

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

IGOR ARANTES DE OLIVEIRA GÓES

**CONTEÚDO E EXPRESSÃO TECIDUAL DE COLÁGENO I, IV E
LAMININA NA MATRIZ EXTRACELULAR EM PORTADORES
DE ADENOCARCINOMA DA PRÓSTATA.**

Bragança Paulista
2024

IGOR ARANTES DE OLIVEIRA GÓES – R.A. 202113410

**CONTEÚDO E EXPRESSÃO TECIDUAL DE COLÁGENO I, IV E
LAMININA NA MATRIZ EXTRACELULAR EM PORTADORES
DE ADENOCARCINOMA DA PRÓSTATA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real
Martinez

Bragança Paulista
2024

WJ 752
G543c

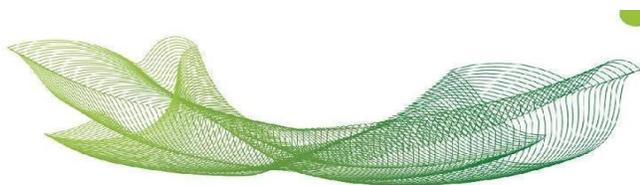
Góes, Igor Arantes de Oliveira

Conteúdo e expressão tecidual de colágeno I, IV e laminina na matriz extracelular em portadores de adenocarcinoma da próstata / Igor Arantes de Oliveira Góes. -- Bragança Paulista, 2024.

68 p.

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

1. Neoplasias da próstata. 2. Matriz extracelular.
3. Colágeno tipo I. 4. Colágeno tipo IV. 5. Laminina
I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.



Educando para a paz

GÓES, Igor Arantes de Oliveira. "Conteúdo e expressão tecidual de colágeno I, IV e laminina na matriz extracelular em portadores de adenocarcinoma da próstata". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 15 de fevereiro de 2024 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez - Orientador e Presidente Universidade São Francisco

Prof. Dr. Felipe David Mendonça Chaim Universidade
Estadual de Campinas

Profa. Dra. Raquel Girardello
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado, primeiramente, aos meus queridos pais. Ao meu pai, **ANTONIO ROBERTO DE OLIVEIRA GÓES**, por ser o médico que mais me inspira e à minha mãe, **DAISE ABADIA ARANTES GÓES**, educadora, que com palavras de sabedoria, sempre me incentivou a buscar novos conhecimentos.

À **MARIA ROBERTA PEREIRA MARTINS**, minha namorada, pelo apoio, carinho e compreensão incondicional. Ao meu irmão, **HÉLIO ARANTES DE OLIVEIRA GÓES**, que sempre vibra com minhas conquistas.

Ao meu querido professor e orientador Dr. **CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**, não apenas na elaboração desse trabalho, mas por toda contribuição na minha formação acadêmica, científica e cirúrgica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por guiar meus passos, abençoar meus dias e me permitir mais essa conquista.

Agradeço aos pacientes e familiares do Serviço de Urologia **DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO NA PROVIDÊNCIA DE DEUS**, pela confiança e disposição em colaborar com o ensino e pesquisa.

Agradeço à **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO (USF)**, pelo excelente programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, e por possibilitar a realização e conclusão deste projeto.

Ao **HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO NA PROVIDÊNCIA DE DEUS (HUSF)**, pela autorização para obtenção dos dados clínicos nos prontuários, em especial aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

À Profa. **HELENICE PIOVESAN** (*in memoriam*) e ao **PROF. CARLOS ALBERTO FONTES DE SOUSA** patologistas responsáveis pelo **CENTRO DE DIAGNÓSTICO EM ANATOMIA PATOLÓGICA (CEDAP)**, pela doação das duplicatas dos blocos de parafina de doentes com câncer de próstata, imprescindível para elaboração deste estudo.

Ao Prof. Dr. **JOSÉ AIRES PEREIRA**, pelo inestimável auxílio e orientação durante a confecção das lâminas histológicas e das técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas.

Aos alunos **MATEUS MAGAMI YOSHITANI** e **GEOVANNA PACCIULLI PEREIRA**, do Programa de Iniciação Científica da USF, pelo auxílio na leitura das lâminas imuno-histoquímicas.

Ao Dr. **ENRICO CROTTI PEREIRA**, pela dedicação na revisão dos prontuários, coleta de dados, auxílio na leitura das lâminas e escrita desta Dissertação.

A todos os Professores do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA USF**, em especial à Secretária **ANDREA APARECIDA DE SOUZA FERNANDES**, pela orientação e auxílio durante todo o curso.

“Uma das coisas que eu aprendi da maneira mais difícil é que não vale a pena ficar desanimado. Manter-se ocupado e fazer do otimismo um estilo de vida pode restaurar sua fé em si mesmo.”

