B	3107925	37803	98,8	1,2
892 C	3107401	38327	98,78	1,22
892 D	3092728	53000	98,32	1,68
892 E	3123635	22093	99,3	0,7
892 F	3124943	20785	99,34	0,66
892 G	3128659	17069	99,46	0,54
892 H	3080218	65510	97,92	2,08
892 I	3132828	12900	99,59	0,41
892 J	3116311	29417	99,06	0,94

893	Black Count	White Count	Black %	White %
893 Mean	3096049,3	49678,7	98,42	1,58
893 Std. Dev.	19722,66	19722,66	0,63	0,63
893 A	3094873	50855	98,38	1,62
893 B	3120544	25184	99,2	0,8
893 C	3094423	51305	98,37	1,63
893 D	3079344	66384	97,89	2,11
893 E	3115434	30294	99,04	0,96
893 F	3116287	29441	99,06	0,94
893 G	3075847	69881	97,78	2,22
893 H	3074856	70872	97,75	2,25
893 I	3072420	73308	97,67	2,33
893 J	3116465	29263	99,07	0,93

894	Black Count	White Count	Black %	White %
894 Mean	3106057	39671	98,74	1,26

894 Std. Dev.	7036,12	7036,12	0,22	0,22
894 A	3106859	38869	98,76	1,24
894 B	3116834	28894	99,08	0,92
894 C	3098004	47724	98,48	1,52
894 D	3113499	32229	98,98	1,02
894 E	3097326	48402	98,46	1,54
894 F	3103124	42604	98,65	1,35
894 G	3109683	36045	98,85	1,15
894 H	3097044	48684	98,45	1,55
894 I	3111425	34303	98,91	1,09
894 J	3106772	38956	98,76	1,24

895	Black Count	White Count	Black %	White %
895 Mean	3099276,3	46451,7	98,52	1,48
895 Std. Dev.	16699,93	16699,93	0,53	0,53
895 A	3117367	28361	99,1	0,9
895 B	3083096	62632	98,01	1,99
895 C	3089568	56160	98,21	1,79
895 D	3089345	56383	98,21	1,79
895 E	3106784	38944	98,76	1,24
895 F	3066319	79409	97,48	2,52
895 G	3102752	42976	98,63	1,37
895 H	3118015	27713	99,12	0,88
895 I	3108638	37090	98,82	1,18
895 J	3110879	34849	98,89	1,11

896	Black Count	White Count	Black %	White %
896 Mean	3108075,6	37652,4	98,8	1,2
896 Std. Dev.	15468,41	15468,41	0,49	0,49
896 A	3117664	28064	99,11	0,89
896 B	3092293	53435	98,3	1,7
896 C	3107612	38116	98,79	1,21
896 D	3118951	26777	99,15	0,85
896 E	3091713	54015	98,28	1,72
896 F	3123662	22066	99,3	0,7
896 G	3118202	27526	99,12	0,88
896 H	3081065	64663	97,94	2,06
896 I	3126216	19512	99,38	0,62
896 J	3103378	42350	98,65	1,35

897	Black Count	White Count	Black %	White %
897 Mean	3102564,1	43163,9	98,63	1,37
897 Std. Dev.	7196,7	7196,7	0,23	0,23
897 A	3114845	30883	99,02	0,98
897 B	3107207	38521	98,78	1,22
897 C	3098612	47116	98,5	1,5
897 D	3089722	56006	98,22	1,78
897 E	3103750	41978	98,67	1,33
897 F	3093355	52373	98,34	1,66
897 G	3103971	41757	98,67	1,33
897 H	3106751	38977	98,76	1,24
897 I	3105271	40457	98,71	1,29
897 J	3102157	43571	98,61	1,39

898	Black Count	White Count	Black %	White %
898 Mean	3113226,8	32501,2	98,97	1,03
898 Std. Dev.	8983,24	8983,24	0,29	0,29
898 A	3101819	43909	98,6	1,4
898 B	3123324	22404	99,29	0,71
898 C	3118746	26982	99,14	0,86
898 D	3121040	24688	99,22	0,78
898 E	3120745	24983	99,21	0,79
898 F	3119730	25998	99,17	0,83
898 G	3115727	30001	99,05	0,95
898 H	3099551	46177	98,53	1,47
898 I	3105984	39744	98,74	1,26
898 J	3105602	40126	98,72	1,28

899	Black Count	White Count	Black %	White %
899 Mean	3109551,3	36176,7	98,85	1,15
899 Std. Dev.	9275,56	9275,56	0,3	0,3
899 A	3116759	28969	99,08	0,92
899 B	3111758	33970	98,92	1,08
899 C	3115168	30560	99,03	0,97
899 D	3120008	25720	99,18	0,82
899 E	3112678	33050	98,95	1,05
899 F	3088570	57158	98,18	1,82
899 G	3114572	31156	99,01	0,99



899 H	3110190	35538	98,87	1,13
899 I	3100389	45339	98,56	1,44
899 J	3105421	40307	98,72	1,28
<hr/>				
900	Black Count	White Count	Black %	White %
900 Mean	3113806,4	31921,6	98,98	1,02
900 Std. Dev.	14521,65	14521,65	0,46	0,46
900 A	3113797	31931	98,98	1,02
900 B	3119446	26282	99,16	0,84
900 C	3119109	26619	99,15	0,85
900 D	3105215	40513	98,71	1,29
900 E	3082794	62934	98	2
900 F	3119164	26564	99,16	0,84
900 G	3139686	6042	99,81	0,19
900 H	3120550	25178	99,2	0,8
900 I	3111902	33826	98,92	1,08
900 J	3106401	39327	98,75	1,25
<hr/>				
901	Black Count	White Count	Black %	White %
901 Mean	3112534,6	33193,4	98,94	1,06
901 Std. Dev.	10274,13	10274,13	0,33	0,33
901 A	3109972	35756	98,86	1,14
901 B	3117408	28320	99,1	0,9
901 C	3098440	47288	98,5	1,5
901 D	3092503	53225	98,31	1,69
901 E	3117956	27772	99,12	0,88
901 F	3117448	28280	99,1	0,9
901 G	3117643	28085	99,11	0,89
901 H	3115012	30716	99,02	0,98
901 I	3127773	17955	99,43	0,57
901 J	3111191	34537	98,9	1,1
<hr/>				
902	Black Count	White Count	Black %	White %
902 Mean	3118001	27727	99,12	0,88
902 Std. Dev.	10720,39	10720,39	0,34	0,34
902 A	3117747	27981	99,11	0,89
902 B	3134381	11347	99,64	0,36
902 C	3120980	24748	99,21	0,79
902 D	3115288	30440	99,03	0,97

902 E	3110118	35610	98,87	1,13
902 F	3128309	17419	99,45	0,55
902 G	3103332	42396	98,65	1,35
902 H	3101476	44252	98,59	1,41
902 I	3127061	18667	99,41	0,59
902 J	3121318	24410	99,22	0,78
<hr/>				
903	Black Count	White Count	Black %	White %
903 Mean	3115632,2	30095,8	99,04	0,96
903 Std. Dev.	7590,5	7590,5	0,24	0,24
903 A	3114531	31197	99,01	0,99
903 B	3124778	20950	99,33	0,67
903 C	3129014	16714	99,47	0,53
903 D	3113741	31987	98,98	1,02
903 E	3110019	35709	98,86	1,14
903 F	3110913	34815	98,89	1,11
903 G	3122903	22825	99,27	0,73
903 H	3116020	29708	99,06	0,94
903 I	3106180	39548	98,74	1,26
903 J	3108223	37505	98,81	1,19
<hr/>				
904	Black Count	White Count	Black %	White %
904 Mean	3114416,2	31311,8	99	1
904 Std. Dev.	6491,41	6491,41	0,21	0,21
904 A	3117979	27749	99,12	0,88
904 B	3108736	36992	98,82	1,18
904 C	3108918	36810	98,83	1,17
904 D	3116822	28906	99,08	0,92
904 E	3116417	29311	99,07	0,93
904 F	3125048	20680	99,34	0,66
904 G	3103996	41732	98,67	1,33
904 H	3120733	24995	99,21	0,79
904 I	3116447	29281	99,07	0,93
904 J	3109066	36662	98,83	1,17
<hr/>				
905	Black Count	White Count	Black %	White %
905 Mean	3111000,2	34727,8	98,9	1,1
905 Std. Dev.	8128,54	8128,54	0,26	0,26
905 A	3120916	24812	99,21	0,79

905 B	3119171	26557	99,16	0,84
905 C	3106336	39392	98,75	1,25
905 D	3117504	28224	99,1	0,9
905 E	3110843	34885	98,89	1,11
905 F	3118095	27633	99,12	0,88
905 G	3098274	47454	98,49	1,51
905 H	3113146	32582	98,96	1,04
905 I	3105689	40039	98,73	1,27
905 J	3100028	45700	98,55	1,45

843	Black Count	White Count	Black %	White %
843 Mean	3113045,1	32682,9	98,96	1,04
843 Std. Dev.	15911,77	15911,77	0,51	0,51
843 A	3090786	54942	98,25	1,75
843 B	3092993	52735	98,32	1,68
843 C	3092059	53669	98,29	1,71
843 D	3120359	25369	99,19	0,81
843 E	3118522	27206	99,14	0,86
843 F	3113939	31789	98,99	1,01
843 G	3115712	30016	99,05	0,95
843 H	3120624	25104	99,2	0,8
843 I	3129815	15913	99,49	0,51
843 J	3135642	10086	99,68	0,32

844	Black Count	White Count	Black %	White %
844 Mean	3120009	25719	99,18	0,82
844 Std. Dev.	8550,7	8550,7	0,27	0,27
844 A	3120504	25224	99,2	0,8
844 B	3116729	28999	99,08	0,92
844 C	3113864	31864	98,99	1,01
844 D	3125876	19852	99,37	0,63
844 E	3117867	27861	99,11	0,89
844 F	3128783	16945	99,46	0,54
844 G	3106284	39444	98,75	1,25
844 H	3111200	34528	98,9	1,1
844 I	3124620	21108	99,33	0,67
844 J	3134363	11365	99,64	0,36

841		Black Count	White Count	Black %	White %
841	Mean	3112908,3	32819,7	98,96	1,04
841	Std. Dev.	9826,02	9826,02	0,31	0,31
841	A	3117478	28250	99,1	0,9
841	B	3103196	42532	98,65	1,35
841	C	3128865	16863	99,46	0,54
841	D	3112168	33560	98,93	1,07
841	E	3105365	40363	98,72	1,28
841	F	3106141	39587	98,74	1,26
841	G	3116539	29189	99,07	0,93
841	H	3105983	39745	98,74	1,26
841	I	3129051	16677	99,47	0,53
841	J	3104297	41431	98,68	1,32

842		Black Count	White Count	Black %	White %
842	Mean	3108232,9	37495,1	98,81	1,19
842	Std. Dev.	13871,59	13871,59	0,44	0,44
842	A	3084574	61154	98,06	1,94
842	B	3127297	18431	99,41	0,59
842	C	3112215	33513	98,93	1,07
842	D	3109329	36399	98,84	1,16
842	E	3097819	47909	98,48	1,52
842	F	3123895	21833	99,31	0,69
842	G	3114223	31505	99	1
842	H	3115052	30676	99,02	0,98
842	I	3089383	56345	98,21	1,79
842	J	3108542	37186	98,82	1,18

845		Black Count	White Count	Black %	White %
845	Mean	3128842,3	16885,7	99,46	0,54
845	Std. Dev.	6033,74	6033,74	0,19	0,19
845	A	3121788	23940	99,24	0,76
845	B	3128195	17533	99,44	0,56
845	C	3127085	18643	99,41	0,59
845	D	3124384	21344	99,32	0,68
845	E	3124340	21388	99,32	0,68
845	F	3137227	8501	99,73	0,27
845	G	3123232	22496	99,28	0,72
845	H	3128677	17051	99,46	0,54

845 I	3138677	7051	99,78	0,22
845 J	3134818	10910	99,65	0,35
846	Black Count	White Count	Black %	White %
846 Mean	3126134,3	19593,7	99,38	0,62
846 Std. Dev.	6595,39	6595,39	0,21	0,21
846 A	3125117	20611	99,34	0,66
846 B	3124067	21661	99,31	0,69
846 C	3138244	7484	99,76	0,24
846 D	3122782	22946	99,27	0,73
846 E	3138037	7691	99,76	0,24
846 F	3125953	19775	99,37	0,63
846 G	3123080	22648	99,28	0,72
846 H	3123288	22440	99,29	0,71
846 I	3119140	26588	99,15	0,85
846 J	3121635	24093	99,23	0,77
847	Black Count	White Count	Black %	White %
847 Mean	3115175,4	30552,6	99,03	0,97
847 Std. Dev.	6213,89	6213,89	0,2	0,2
847 A	3124246	21482	99,32	0,68
847 B	3126188	19540	99,38	0,62
847 C	3116193	29535	99,06	0,94
847 D	3108453	37275	98,82	1,18
847 E	3110709	35019	98,89	1,11
847 F	3117734	27994	99,11	0,89
847 G	3112116	33612	98,93	1,07
847 H	3107944	37784	98,8	1,2
847 I	3115984	29744	99,05	0,95
847 J	3112187	33541	98,93	1,07
848	Black Count	White Count	Black %	White %
848 Mean	3127992,1	17735,9	99,44	0,56
848 Std. Dev.	6389,54	6389,54	0,2	0,2
848 A	3118332	27396	99,13	0,87
848 B	3133624	12104	99,62	0,38
848 C	3132814	12914	99,59	0,41
848 D	3128738	16990	99,46	0,54
848 E	3119954	25774	99,18	0,82

848 F	3130055	15673	99,5	0,5
848 G	3131525	14203	99,55	0,45
848 H	3126329	19399	99,38	0,62
848 I	3137374	8354	99,73	0,27
848 J	3121176	24552	99,22	0,78

---

866	Black Count	White Count	Black %	White %
866 Mean	3132319,8	13408,2	99,57	0,43
866 Std. Dev.	4891,98	4891,98	0,16	0,16
866 A	3142966	2762	99,91	0,09
866 B	3131331	14397	99,54	0,46
866 C	3126371	19357	99,38	0,62
866 D	3129772	15956	99,49	0,51
866 E	3128123	17605	99,44	0,56
866 F	3131946	13782	99,56	0,44
866 G	3128492	17236	99,45	0,55
866 H	3132273	13455	99,57	0,43
866 I	3136313	9415	99,7	0,3
866 J	3135611	10117	99,68	0,32

---

867	Black Count	White Count	Black %	White %
867 Mean	3134618	11110	99,65	0,35
867 Std. Dev.	10478,89	10478,89	0,33	0,33
867 A	3143817	1911	99,94	0,06
867 B	3141544	4184	99,87	0,13
867 C	3138813	6915	99,78	0,22
867 D	3133281	12447	99,6	0,4
867 E	3109167	36561	98,84	1,16
867 F	3134850	10878	99,65	0,35
867 G	3140678	5050	99,84	0,16
867 H	3139285	6443	99,8	0,2
867 I	3130127	15601	99,5	0,5
J				

---

868	Black Count	White Count	Black %	White %
868 Mean	3137553,8	8174,2	99,74	0,26
868 Std. Dev.	4422,19	4422,19	0,14	0,14
868 A	3144444	1284	99,96	0,04
868 B	3138962	6766	99,78	0,22
868 C	3141921	3807	99,88	0,12

868 D	3133598	12130	99,61	0,39
868 E	3128549	17179	99,45	0,55
868 F	3135953	9775	99,69	0,31
868 G	3138736	6992	99,78	0,22
868 H	3135708	10020	99,68	0,32
868 I	3138616	7112	99,77	0,23
868 J	3139051	6677	99,79	0,21