Autor Desconhecido

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais frequente na população masculina brasileira, com exceção do câncer de pele não melanoma. Sempre há dúvida do porquê alguns tumores conseguem desenvolver um potencial de agressividade maior que o de outros. Embora a maioria dos estudos mostre alteração na expressão das moléculas de adesão celular e da matriz extracelular, correlacionando as mesmas com o Grau de Gleason, nenhum estudo mensurou, de forma objetiva, o conteúdo tecidual dessas moléculas. O trabalho objetiva mensurar o conteúdo e a expressão tecidual de colágeno tipo I, IV e laminina na matriz extracelular em portadores de adenocarcinoma da próstata e correlacionar com a classificação de Gleason, com características clínicas, doenças associadas e hábitos de vida. Foram estudados 41 pacientes submetidos a prostatovesiculectomia radical em oncologia, por neoplasia de próstata, operados pelo serviço de urologia do Hospital Universitário São Francisco de Assis (HUSF), entre 01/01/2015 e 31/12/2020. A medida do conteúdo tecidual das proteínas foi analisada com ajuda de microscopia óptica em uma magnificação final de 200x. Em cada lâmina foram realizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), além de técnica de imuno-histoquímica específica para identificar a expressão de colágeno I, IV e laminina, no estroma celular de todas as lâminas, por três examinadores independentes, que também desconheciam os objetivos finais do presente estudo. Assim, o cálculo do valor final encontrado no tecido neoplásico, foi constituído pela média da soma dessas leituras. Considerou-se as somas de Gleason como sendo um score e , foi utilizado a correlação de Pearson para medir o grau de correlação com colágeno e laminina. Em todos os testes adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A expressão média de colágeno I na amostra de portadores de adenocarcinoma de próstata foi de $7,16 \pm 1,03$ pixels/campo. Na mensuração do colágeno tipo IV, a média foi de $3,44 \pm 0,61$ pixels/campo e, na mensuração da laminina, obtivemos uma média de $5,19 \pm 0,79$ pixels/campo. O Gleason total tem correlação tanto com colágeno quanto laminina, sendo a maior correlação ocorrida com laminina de $r = -0,566$ (p -valor $< 0,001$). As correlações foram todas negativas o que mostra que quanto maior o valor do colágeno/laminina, menor será o valor do Gleason total e vice-versa. Todas as três correlações com Gleason total podem ser classificadas como moderadas. Na expressão de laminina temos que a média foi de 6,60 pixels/campo para Gleason 6 contra 4,36 pixels/campo em Gleason 7 e média de 3,47 pixels/campo para Gleason 9 (p -valor = 0,004). Na expressão de laminina a diferença ocorreu entre o Gleason 6 e os outros dois grupos de Gleason, com p -valor de 0,026 (para Gleason 7) e 0,010 (para Gleason 9). O Gleason total tem correlação tanto com colágeno quanto laminina. As correlações foram todas negativas o que mostra que quanto maior o valor do colágeno e da laminina, menor será o valor do Gleason total e vice-versa.

DESCRITORES: Neoplasias da Próstata. Matriz Extracelular. Colágeno Tipo I. Colágeno Tipo IV. Laminina.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most frequent neoplasm in the Brazilian male population, excluding non-melanoma skin cancer. There is always a question as to why some tumors can develop a higher potential for aggressiveness than others. Although most studies show alterations in the expression of cell adhesion molecules and the extracellular matrix, correlating them with the Gleason score, no study has objectively measured the tissue content of these molecules. This study aims to measure the content and tissue expression of collagen type I, IV, and laminin in the extracellular matrix in patients with prostate adenocarcinoma and correlate it with the Gleason score, clinical characteristics, associated diseases, and lifestyle habits. We studied 41 patients who underwent radical prostatectomy for prostate cancer by the urology service at São Francisco de Assis University Hospital (HUSF) between 01/01/2015 and 12/31/2020. The measurement of tissue content of the proteins was analyzed using optical microscopy at a final magnification of 200x. Hematoxylin-Eosin staining and specific immunohistochemical techniques to identify the expression of collagen I, IV, and laminin were performed on each slide. Three independent examiners, who were also unaware of the final study objectives, conducted these evaluations. The final value in the neoplastic tissue was calculated as the average of these readings. The Gleason sums were considered as scores, and Pearson's correlation was used to measure the degree of correlation with collagen and laminin. A significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted in all tests. The mean expression of collagen type I in the sample of prostate adenocarcinoma patients was 7.16 ± 1.03 . For collagen type IV, the mean was 3.44 ± 0.61 , and for laminin, we obtained a mean of 5.19 ± 0.79 . The total Gleason score correlated with both collagen and laminin, with the strongest correlation occurring with laminin, with $r = -0.566$ (p -value < 0.001). All correlations were negative, indicating that higher values of collagen/laminin corresponded to lower total Gleason scores, and vice versa. All three correlations with the total Gleason score can be classified as moderate. In laminin expression, the mean was 6.60 for Gleason 6 compared to 4.36 for Gleason 7 and a mean of 3.47 for Gleason 9 (p -value = 0.004). The difference in laminin expression occurred between Gleason 6 and the other two Gleason groups, with p -values of 0.026 (for Gleason 7) and 0.010 (for Gleason 9). The total Gleason score correlates with both collagen and laminin. All correlations were negative, indicating that higher values of collagen and laminin corresponded to lower total Gleason scores, and vice versa.

KEYWORDS: *Prostatic Neoplasms. Extracellular Matrix Proteins. Collagen Type I. Collagen Type IV. Laminin.*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ANOVA – Análise de Variância

CAAE – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CaP – Câncer de Próstata

CEDAP - Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CV – Coeficiente de Variação

DM – Diabetes Mellitus

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HE - Hematoxilina-Eosina

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

HUSF – Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus

IC – Intervalo de Confiança

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISUP - International Society of Urological Pathology

LIM - Laboratório de Investigação Médica

MAC – Moléculas de Adesão Celular

MEC – Matriz Extracelular

PBS – Tampão Fosfato Salino

PSA – Antígeno Prostático Específico

RM – Ressonância Magnética

SBU – Sociedade Brasileira de Urologia

TCUD - Termo de Compromisso de Utilização de Dados

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

USG – Ultrassonografia

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Classificação de Gleason.....	15
FIGURA 2 . RM de Próstata.....	17
FIGURA 3. Metástases do câncer de próstata.....	18
FIGURA 4. Ilustração explicativa das junções intercelulares.....	20
FIGURA 5. Ilustração explicativa da matriz extracelular.....	22
FIGURA 6. Fluxograma dos pacientes incluídos e excluídos no presente estudo..	28
FIGURA 7. Intervalo de confiança para a média.....	33
FIGURA 8: Correlação entre o conteúdo de colágeno I, IV e laminina com Gleason.....	37
FIGURA 9. Compara grupos de Gleason com expressão de colágeno e laminina.....	39
FIGURA 10. Compara fatores demográficos para colágeno I.....	43
FIGURA 11. Compara fatores demográficos para colágeno IV.....	43
FIGURA 12. Compara fatores demográficos para laminina.....	44
FIGURA 13. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 7. (100x).....	45
FIGURA 14. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 7. (400x)	45
FIGURA 15. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 32. (100x)	46
FIGURA 16. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 32. (400x)	46
FIGURA 17. Imuno-histoquímica do colágeno I em tecido prostático neoplásico no doente número 18. (300x)	47
FIGURA 18. Imuno-histoquímica do colágeno IV em tecido prostático neoplásico no doente número 26. (200x).....	47
FIGURA 19. Imuno-histoquímica da laminina em tecido prostático neoplásico no doente número 5. (200x).....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Correlação entre grau de Gleason e escore de ISUP.....	16
TABELA 2. Análise descritiva completa dos fatores quantitativos.....	33
TABELA 3. Distribuição dos fatores qualitativos.....	34
TABELA 4. Correlação do Gleason total, Idade e PSA com colágeno e laminina....	34
TABELA 5. Compara grupos (4 grupos) de Gleason para colágeno e laminina.....	36
TABELA 6. P-valor do post-hoc para 4 grupos de Gleason.....	36
TABELA 7. Compara grupos (3 grupos) de Gleason para colágeno e laminina.....	38
TABELA 8. P-valor do post-hoc para 3 grupos de Gleason.....	39
TABELA 9. Comparação de fatores demográficos para colágeno I.....	40
TABELA 10. Comparação de fatores demográficos para colágeno IV.....	41
TABELA 11. Compara de fatores demográficos para laminina.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Câncer de próstata.....	14
1.2 Metástases do câncer de próstata.....	17
1.3 Moléculas de adesão celular (CAM).....	20
1.4 Matriz extracelular (MEC).....	21
1.5 Colágenos.....	22
1.6 Laminina.....	24
1.7 Justificativa e motivação do trabalho.....	25
2 OBJETIVO	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Ética.....	27
3.2 Desenho do estudo.....	27
3.3 Casuística.....	28
3.4 Coleta de dados.....	29
3.5 Blocos de parafina.....	29
3.6 Técnica de coloração.....	29
3.7 Técnica de imuno-histoquímica.....	30
3.8 Medida do conteúdo tecidual de colágeno I, colágeno IV e laminina.....	31

3.9 Análise estatística	32
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Variáveis clínicas.....	32
4.2 Correlação entre Gleason total, idade e PSA com colágeno e laminina...	35
4.3 Comparação entre os grupos de Gleason para colágeno e laminina.....	35
4.4 Comparação de fatores demográficos para colágeno e laminina.....	40
4.5 Variáveis histopatológicas.....	45
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS	61
ANEXO I . Aprovação na comissão de ética e pesquisa.....	61
ANEXO II. Autorização para realização da pesquisa.....	66
ANEXO III. Carta de doação dos blocos de parafina.....	67
ANEXO IV. Carta autorização para o uso dos blocos de parafina.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) representa a neoplasia mais prevalente entre a população masculina do Brasil, excluindo o câncer de pele não-melanoma. Segundo dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), há uma projeção de 71.740 novos casos de CaP no Brasil, a cada ano, durante o triênio de 2023 a 2025. Esse dado reflete um risco estimado de 62,95 novos casos para cada 100 mil homens. A incidência desse câncer é notadamente superior em nações desenvolvidas quando comparada a países em desenvolvimento. Dentre os diversos tipos de câncer, destaca-se como uma condição associada predominantemente à terceira idade, dado que cerca de 80% dos diagnósticos ocorrem em indivíduos com 65 anos ou mais (INCA, 2023).

O CaP é a quinta neoplasia que mais mata globalmente. Braga e colaboradores (2021), através de um estudo retrospectivo, relataram que ocorreu, em 2018, 358.989 mortes em todo o mundo, sendo a mortalidade diretamente relacionada a idade. Seus principais os fatores de risco são a idade avançada, etnia negra, genética e histórico familiar e, apesar da evolução dos métodos diagnósticos e do aumento da possibilidade de detecção precoce, ainda é um desafio a definição exata do comportamento biológico do CaP, uma vez que é amplamente variável (INCA, 2019).

Existe uma associação reconhecida entre o CaP e a influência dos androgênios na próstata humana. Autores como Brum, Spritzer e Brentani (2005) destacam essa conexão, tanto em relação à morfogênese, diferenciação, proliferação celular e secreções da glândula prostática, como na resposta ao tratamento hormonal observada em indivíduos com CaP. No entanto, é importante ressaltar que os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose ainda não foram completamente esclarecidos. Da mesma forma, os mecanismos de transformação neoplásica e a própria carcinogênese dos tumores prostáticos ainda precisam ser melhores compreendidos.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), o diagnóstico do CaP é feito a partir da combinação do toque retal (próstata endurecida ou com nódulos) associado a dosagem do antígeno prostático específico (PSA). O PSA é uma protease produzida a partir dos ácinos prostáticos cuja função é liquefazer o sêmen. Portadores de tumores prostáticos que cursam com níveis séricos elevados de PSA, geralmente, apresentam pior prognóstico. A partir de uma suspeita clínica de CaP, seja por um toque retal alterado, no exame físico ou um PSA

umentando, faz-se necessário um ultrassom de próstata com biopsia, para a conformação histopatológica (SBU, 2018).

O grau de diferenciação histológica tumoral é estabelecido pela determinação da classificação de Gleason (Figura 1) que tem habilidade preditiva de agressividade da neoplasia. O escore de Gleason que varia de 1-5, por sua vez, é dado pela soma dos dois padrões mais representativos da amostra tumoral, podendo variar entre 2 e 10, conforme explica a World Health Organization (WHO). O primeiro número atribuído é o grau histológico mais comum presente no tumor. Por exemplo, se a pontuação escrita for como $3 + 4 = 7$, significa que a maior parte do tumor possui grau histológico 3 e a menor grau histológico 4. Assim, eles são somados para uma pontuação final Gleason 7 (WHO, 2023).