869	Black Count	White Count	Black %	White %
869 Mean	3135630,2	10097,8	99,68	0,32
869 Std. Dev.	5557,39	5557,39	0,18	0,18
869 A	3140050	5678	99,82	0,18
869 B	3130314	15414	99,51	0,49
869 C	3134627	11101	99,65	0,35
869 D	3132455	13273	99,58	0,42
869 E	3123770	21958	99,3	0,7
869 F	3136467	9261	99,71	0,29
869 G	3139185	6543	99,79	0,21
869 H	3137338	8390	99,73	0,27
869 I	3139734	5994	99,81	0,19
869 J	3142362	3366	99,89	0,11

870	Black Count	White Count	Black %	White %
870 Mean	3132925,5	12802,5	99,59	0,41
870 Std. Dev.	5766,81	5766,81	0,18	0,18
870 A	3140825	4903	99,84	0,16
870 B	3128109	17619	99,44	0,56
870 C	3142939	2789	99,91	0,09
870 D	3132453	13275	99,58	0,42
870 E	3133073	12655	99,6	0,4
870 F	3127265	18463	99,41	0,59
870 G	3133367	12361	99,61	0,39
870 H	3133024	12704	99,6	0,4
870 I	3134183	11545	99,63	0,37
870 J	3124017	21711	99,31	0,69

871	Black Count	White Count	Black %	White %
871 Mean	3131855,8	13872,2	99,56	0,44
871 Std. Dev.	4133,09	4133,09	0,13	0,13

871 A	3135757	9971	99,68	0,32
871 B	3132374	13354	99,58	0,42
871 C	3128901	16827	99,47	0,53
871 D	3129562	16166	99,49	0,51
871 E	3139812	5916	99,81	0,19
871 F	3132093	13635	99,57	0,43
871 G	3129218	16510	99,48	0,52
871 H	3131529	14199	99,55	0,45
871 I	3134355	11373	99,64	0,36
871 J	3124957	20771	99,34	0,66

872	Black Count	White Count	Black %	White %
872 Mean	3132148,3	13579,7	99,57	0,43
872 Std. Dev.	6447,62	6447,62	0,21	0,21
872 A	3141904	3824	99,88	0,12
872 B	3132426	13302	99,58	0,42
872 C	3138903	6825	99,78	0,22
872 D	3135028	10700	99,66	0,34
872 E	3121272	24456	99,22	0,78
872 F	3135573	10155	99,68	0,32
872 G	3129748	15980	99,49	0,51
872 H	3126537	19191	99,39	0,61
872 I	3134989	10739	99,66	0,34
872 J	3125103	20625	99,34	0,66

873	Black Count	White Count	Black %	White %
873 Mean	3138607,7	7120,3	99,77	0,23
873 Std. Dev.	3237,87	3237,87	0,1	0,1
873 A	3139543	6185	99,8	0,2
873 B	3139522	6206	99,8	0,2
873 C	3137972	7756	99,75	0,25
873 D	3140074	5654	99,82	0,18
873 E	3140777	4951	99,84	0,16
873 F	3140238	5490	99,83	0,17
873 G	3143066	2662	99,92	0,08
873 H	3134722	11006	99,65	0,35
873 I	3131699	14029	99,55	0,45
873 J	3138464	7264	99,77	0,23



874	Black Count	White Count	Black %	White %
874 Mean	3136898,7	8829,3	99,72	0,28
874 Std. Dev.	3203,76	3203,76	0,1	0,1
874 A	3139816	5912	99,81	0,19
874 B	3135874	9854	99,69	0,31
874 C	3135268	10460	99,67	0,33
874 D	3138150	7578	99,76	0,24
874 E	3141775	3953	99,87	0,13
874 F	3134461	11267	99,64	0,36
874 G	3140167	5561	99,82	0,18
874 H	3138202	7526	99,76	0,24
874 I	3132925	12803	99,59	0,41
874 J	3132349	13379	99,57	0,43

875	Black Count	White Count	Black %	White %
875 Mean	3138984,2	6743,8	99,78	0,22
875 Std. Dev.	3932,28	3932,28	0,13	0,13
875 A	3135477	10251	99,67	0,33
875 B	3140274	5454	99,83	0,17
875 C	3139830	5898	99,81	0,19
875 D	3137750	7978	99,75	0,25
875 E	3143208	2520	99,92	0,08
875 F	3140058	5670	99,82	0,18
875 G	3138567	7161	99,77	0,23
875 H	3143017	2711	99,91	0,09
875 I	3141646	4082	99,87	0,13
875 J	3130015	15713	99,5	0,5

876	Black Count	White Count	Black %	White %
876 Mean	3136279,7	9448,3	99,7	0,3
876 Std. Dev.	5748,99	5748,99	0,18	0,18
876 A	3144160	1568	99,95	0,05
876 B	3138226	7502	99,76	0,24
876 C	3128348	17380	99,45	0,55
876 D	3127450	18278	99,42	0,58
876 E	3133781	11947	99,62	0,38
876 F	3142740	2988	99,91	0,09
876 G	3138143	7585	99,76	0,24
876 H	3141576	4152	99,87	0,13

876 I	3135289	10439	99,67	0,33
876 J	3133084	12644	99,6	0,4
877	Black Count	White Count	Black %	White %
877 Mean	3138528,5	7199,5	99,77	0,23
877 Std. Dev.	4071,93	4071,93	0,13	0,13
877 A	3140207	5521	99,82	0,18
877 B	3134993	10735	99,66	0,34
877 C	3141999	3729	99,88	0,12
877 D	3135318	10410	99,67	0,33
877 E	3134968	10760	99,66	0,34
877 F	3143136	2592	99,92	0,08
877 G	3133943	11785	99,63	0,37
877 H	3138855	6873	99,78	0,22
877 I	3136192	9536	99,7	0,3
877 J	3145674	54	100	0
878	Black Count	White Count	Black %	White %
878 Mean	3140407,2	5320,8	99,83	0,17
878 Std. Dev.	5225,79	5225,79	0,17	0,17
878 A	3144378	1350	99,96	0,04
878 B	3141011	4717	99,85	0,15
878 C	3133612	12116	99,61	0,39
878 D	3133997	11731	99,63	0,37
878 E	3145728	0	100	0
878 F	3145728	0	100	0
878 G	3145728	0	100	0
878 H	3141180	4548	99,86	0,14
878 I	3139820	5908	99,81	0,19
878 J	3132890	12838	99,59	0,41
879	Black Count	White Count	Black %	White %
879 Mean	3135682,9	10045,1	99,68	0,32
879 Std. Dev.	5356,6	5356,6	0,17	0,17
879 A	3139603	6125	99,81	0,19
879 B	3124322	21406	99,32	0,68
879 C	3139529	6199	99,8	0,2
879 D	3136895	8833	99,72	0,28
879 E	3127958	17770	99,44	0,56

879 F	3136209	9519	99,7	0,3
879 G	3140074	5654	99,82	0,18
879 H	3137716	8012	99,75	0,25
879 I	3139405	6323	99,8	0,2
879 J	3135118	10610	99,66	0,34
<hr/>				
880	Black Count	White Count	Black %	White %
880 Mean	3134919,8	10808,2	99,66	0,34
880 Std. Dev.	5894,02	5894,02	0,19	0,19
880 A	3141432	4296	99,86	0,14
880 B	3134489	11239	99,64	0,36
880 C	3140509	5219	99,83	0,17
880 D	3130782	14946	99,52	0,48
880 E	3124191	21537	99,32	0,68
880 F	3136331	9397	99,7	0,3
880 G	3132463	13265	99,58	0,42
880 H	3136403	9325	99,7	0,3
880 I	3143102	2626	99,92	0,08
880 J	3129496	16232	99,48	0,52
<hr/>				
881	Black Count	White Count	Black %	White %
881 Mean	3134304,2	11423,8	99,64	0,36
881 Std. Dev.	5781,22	5781,22	0,18	0,18
881 A	3136758	8970	99,71	0,29
881 B	3133675	12053	99,62	0,38
881 C	3141235	4493	99,86	0,14
881 D	3134555	11173	99,64	0,36
881 E	3132740	12988	99,59	0,41
881 F	3142311	3417	99,89	0,11
881 G	3136626	9102	99,71	0,29
881 H	3130875	14853	99,53	0,47
881 I	3132599	13129	99,58	0,42
881 J	3121668	24060	99,24	0,76
<hr/>				
882	Black Count	White Count	Black %	White %
882 Mean	3134222,1	11505,9	99,63	0,37
882 Std. Dev.	6879,3	6879,3	0,22	0,22
882 A	3133127	12601	99,6	0,4
882 B	3134050	11678	99,63	0,37

882 C	3143109	2619	99,92	0,08
882 D	3141125	4603	99,85	0,15
882 E	3140339	5389	99,83	0,17
882 F	3122161	23567	99,25	0,75
882 G	3133760	11968	99,62	0,38
882 H	3135770	9958	99,68	0,32
882 I	3123651	22077	99,3	0,7
882 J	3135129	10599	99,66	0,34

883	Black Count	White Count	Black %	White %
883 Mean	3137359,2	8368,8	99,73	0,27
883 Std. Dev.	3726,5	3726,5	0,12	0,12
883 A	3140953	4775	99,85	0,15
883 B	3134928	10800	99,66	0,34
883 C	3136730	8998	99,71	0,29
883 D	3138898	6830	99,78	0,22
883 E	3134074	11654	99,63	0,37
883 F	3137727	8001	99,75	0,25
883 G	3139380	6348	99,8	0,2
883 H	3144577	1151	99,96	0,04
883 I	3132435	13293	99,58	0,42
883 J	3133890	11838	99,62	0,38

884	Black Count	White Count	Black %	White %
884 Mean	3134668,9	11059,1	99,65	0,35
884 Std. Dev.	3807,9	3807,9	0,12	0,12
884 A	3137638	8090	99,74	0,26
884 B	3131851	13877	99,56	0,44
884 C	3129622	16106	99,49	0,51
884 D	3138493	7235	99,77	0,23
884 E	3136717	9011	99,71	0,29
884 F	3127490	18238	99,42	0,58
884 G	3136007	9721	99,69	0,31
884 H	3137947	7781	99,75	0,25
884 I	3136898	8830	99,72	0,28
884 J	3134026	11702	99,63	0,37

885	Black Count	White Count	Black %	White %
885 Mean	3135777,4	9950,6	99,68	0,32

885 Std. Dev.	6978,76	6978,76	0,22	0,22
885 A	3140833	4895	99,84	0,16
885 B	3137757	7971	99,75	0,25
885 C	3135821	9907	99,69	0,31
885 D	3136577	9151	99,71	0,29
885 E	3134517	11211	99,64	0,36
885 F	3117152	28576	99,09	0,91
885 G	3135395	10333	99,67	0,33
885 H	3140602	5126	99,84	0,16
885 I	3137601	8127	99,74	0,26
885 J	3141519	4209	99,87	0,13

996	Black Count	White Count	Black %	White %
996 Mean	3110528,8	35199,2	98,88	1,12
996 Std. Dev.	12862,85	12862,85	0,41	0,41
996 A	3089938	55790	98,23	1,77
996 B	3113940	31788	98,99	1,01
996 C	3125271	20457	99,35	0,65
996 D	3112372	33356	98,94	1,06
996 E	3103599	42129	98,66	1,34
996 F	3113477	32251	98,97	1,03
996 G	3121549	24179	99,23	0,77
996 H	3087724	58004	98,16	1,84
996 I	3118126	27602	99,12	0,88
996 J	3119292	26436	99,16	0,84

997	Black Count	White Count	Black %	White %
997 Mean	3129533,1	16194,9	99,48	0,52
997 Std. Dev.	9861,16	9861,16	0,32	0,32
997 A	3106246	39482	98,74	1,26
997 B	3142775	2953	99,91	0,09
997 C	3135998	9730	99,69	0,31
997 D	3135635	10093	99,68	0,32
997 E	3129140	16588	99,47	0,53
997 F	3132409	13319	99,58	0,42
997 G	3126420	19308	99,39	0,61
997 H	3123369	22359	99,29	0,71
997 I	3134246	11482	99,63	0,37
997 J	3129093	16635	99,47	0,53

998	Black Count	White Count	Black %	White %
998 Mean	3105458,6	40269,4	98,72	1,28
998 Std. Dev.	46494,09	46494,09	1,48	1,48
998 A	3126822	18906	99,4	0,6
998 B	3127567	18161	99,42	0,58
998 C	3134193	11535	99,63	0,37
998 D	3126622	19106	99,39	0,61
998 E	3110730	34998	98,89	1,11
998 F	3093611	52117	98,34	1,66
998 G	3103090	42638	98,64	1,36
998 H	2978379	167349	94,68	5,32
998 I	3125396	20332	99,35	0,65
998 J	3128176	17552	99,44	0,56

999	Black Count	White Count	Black %	White %
999 Mean	3118402,4	27325,6	99,13	0,87
999 Std. Dev.	10602,88	10602,88	0,34	0,34
999 A	3124191	21537	99,32	0,68
999 B	3111455	34273	98,91	1,09
999 C	3115711	30017	99,05	0,95
999 D	3135372	10356	99,67	0,33
999 E	3101413	44315	98,59	1,41
999 F	3120216	25512	99,19	0,81
999 G	3134382	11346	99,64	0,36
999 H	3112163	33565	98,93	1,07
999 I	3111472	34256	98,91	1,09
999 J	3117649	28079	99,11	0,89

1000	Black Count	White Count	Black %	White %
1000 Mean	3111723,7	34004,3	98,92	1,08
1000 Std. Dev.	13962,79	13962,79	0,45	0,45
1000 A	3120769	24959	99,21	0,79
1000 B	3125994	19734	99,37	0,63
1000 C	3096408	49320	98,43	1,57
1000 D	3129380	16348	99,48	0,52
1000 E	3094159	51569	98,36	1,64
1000 F	3093664	52064	98,34	1,66
1000 G	3114266	31462	99	1

1000 H	3124925	20803	99,34	0,66
1000 I	3115573	30155	99,04	0,96
1000 J	3102099	43629	98,61	1,39
<hr/>				
1001	Black Count	White Count	Black %	White %
1001 Mean	3128727,4	17000,6	99,46	0,54
1001 Std. Dev.	8866,42	8866,42	0,28	0,28
1001 A	3128781	16947	99,46	0,54
1001 B	3129525	16203	99,48	0,52
1001 C	3142472	3256	99,9	0,1
1001 D	3123896	21832	99,31	0,69
1001 E	3140729	4999	99,84	0,16
1001 F	3128486	17242	99,45	0,55
1001 G	3114765	30963	99,02	0,98
1001 H	3128086	17642	99,44	0,56
1001 I	3117167	28561	99,09	0,91
1001 J	3133367	12361	99,61	0,39
<hr/>				
1002	Black Count	White Count	Black %	White %
1002 Mean	3125656,1	20071,9	99,36	0,64
1002 Std. Dev.	16394,31	16394,31	0,52	0,52
1002 A	3129418	16310	99,48	0,52
1002 B	3139090	6638	99,79	0,21
1002 C	3132109	13619	99,57	0,43
1002 D	3101979	43749	98,61	1,39
1002 E	3132629	13099	99,58	0,42
1002 F	3138974	6754	99,79	0,21
1002 G	3126160	19568	99,38	0,62
1002 H	3091130	54598	98,26	1,74
1002 I	3139923	5805	99,82	0,18
1002 J	3125149	20579	99,35	0,65
<hr/>				
1003	Black Count	White Count	Black %	White %
1003 Mean	3127381,3	18346,7	99,42	0,58
1003 Std. Dev.	7729,37	7729,37	0,24	0,24
1003 A	3125936	19792	99,37	0,63
1003 B	3123256	22472	99,29	0,71
1003 C	3135910	9818	99,69	0,31
1003 D	3118939	26789	99,15	0,85