FIGURA 1. Classificação de Gleason. Nota-se a perda da conformação glandular conforme aumenta o Gleason, ficando cada vez mais indiferenciado. Fonte: figura adaptada de Epstein et al., 2005.

Cânceres com pontuação de Gleason até 6, são frequentemente chamados de tumores bem diferenciados ou tumores de baixo grau. Já àqueles pontuados como Gleason 7 são considerados moderadamente diferenciados ou de grau intermediário. Os tumores com pontuação entre 8-10 são chamados de pouco diferenciados ou de tumores de alto grau.

Em 2005, um sistema de graduação foi proposto pela Internacional Society of Urological Pathology (ISUP), com intuito de melhorar a acurácia da estratificação de risco de cada paciente (Tabela 1). Essa graduação utiliza os dados do Gleason para classifica o paciente em 5 grupos distintos segundo a característica do crescimento da neoplasia (WHO, 2023).

TABELA 1. Correlação entre grau de Gleason e escore de ISUP. Fonte: Tabela adaptada de Van Leenders et al., 2020.

Grau de Gleason	Escore da ISUP ¹	Características do tumor
6 (3+3)	1	Crescimento lento
7 (3+4)	2	Crescimento intermediário
7 (4+3)	3	Crescimento intermediário
8 (4+4)	4	Crescimento rápido
9 ou 10 (4+5, 5+4, 5+5)	5	Crescimento muito rápido

1. ISUP – International Society of Urological Pathology

Exames complementares, tais como tomografia computadorizada, ressonância magnética (RM) e cintilografia óssea, também são empregados no estadiamento da doença assim como para avaliação de grau de invasão tumoral, metástases.

Uma das maiores limitações da biópsia de próstata guiada por USG é que ela não é direcionada a um alvo específico e sim a diferentes segmentos aleatórios da próstata, já que o tumor prostático não costuma ser visível na ultrassonografia. Nesse contexto, a biópsia de próstata com fusão de imagem de RM vem ganhando espaço por aumentar a acurácia diagnóstica e do estadiamento do CaP, pois permite sobrepor as imagens da RM às do USG, possibilitando que seja colhida uma biópsia de um determinado ponto específico da lesão (Figura 2). A sensibilidade e a especificidade do exame são de até 74% e 88%, respectivamente. A desvantagem é seu alto custo, sendo pouco disponível no serviço público (WHO, 2023; SBU, 2018).

O tratamento do CaP é dividido como doença localizada (quando está localizada apenas na próstata e não comprometeu outros órgãos), doença localmente avançada ou doença metastática. Para doença localizada pode ser realizada a cirurgia, radioterapia ou, até mesmo, apenas uma vigilância ativa sem a indicação de qualquer modalidade terapêutica. Quando a doença é localmente avançada a radioterapia ou cirurgia associada ao tratamento hormonal são

as opções terapêuticas mais indicadas. Na doença metastática a terapia hormonal, é a estratégia mais adotada, segundo dados do INCA em 2019, permanecendo esses, atuais.

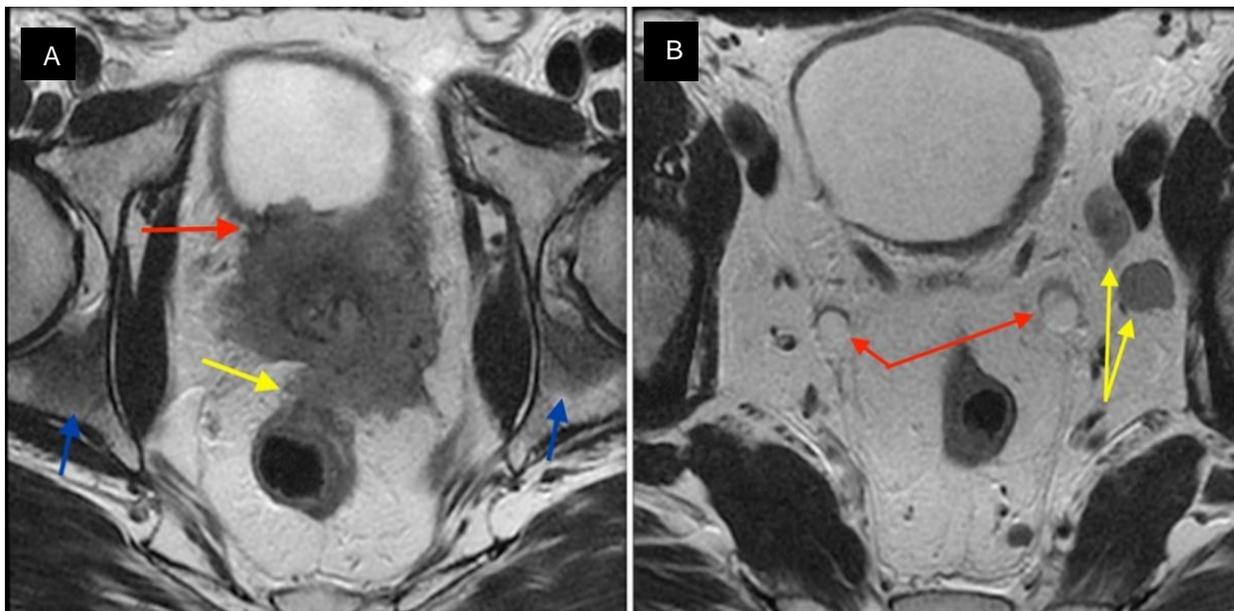


FIGURA 2. RM de Próstata. Na imagem A, vemos a invasão do CaP na bexiga (seta vermelha) e no reto (seta amarela), metástases ósseas (setas azuis). Na imagem B nota-se ureteronefrose bilateral (setas vermelhas) e Invasão linfonodal (setas amarelas). Fonte: figura adaptada de Redmond et al., 2020.

1.2 Metástases do Câncer de Próstata

De acordo com a SBU (2018), metástases do câncer de próstata ocorrem, principalmente, para linfonodos regionais e ossos. Outros sítios de metástase, menos comuns, incluem o fígado, pulmões e cérebro (Figura 3). Sua etiopatogenia é multifatorial. Porém, é importante destacar que os mecanismos envolvidos no deslocamento de uma célula neoplásica a partir de seu sítio primário para um linfonodo ou órgão distantes ainda não se encontram totalmente esclarecidos.

Fidler (2003) relatou que a disseminação de uma neoplasia pode ser vista como um processo de evolução somática resultante de uma série de pressões seletivas impostas por mecanismos antitumorais inatos do próprio organismo. Esses mecanismos podem ser intrínsecos à própria célula neoplásica, ou impostos pelo microambiente tecidual (membranas basais e componentes da matriz extracelular), falta de aporte de nutrientes e fatores de crescimento, geração de radicais livres, sinais pró-apoptóticos e ataque por células do sistema imunológico.

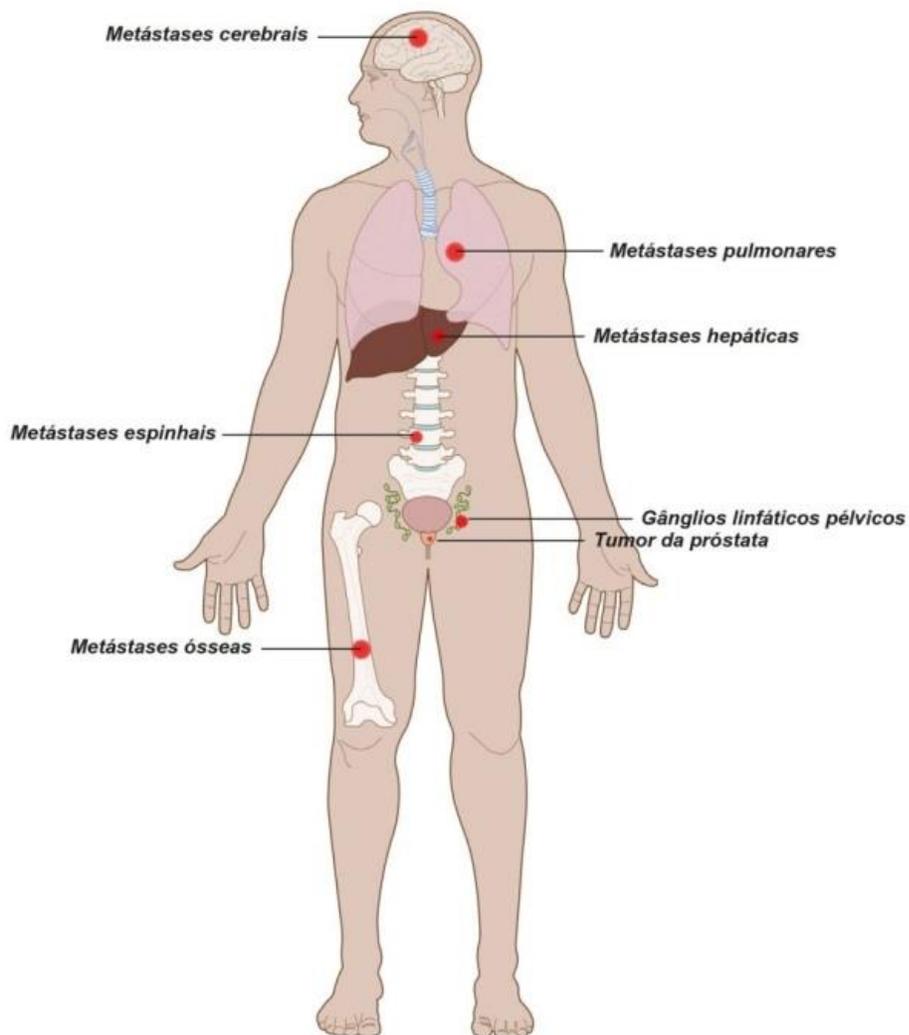


FIGURA 3. Metástases do Câncer de Próstata. Fonte: figura retirada de Gomes et al., 2008.

Comparado aos epitélios normais, os carcinomas tendem a apresentar reduzida adesividade celular. Cavallaro e Christofori (2004) descrevem alterações entre a dinâmica de adesões das células neoplásicas com a matriz extracelular, bem como outros tipos de células presentes no tecido prostático. O trabalho descreve ainda que, alterações na expressão de moléculas que compõe os sistemas de junções intercelulares, podem fazer parte de um processo mais amplo conhecido como transição epitélio-mesênquima, a exemplo do que ocorre durante o processo da embriogênese.

As alterações nas propriedades adesivas das células neoplásicas no CaP permitem desobedecer às regras que regem a manutenção da integridade arquitetural de cada tecido e

progredir em direção ao fenótipo maligno. A respeito do mecanismo de disseminação e crescimento de células metastáticas, Chambers, Groom e Macdonald (2002) descrevem a possibilidade de três desfechos possíveis para a célula, após a saída da corrente sanguínea: as células permanecerão em estado de dormência sem proliferarem-se; poderá ocorrer uma proliferação celular limitada pela incapacidade de realizar angiogênese (micrometástases), ou, finalmente, poderá haver uma progressão para a formação de metástases a distâncias ricamente vascularizadas.

Cameron et al. (2000), através de modelos experimentais, mostraram que cerca de 90% das células neoplásicas quando injetadas na corrente sanguínea são capazes de sair do sistema circulatório, penetrando no parênquima de outros órgãos. A imensa maioria dessas células entrará em apoptose ou permanecerão viáveis, mas num estado latente. Apenas 0,02% progredirão para metástases macroscópicas. O desenvolvimento de metástases vascularizadas e, portanto, com capacidade de progressão descontrolada, dependerá da interação entre as células neoplásicas e o tecido em questão.