1003 E	3128367	17361	99,45	0,55
1003 F	3139832	5896	99,81	0,19
1003 G	3132255	13473	99,57	0,43
1003 H	3121417	24311	99,23	0,77
1003 I	3132188	13540	99,57	0,43
1003 J	3115713	30015	99,05	0,95
<hr/>				
1004	Black Count	White Count	Black %	White %
1004 Mean	3110295,9	35432,1	98,87	1,13
1004 Std. Dev.	15335,66	15335,66	0,49	0,49
1004 A	3092301	53427	98,3	1,7
1004 B	3118450	27278	99,13	0,87
1004 C	3120297	25431	99,19	0,81
1004 D	3123303	22425	99,29	0,71
1004 E	3112830	32898	98,95	1,05
1004 F	3122750	22978	99,27	0,73
1004 G	3123746	21982	99,3	0,7
1004 H	3109583	36145	98,85	1,15
1004 I	3101641	44087	98,6	1,4
1004 J	3078058	67670	97,85	2,15
<hr/>				
1005	Black Count	White Count	Black %	White %
1005 Mean	3088890,1	56837,9	98,19	1,81
1005 Std. Dev.	16860,45	16860,45	0,54	0,54
1005 A	3091591	54137	98,28	1,72
1005 B	3098014	47714	98,48	1,52
1005 C	3092288	53440	98,3	1,7
1005 D	3088075	57653	98,17	1,83
1005 E	3084908	60820	98,07	1,93
1005 F	3104543	41185	98,69	1,31
1005 G	3088875	56853	98,19	1,81
1005 H	3044425	101303	96,78	3,22
1005 I	3103010	42718	98,64	1,36
1005 J	3093172	52556	98,33	1,67
<hr/>				
1006	Black Count	White Count	Black %	White %
1006 Mean	3113428,8	32299,2	98,97	1,03
1006 Std. Dev.	13512,3	13512,3	0,43	0,43
1006 A	3084114	61614	98,04	1,96



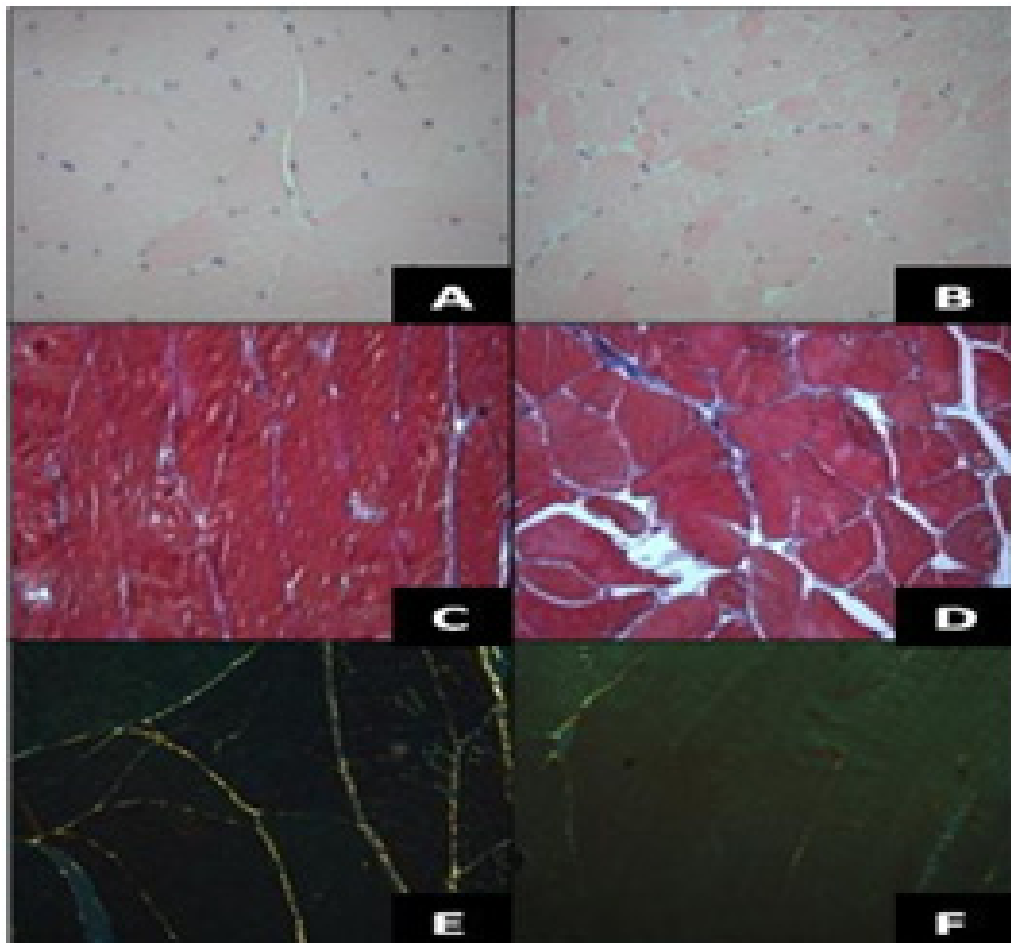
1006 B	3107654	38074	98,79	1,21
1006 C	3107654	38074	98,79	1,21
1006 D	3109898	35830	98,86	1,14
1006 E	3111000	34728	98,9	1,1
1006 F	3128329	17399	99,45	0,55
1006 G	3119141	26587	99,15	0,85
1006 H	3124741	20987	99,33	0,67
1006 I	3110749	34979	98,89	1,11
1006 J	3131008	14720	99,53	0,47
<hr/>				
1007	Black Count	White Count	Black %	White %
1007 Mean	3112276,5	33451,5	98,93	1,06
1007 Std. Dev.	16786,22	16786,22	0,53	0,53
1007 A	3139233	6495	99,79	0,21
1007 B	3130266	15462	99,51	0,49
1007 C	3110403	35325	98,88	1,12
1007 D	3117514	28214	99,1	0,9
1007 E	3121652	24076	99,23	0,77
1007 F	3083709	62019	98,03	1,97
1007 G	3100501	45227	98,56	1,44
1007 H	3093560	52168	98,34	1,66
1007 I	3107447	38281	98,78	1,22
1007 J	3118480	27248	99,13	0,87
<hr/>				
1008	Black Count	White Count	Black %	White %
1008 Mean	3113649,4	32078,6	98,98	1,02
1008 Std. Dev.	21692,05	21692,05	0,69	0,69
1008 A	3126688	19040	99,39	0,61
1008 B	3124680	21048	99,33	0,67
1008 C	3133161	12567	99,6	0,4
1008 D	3129751	15977	99,49	0,51
1008 E	3098909	46819	98,51	1,49
1008 F	3081362	64366	97,95	2,05
1008 G	3071887	73841	97,65	2,35
1008 H	3126714	19014	99,4	0,6
1008 I	3121542	24186	99,23	0,77
1008 J	3121800	23928	99,24	0,76
<hr/>				
1009	Black Count	White Count	Black %	White %