Apesar do prognóstico do CaP habitualmente ser bom e, nos pacientes com doença primária localizada, apresentarem uma alta possibilidade de sobrevida em longo prazo, nos pacientes com CaP metastático, a doença permanece incurável, mesmo após avanço da ciência e uso de terapia multimodal, segundo Korke et al. (2022). A letalidade da doença avançada é impulsionada pela falta de medicamentos capazes de gerar respostas duráveis devido à extrema heterogeneidade do tumor, tanto no que se refere a genética tumoral, assim como nos níveis moleculares do tumor, tais como a perda da adesão celular, segundo Wang et al., 2018, esses aspectos fazem com que a sobrevida desses pacientes portadores de metástases torne-se menor.

O enfoque de muitos estudos atuais consiste em combinações de estratégias terapêuticas com forte potencial para maior durabilidade de respostas clínicas para possibilitar eventuais curas para os portadores de tumores mais avançados. A revisão sobre o diagnóstico e tratamento do CaP feita por Litwin e Tan (2017), enfatizou a importância em entender os mecanismos de oncogênese das metástases, reforçando que isso poderá fornecer ferramentas essenciais e determinantes no prognóstico, sobrevida, tempo livre de doença e, principalmente, na qualidade de vida dos doentes.

Nesse contexto, a perda da adesividade celular pode ser um dos fatores mais importantes na oncogênese das metástases no carcinoma da próstata. Porém, mais estudos são necessários para compreender todos esses mecanismos complexos.

1.3 Moléculas de Adesão Celular (MAC)

Martinez et al. (2017), descreve que a interação entre o epitélio e a matriz extracelular é de fundamental importância no desenvolvimento normal da célula, e influencia o crescimento, sobrevivência e diferenciação celular. As moléculas de adesão celular participam dessa interação e são responsáveis pela manutenção do fenótipo epitelial normal.

De acordo com Alberts et al., 2019, as células da próstata estabelecem conexões umas com as outras por meio de sistemas de adesão célula-célula, os quais desempenham um papel crucial na resistência mecânica da parede prostática. Para sustentar esse mecanismo, os filamentos proteicos de actina, que constituem o citoesqueleto celular, atravessam o citoplasma de cada célula epitelial e conectam-se a junções especializadas localizadas na membrana plasmática (Figura 4). Esse processo de comunicação celular envolve uma variedade de moléculas de adesão, conforme explicado por Feldman, Mullin e Ryan (2005). Essas moléculas podem ser responsáveis pela adesão entre células adjacentes ou entre uma célula e a lâmina basal.

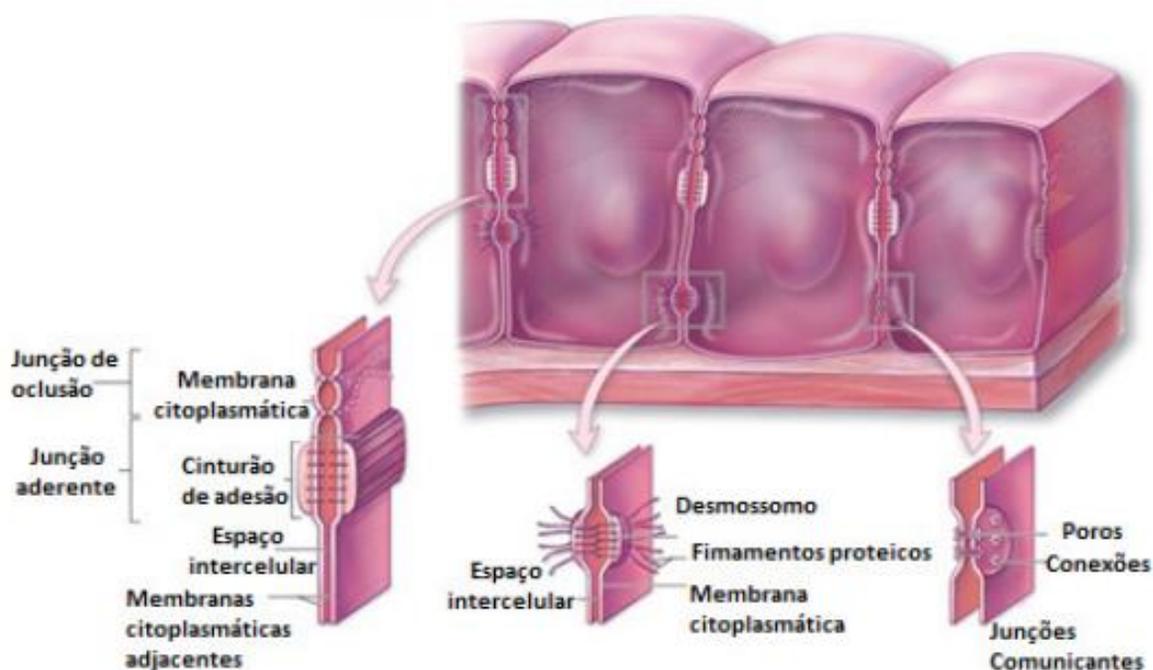


FIGURA 4. Ilustração explicativa das junções intercelulares. Fonte: Figura adaptada de Cooper e Hausman (2015).

A fim de garantir o funcionamento integrado das células em uma disposição compacta, é essencial a presença de estruturas de adesão especializadas. Essas estruturas consistem em moléculas de adesão celular organizadas, conforme detalhado em estudo por Pinheiro, Echalar e Queiroz (2021). Alterações da adesão celular fazem parte do processo de carcinogênese. Esse processo é caracterizado por uma sequência de eventos (neoangiogênese, degradação e remodelamento da membrana basal, desconexão do tumor com seu sítio primário), alcançando vasos sanguíneos e aderindo ao sítio a distância, (LODISH et al., 2013). Stewart, Cooper e Sikes (2004), descrevem que as células com maior adesividade tem menor potencial metastático, enquanto aquelas que apresentam menor adesão tecidual está associada a maior possibilidade de disseminação das células neoplásicas para sítios distantes.

1.4 Matriz Extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) é composta por um conjunto intricado de macromoléculas que preenchem, em diferentes proporções, o espaço intersticial de todos os sistemas orgânicos. Essas macromoléculas interagem com os elementos celulares e desempenham um papel crucial para as funções desses sistemas (Figura 5).

Alberts et al., 2019 discutem que, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos, a matriz extracelular (MEC) revela disparidades não apenas entre diferentes tecidos, mas também apresenta variações dentro de um mesmo tecido. Essas variações incluem um compartimento intersticial destinado a funções estruturais e um compartimento pericelular, que desempenha um papel fundamental em processos de interação celular, como fenômenos de adesão, migração e reconhecimento. Dentro do compartimento pericelular da MEC, estão presentes não apenas as membranas basais, mas também as moléculas de fibronectina, juntamente com uma quantidade significativa de proteoglicanos e outras proteínas multifuncionais.

Atualmente, reconhece-se a MEC como um elemento de grande importância em praticamente todos os processos teciduais. Ela serve como o substrato no qual as células realizam migração, proliferação e diferenciação. Além disso, desempenha o papel de um elemento estrutural estável que proporciona suporte físico para a arquitetura celular. Essa função de suporte é dinâmica, uma vez que as moléculas que conectam as células à MEC estão intimamente ligadas à membrana plasmática por meio de receptores específicos, interagindo direta ou indiretamente com o citoesqueleto, conforme observado por Alberts et al. (2004).

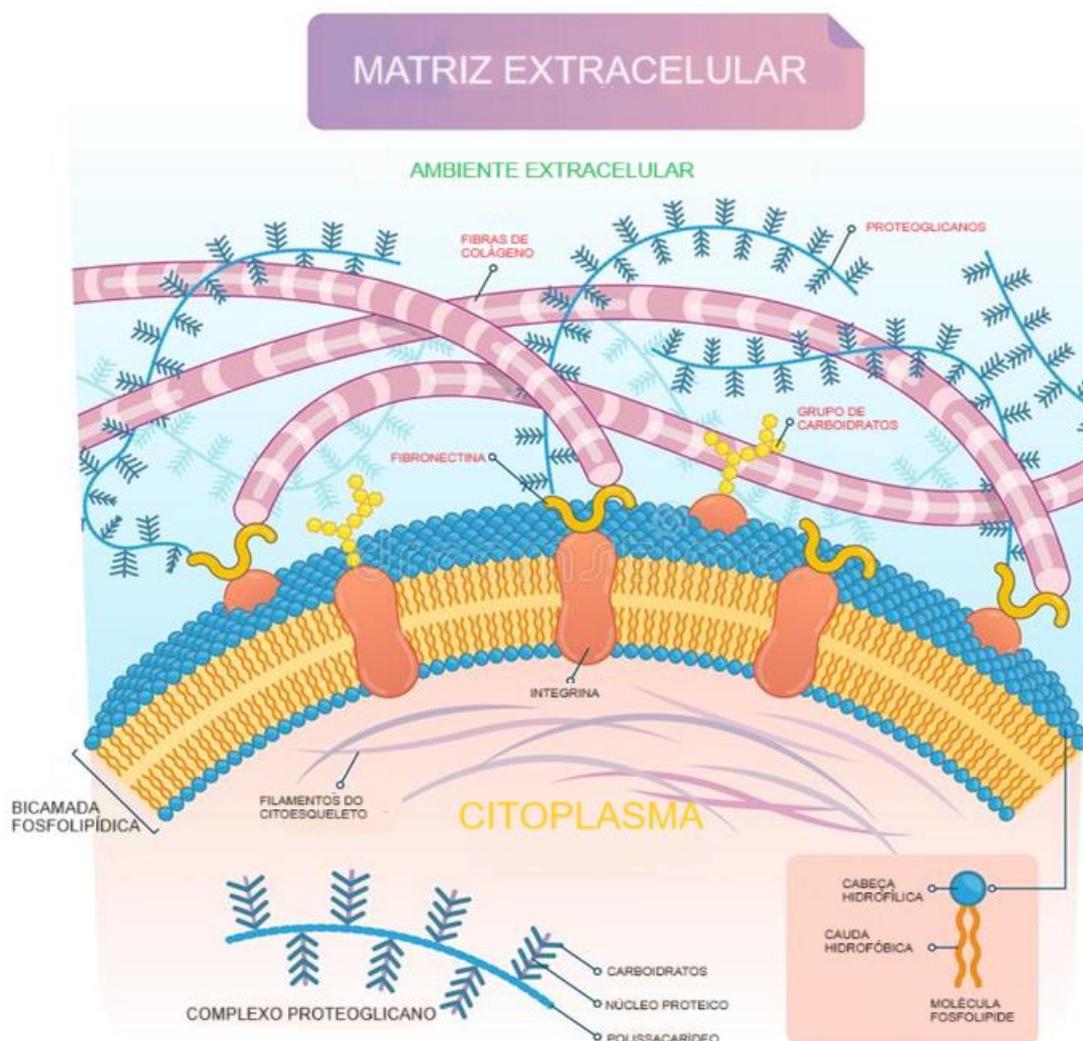


FIGURA 5. Ilustração explicativa da matriz extracelular. Fonte: figura adaptada de Anjos, Silva e Borelli, 2000.

Com base na caracterização morfológica e nas afinidades histoquímicas observadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, a MEC pode ser dividida duas porções distintas: um componente fibrilar, que engloba os diversos tipos de colágenos e fibras elásticas, e uma substância fundamental, composta por várias classes de glicoconjugados.