1009 Mean	3113984,5	31743,5	98,99	1,01
1009 Std. Dev.	24723,15	24723,15	0,79	0,79
1009 A	3130138	15590	99,5	0,5
1009 B	3115633	30095	99,04	0,96
1009 C	3110555	35173	98,88	1,12
1009 D	3103235	42493	98,65	1,35
1009 E	3128561	17167	99,45	0,55
1009 F	3125305	20423	99,35	0,65
1009 G	3116821	28907	99,08	0,92
1009 H	3134286	11442	99,64	0,36
1009 I	3126145	19583	99,38	0,62
1009 J	3049166	96562	96,93	3,07
<hr/>				
1010	Black Count	White Count	Black %	White %
1010 Mean	3115134,8	30593,2	99,03	0,97
1010 Std. Dev.	21698,9	21698,9	0,69	0,69
1010 A	3107882	37846	98,8	1,2
1010 B	3124954	20774	99,34	0,66
1010 C	3060201	85527	97,28	2,72
1010 D	3134016	11712	99,63	0,37
1010 E	3131560	14168	99,55	0,45
1010 F	3102157	43571	98,61	1,39
1010 G	3120358	25370	99,19	0,81
1010 H	3128728	17000	99,46	0,54
1010 I	3121488	24240	99,23	0,77
1010 J	3120004	25724	99,18	0,82
<hr/>				
1011	Black Count	White Count	Black %	White %
1011 Mean	3118207	27521	99,13	0,87
1011 Std. Dev.	14524,32	14524,32	0,46	0,46
1011 A	3128474	17254	99,45	0,55
1011 B	3095013	50715	98,39	1,61
1001 C	3135381	10347	99,67	0,33
1011 D	3111525	34203	98,91	1,09
1011 E	3100085	45643	98,55	1,45
1011 F	3130374	15354	99,51	0,49
1011 G	3114458	31270	99,01	0,99
1011 H	3132690	13038	99,59	0,41
1011 I	3106724	39004	98,76	1,24

1011 J	3127346	18382	99,42	0,58
<hr/>				
1012	Black Count	White Count	Black %	White %
1012 Mean	3122651,9	23076,1	99,27	0,74
1012 Std. Dev.	13562,44	13562,44	0,43	0,43
1012 A	3091677	54051	98,28	1,72
1012 B	3131721	14007	99,55	0,45
1012 C	3140132	5596	99,82	0,18
1012 D	3125656	20072	99,36	0,64
1012 E	3132903	12825	99,59	0,41
1012 F	3123392	22336	99,29	0,71
1012 G	3111254	34474	98,9	1,1
1012 H	3126876	18852	99,4	0,6
1012 I	3116821	28907	99,08	0,92
1012 J	3126087	19641	99,38	0,62
<hr/>				
1013	Black Count	White Count	Black %	White %
1013 Mean	3122687,1	23040,9	99,27	0,73
1013 Std. Dev.	7525,29	7525,29	0,24	0,24
1013 A	3126561	19167	99,39	0,61
1013 B	3115566	30162	99,04	0,96
1013 C	3121613	24115	99,23	0,77
1013 D	3136100	9628	99,69	0,31
1013 E	3122715	23013	99,27	0,73
1013 F	3113122	32606	98,96	1,04
1013 G	3131022	14706	99,53	0,47
1013 H	3118398	27330	99,13	0,87
1013 I	3127094	18634	99,41	0,59
1013 J	3114680	31048	99,01	0,99
<hr/>				
1014	Black Count	White Count	Black %	White %
1014 Mean	3116950	28778	99,09	0,91
1014 Std. Dev.	16022,31	16022,31	0,51	0,51
1014 A	3130728	15000	99,52	0,48
1014 B	3099337	46391	98,53	1,47
1014 C	3123973	21755	99,31	0,69
1014 D	3129895	15833	99,5	0,5
1014 E	3136857	8871	99,72	0,28
1014 F	3124006	21722	99,31	0,69

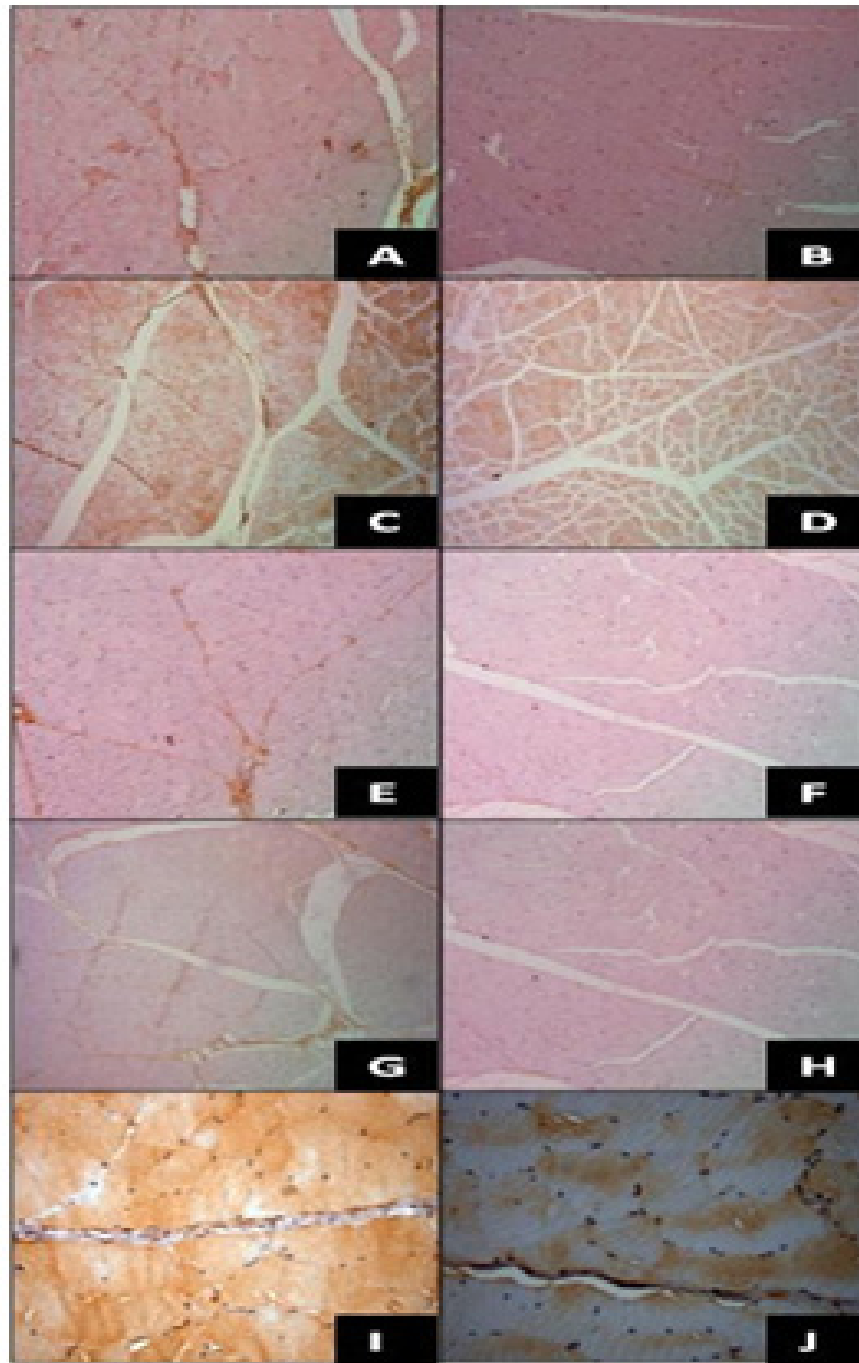
1014 G	3120678	25050	99,2	0,8
1014 H	3117707	28021	99,11	0,89
1014 I	3092467	53261	98,31	1,69
1014 J	3093852	51876	98,35	1,65
1015	Black Count	White Count	Black %	White %
1015 Mean	3123880,9	21847,1	99,3	0,69
1015 Std. Dev.	10446,27	10446,27	0,33	0,33
1015 A	3125524	20204	99,36	0,64
1015 B	3115642	30086	99,04	0,96
1015 C	3136942	8786	99,72	0,28
1015 D	3131003	14725	99,53	0,47
1015 E	3114646	31082	99,01	0,99
1015 F	3133749	11979	99,62	0,38
1015 G	3126198	19530	99,38	0,62
1015 H	3134678	11050	99,65	0,35
1015 I	3107762	37966	98,79	1,21
1015 J	3112665	33063	98,95	1,05

## APÊNDICE 6



**Figura 4. Fotomicrografia do colágeno no músculo reto do abdome. Técnicas Histológicas. Hematoxilina-Eosina (A e B), *Tricômio de Masson* (C e D) e *Picro Sirius red* com luz polarizada (E e F) sendo na primeiro coluna o grupo 1 e na segunda coluna grupo 2. Aumento 100x.**

## APÊNDICE 7



**Figura 5. Fotomicrografia do colágeno no músculo reto do abdome. Técnica de Imuno-histoquímica. Colágeno I (A e B), colágeno II (C e D), colágeno III (E e F), colágeno IV (G e H) e colágeno V (I e J), sendo na primeira coluna o grupo 1 e na segunda coluna grupo 2. Aumento 100x.**

**ANEXOS**

## ANEXO 1

## FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA - PROTOCOLO CEP 1492/08



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 19 de dezembro de 2008.  
CEP 1492/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) ELIZIANE NITZ DE CARVALHO CALVI

Co-Investigadores: Marcus Vinícios barbosa, Maria Tereza de Seixas Alves, Fábio Xerfan Nahas ( Orientador)

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação das fibras de colágeno do músculo reto abdominal em cadáveres".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: ESTUDO CLÍNICO OBSERVACIONAL - TRANSVERSAL.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco.

OBJETIVOS: Avaliar a quantidade de colágeno no músculo reto do abdome em diferentes faixas etárias, em cadáveres..

RESUMO: Serão dissecados 20 cadáveres adultos, frescos com tempo de óbito de até 24 horas, provenientes do IML. Serão realizadas as medidas de altura, peso, distância xifo-púbica, distância entre as cristas e cálculo do índice de massa corporea. Será realizada a dissecação anatômica dos cadáveres..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Devido às variações de quantidade e tipos de fibras de colágeno e a ocorrência de hérnias mediadas este projeto pretende estudar o colágeno no musculo reto do abdome..

MATERIAL E MÉTODO: materiais e métodos adequadamente descritos.

TCLE: Não apresentado.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 14/12/2009 e 14/12/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.





Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1492/08

## ANEXO 2

## FOLHA DE AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO MÉDICO LEGAL

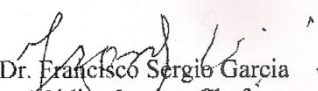
DEC-03-2008 02:35 PM CLINICA TUTTI CORPORE 01637011824 P.02



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA  
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA


**AUTORIZAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que, após análise do projeto de pesquisa intitulado “Análise das Fibras de Colágeno do Músculo Reto do Abdome” (sob a responsabilidade dos pesquisadores Eliziane Nitz de Carvalho, Marcus Vinícius Jardini Barbosa e Fábio Xerfan Nahas), autorizo a realização do presente estudo neste Instituto Médico-Legal. Declaro ainda que o mesmo encontra-se eticamente embasado dentro dos princípios que dispõe a resolução CNS 196/96.

  
Dr. Francisco Sérgio Garcia  
Médico Legista Chefe  
CRM - 26.105

## ANEXO 3

## ANTICORPO - COLÁGENO I



## Datasheet

Cat No	Product	Pack	Price
2150-0020	<b>type-1-Collagen</b> antibody, rabbit: affinity purified Ig,	500 µl human	£200    \$348    □364

Product Type: antibody. Immunogen: native, from placenta. Host: rabbit. Type: polyclonal. Format: affinity purified Ig. Preparation: affinity chromatography. State: lyophilised. Buffer: PBS, pH 7.5, with sodium borate and 0.1% mannitol. Storage: store at -20°C, aliquot reconstituted at -20°C.

IHC(p) 1/10 - 1/50 (A/BA) ELISA 1/500 - 1/2000 (as a guide)

**Supply**  
Each vial contains 50 µg.

**Reconstitution**  
With 500 µl of sterile distilled water. The addition of 1% BSA and 0.1% sodium azide is recommended.

**Cross reactivity**  
Human collagen type I 100% Human collagen type II <0.5% Human collagen types IV and V <0.5% Reactivity with human collagen III in ELISA is <10%. This is reduced to <1% in IHC/BLOT. This anomaly is unexplained.  
Fibronectin, fibrinogen, albumin and laminin all <0.5%.

**Antigen preservation**  
Is suitable for use on paraffin sections following pretreatment with 1 mg/ml pepsin in 0.5 M acetic acid for 2 hours at 37°C and multiple buffer washes. Also can be used on acetone fixed cryostat sections and cytopins.

**Storage**  
Store lyophilised product with desiccant.

Print
close

## ANEXO 4

## ANTICORPO - COLÁGENO II



<b>Novotec</b>	<b>Reagents</b>	<b>Services</b>	<b>References</b>	<b>Contact</b>
----------------	-----------------	-----------------	-------------------	----------------

### Purified rabbit anti-human type II collagen

Ref. 20211

#### Description

Chromatography purified rabbit antibody to human type II collagen extracted, purified from human cartilage.

#### Format

purified, freeze-dried antibody in 0.5 ml vials. Reconstitute with 0.5 ml diH<sub>2</sub>O and store aliquots at -20°C.

#### Stability

**Unreconstituted** : 24 months at +2°/8°C or longer at -20°C ; avoid freeze-thaw cycles by aliquoting before storage at -20°C and use.

**Reconstituted** : 6 months (mini) at -20°C.

#### Applications

IFA, IHC(p), ELISA, (SP)RIA (tested).

#### Specificity

(% at a 1:200 RIA dilution)

Human collagen, type II	100
Human collagen, type I	< 1.0
Human collagen, type III, V	< 1.0
Human collagen, type IX, XI	< 0.1

#### Use

For the immunostaining of extra or intracellular components in light microscopy and the quantitation of human type II collagen in biological fluids or culture supernatants.

#### Working dilutions

- ✦ **IFA** (with fluorescein anti-rabbit IgG conjugate) ; use diluted at  $\geq 1:40$  on frozen human tissues (skin, liver, placenta...).
- ✦ **IHC(p)** (immunoperoxidase technique with the Envision / Dako kit [1]) ; use diluted at  $\geq 1:250$  on fixed, paraffin-embedded human tissues (skin, liver, placenta, etc.).
- ✦ **ELISA** ; use diluted at  $\geq 1:100$ - $1:200$  (OD  $\geq 500$ ).

#### Major publication references





> All references

**023** - Ricard-Blum S., Tiollier J., Dodille M.P., Magloire H., Garrone R., Ville G., Herbage heterogeneity in bovine and human cartilage. In Current clinical and fundamental problems, Primard, Paris, 1985, 123-133. (**Ih, Ib, IIh, IFA, ME-PO**)

**120** - Skalova A., Leivo I., Michal M. Saksela collagen isotypes in crystalloid structures o tumors. Hum. Pathol. 1992, 23, 748-754. (**IIh** /

## ANEXO 5

## ANTICORPO - COLÁGENO III

		Cat. No            2150-0100	
		Batch No        990205E	
		Quantity        500 µl	
<b>Polyclonal antibody to</b>			
<b>COLLAGEN TYPE III</b>			
<b>Host:</b>		<b>Rabbit.</b>	
<b>Immunogen:</b>		<b>Highly purified Human Collagen type III from human placenta.</b>	
<b>Presentation:</b>		<b>Lyophilised, affinity purified Ig in PBS buffer.</b>	
<b>Assay system:</b>		<b>IHC(p)/ELISA.</b>	
<b>Title:</b>		<b>Use at 1/10 to 1/50 in an A/BA system on paraffin embedded formalin fixed sections, following pretreatment with 1 mg/ml pepsin in 0.5 M acetic acid for 2 hours at 37 °C and multiple buffer washes. Also can be used on acetone fixed cryostat sections and cytopspins.</b>	
<b>Cross Reactivity:</b>		<b>Human Collagen Type III            100%</b> <b>Human Collagen Type I            &lt;10%</b> <b>Human Collagen Type II            &lt;0.5%</b> <b>&lt;0.5% reactivity with Type IV and V Collagens.</b> <b>&lt;0.5% reactivity with Fibronectin, and albumin.</b>	
<b>Reconstitution:</b>		<b>With 500 µl of sterile distilled water.</b>	
<b>Storage:</b>		<b>Short-term storage at 4 °C, Aliquot and store reconstituted product at -20 °C</b>	
<b>Associated products:</b>		<b>Polyclonal antibodies to other human collagens and human antigens</b>	
06/01/99/sc/v03			
<b>For In-Vitro Research and Manufacturing Use Only</b>			
	Head office: Biogenesis Ltd, 7 New Fields, Poole BH17 0NF, England, UK Telephone: (01202) 660006 Fax: (01202) 660020 E-Mail: biogenesis@ltd.co.uk Website: www.biogenesis.co.uk/home/ US office: Biogenesis Inc. Mailing Address: PO Box 1016 Kingston, NH 03833, USA Telephone: 603-642-8302 Fax: 603-642-8322 E-Mail: biogenesis@sprintmail.com	  Certificate No. FS31940	2001?
IMPORTANT INFORMATION OVERLEAF			

## ANEXO 6

## ANTICORPO - COLÁGENO IV

Novotec	Reagents	Services	References	Contact										
<b>Purified rabbit anti-human type IV collagen</b>														
Ref. 20411														
<b>Description</b>														
Affinity chromatography purified rabbit antibody to human type IV collagen extracted, purified from human placenta.														
<b>Format</b>														
Purified, freeze-dried antibody in 0.5ml vials. Reconstitute with 0.5ml diH2O and store aliquots at -20°C.														
<b>Stability</b>														
<b>Unreconstituted</b> : 24 months at +2°/8°C or longer at -20°C ; avoid freeze-thaw cycles by aliquoting before storage at -20°C and use.														
<b>Reconstituted</b> : 6 months (mini) at -20°C.														
<b>Applications</b>														
IFA, IHC(p), ELISA, (SP)RIA (tested).														
<b>Sppecificity</b>														
(% ; at a 1:1000 RIA dilution)														
<table border="0"> <tr> <td>Human Collagen type IV</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>Human collagen, types I, II</td> <td>&lt; 0.1</td> </tr> <tr> <td>Human collagen, types III, V</td> <td>&lt; 1.0</td> </tr> <tr> <td>Human fibronectin</td> <td>&lt; 0,1</td> </tr> <tr> <td>Mouse laminin</td> <td>&lt; 0,1</td> </tr> </table>					Human Collagen type IV	100	Human collagen, types I, II	< 0.1	Human collagen, types III, V	< 1.0	Human fibronectin	< 0,1	Mouse laminin	< 0,1
Human Collagen type IV	100													
Human collagen, types I, II	< 0.1													
Human collagen, types III, V	< 1.0													
Human fibronectin	< 0,1													
Mouse laminin	< 0,1													
Use for the immunostaining of extra or intracellular components in light microscopy and the quantitation of human type IV collagen in biological fluids or culture supernatants.														
<b>Working dilution</b>														
✦ <b>IFA</b> (with fluorescein anti-rabbit IgG conjugate) ; use diluted at $\geq 1:80$ on frozen human tissues (skin, liver, placenta ..).														
✦ <b>IHC(p)</b> (immunoperoxidase technique with the Envision / Dako kit [1]) ; use diluted at $\geq 1:250$ on fixed, paraffin-embedded human tissues (skin, liver, placenta ...).														
✦ <b>ELISA</b> ; use diluted at $\geq 1:200$ (OD $\geq 500$ ).														
<b>Major publication references</b>														
> All references														
<b>001</b> - Grimaud J.A., Druguet M., Peyrol S., Chev D., El Badrawy N. - Collagen immunotyping in hi and electron microscope study. J. Histochem. 28, 1145-1156. (Ih, IIIh, IVh, Vh / IFA, ME-F														
<b>034</b> - Demarchez M., Hartmann D.J., Pru immunohistological study of the revasculariz. human skin transplanted onto the nude mouse 1987, 43, 896-903. (IVh, IVm / IFA)														
<b>110</b> - Bonkhoff H., Wernert N., Dhom G., Distribution of basement membranes in primar carcinomas of the prostate. Hum. Pathol. 199 (IVh, LNm / MO-PO)														
<b>169</b> - Castera L., Hartmann D.J., Chapel F., Gu Lons T., Richardet J.P., Grimbert S., Morassi O Trinchet J.C. - Serum laminin and type IV colla markers of histologically severe alcoholic hepatit cirrhosis. J. Hepatol. 2000, 32,412-418. (Ih, III														
<b>171</b> - Heidet L., Cai Y., Guicharnaud L., Antigna - Glomerular expression of type IV collagen cha X-linked alport syndrome kidneys. Am. J. Pe 1901-1910. (IVh / IFA)														
<a href="http://www.novotec-labs.com/article.php3?id_article=32">http://www.novotec-labs.com/article.php3?id_article=32</a>														
				31/3/2004										

## ANEXO 7

## ANTICORPO - COLÁGENO V

*From Biology to Discovery™***Collagen V Antibody**

**Subcategory:** Rabbit Polyclonal Antibody  
**Cat. No.:** 251202  
**Unit:** 0.1 mg

**Description:**

Collagen type V collagen (collagen V) is a member of group I collagen (fibrillar forming collagen). Collagen V is a minor connective tissue component of nearly ubiquitous distribution. Collagen V binds to DNA, heparan sulfate, thrombospondin, heparin, and insulin. Defects in COL5A1 are a cause of Ehlers-Danlos syndrome type 1 (EDS1), also known as Ehlers-Danlos syndrome gravis or severe classic type Ehlers-Danlos syndrome. EDS is a connective tissue disorder characterized by hyperextensible skin, atrophic cutaneous scars due to tissue fragility and joint hyperlaxity.

**Isotype:** Rabbit Ig

**Applications:** E, WB, IHC

**Species Reactivity:** H, M, R, B, P, D, Ck

**Format:** Each vial contains 0.1 mg IgG in 0.1 ml (1 mg/ml) of PBS pH7.4 with 0.09% sodium azide. Antibody was purified by Protein-G affinity chromatography.

**Alternate Names:** Collagen alpha-1(V) chain; COL5A1; Collagen V; Collagen type V

**Accession No.:** P20908

**Antigen:** KLH-conjugated synthetic peptide encompassing a sequence within the center region of human collagen V.

**Application Notes:** E: 1:500-1:1,000; WB: 1:100-1:500; IHC: 1:100-1:500

**Storage:** Store at -20°C. Minimize freeze-thaw cycles.  
Product is guaranteed one year from the date of shipment.

For research use only, not for diagnostic or therapeutic procedures.

**ANEXO 8**

**ANTICORPO – SECUNDÁRIO**

**DakoCytomation**  
**LSAB+ System-HRP**

Code K0679 15 mL

Code K0690 110 mL

**CE**

 **DakoCytomation**



## **FONTES CONSULTADAS**

**FONTES CONSULTADAS**

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: BIREME; [cited 2013 Jul 18]. Available from: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM, Nahas FX. A importância da pesquisa na cirurgia plástica brasileira. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(2):1.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):2-9.

Nahas FX, Ferreira LM. A arte de redigir um trabalho científico. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):17-8.

Nahas FX; Ferreira LM. Análise dos itens de um trabalho científico. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):13-6.

Nahas FX, Ferreira LM. Cadaver as an experimental model to study the effect of muscle advancement on the waistline. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):104-9.

Nahas FX, Hochman B, Ferreira LM. Desenvolvimento do estudo: estratégia inicial. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):10-2.

Siegel S, Castalani JR. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Zar JH. Bioestatistical analysis. Englewood: Prentice-Hall, INC.; 1997. 718p.