1.5 Colágenos

Conforme discutido por Cruz et al., 2022, as proteínas colagenosas formam uma classe de moléculas com diversidade funcional, mas compartilham algumas características bioquímicas que facilitam sua identificação. Essas proteínas consistem em três cadeias proteicas

filamentosas, chamadas cadeias D, que se agregam em uma hélice. Cada cadeia possui uma sequência única de aminoácidos que permite sua disposição na hélice voltada para a esquerda. Para serem consideradas cadeias D, essas devem incorporar unidades tripeptídicas repetitivas baseadas na glicina (Gli-X-Y), onde X e Y podem representar qualquer aminoácido, embora seja comum que X seja prolina e Y seja hidroxiprolina. O colágeno do tipo IV é um dos principais componentes da membrana basal das células prostáticas, porém outros colágenos fazem parte de sua constituição, tais como colágeno tipo I e III, entre outros.

Burns-Cox et al (2001) demonstraram que a menor quantidade de colágeno em tumores de grau de Gleason ≥ 8 pode levar à diminuição do sustento nutricional celular e, portanto, explicar o aumento de necrose tecidual de alto grau. Além disto, o CaP de alto grau está associado à perda de resistência estrutural, aumento da celularidade, diminuição da matriz extracelular, aumento da friabilidade, o qual confirma a evidente depleção de colágeno.

Podemos ter como hipótese que a alta expressão do gene de colágeno, como nos casos do Gleason 6, teria o efeito oposto justificando assim os diferentes fenótipos dos tumores de diferentes graus. Existem trabalhos procurando essa correlação, assim como o de Joaquim e El-Hani (2010). No entanto, nenhum desses estudos quantificou a expressão dos subtipos de colágeno nas células correlacionando com as variáveis clínicas ou histopatológicas tais como grau de Gleason, PSA, presença de comorbidades. Essas evidências tornam a proposta do presente estudo inédita.

Sabe-se que o colágeno do tipo I é o mais frequente na próstata. Essa proteína fibrilar é essencial para o suporte estrutural, regulação celular, reparo tecidual e desenvolvimento e crescimento da glândula, como reforça o trabalho Ying et al., 2023. Sua presença e funções são fundamentais para a saúde e o funcionamento normal do órgão.

Enquanto o colágeno tipo I é predominante no tecido conjuntivo e proporciona suporte estrutural, o colágeno tipo IV é um componente crucial e altamente especializado na próstata, desempenhando um papel fundamental na organização e integridade da membrana basal, fornecendo suporte e estabilidade para as células epiteliais que revestem os dutos e os ácinos prostáticos, citado no trabalho de Velosa, Teodoro e Yoshinari (2003).

Além da sua contribuição na formação da membrana basal, através de uma rede de malhas tridimensionais, Murador e Deffune (2007), ainda acrescenta que o colágeno tipo IV também desempenha um papel importante na manutenção da arquitetura celular, garantindo a correta compartimentalização dos tecidos na próstata.

Dreyfuss e Oliveira (2008), citam em seu trabalho que o colágeno IV também exerce um papel primordial no microambiente circundante as células epiteliais. Suas interações complexas

com proteínas e outros componentes da MEC regulam a polaridade, a adesão e a comunicação celular. Esse contexto molecular altamente orquestrado é essencial para a homeostase e a diferenciação funcional das células prostáticas.

Outra implicação significativa do colágeno tipo IV está relacionada ao processo de angiogênese, como descreve Balbino, Pereira e Curi (2005). Isso é relevante para o crescimento, o reparo e a regeneração do tecido prostático, mantendo assim a função e a vitalidade celular no órgão.

Ma et al. (2020), mostraram que existe uma perda da expressão do colágeno do tipo IV em tecidos prostáticos neoplásicos, quando comparados a tecidos saudáveis, sugerindo que esse tipo de colágeno pode ser um fator de proteção contra invasão e migração de células tumorais prostáticas. Todavia, os autores não quantificaram o conteúdo do colágeno tecidual do tipo IV com um método objetivo de mensuração.

1.6 Laminina

Rasmussen e Karsdal (2016) descrevem que a laminina é uma sofisticada e polimórfica família de proteínas da matriz extracelular, figura como uma das mais proeminentes e complexas moléculas presentes no microambiente tecidual. Caracterizada por sua intrincada arquitetura tridimensional, a laminina desempenha um papel multifacetado e crucial na organização estrutural, coesão celular e comunicação intrínseca entre células e a matriz extracelular circundante. Ela é composta por três subunidades distintas – α , β , γ – que convergem harmoniosamente para formar um padrão cruzado único, a laminina se destaca como a “cola” bioquímica que sustenta a adesão celular a estruturas adjacentes, conferindo assim a estabilidade mecânica aos tecidos (MINER E YURCHENCO, 2004).

Segundo Souza et al. (2007) a laminina, na próstata, é um elemento crucial para a organização estrutural e homeostase tecidual, promovendo adesão e alinhamento das células epiteliais ao microambiente circundante, além do auxílio na regulação angiogênese, uma vez que sua presença influencia a organização e a sinalização com vasos sanguíneos, assegurando o suprimento adequado de nutrientes e oxigênio para as células prostáticas.

Entretanto, no contexto do CaP, alterações na expressão e organização da laminina, como citado por Brum, Spritzer e Brentani (2005), podem impactar o microambiente tumoral, ocasionando a progressão do CaP ao afetar a migração e invasão celular, promovendo a formação de metástases e influenciando a resistência a terapias.

Portanto, a laminina desempenha um papel multifacetado na próstata e no CaP, atuando como um componente estrutural essencial e regulador das interações celulares. Seu entendimento detalhado é de fundamental importância para avanços na compreensão da biologia da próstata e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para o CaP.

1.7. Justificativa e motivação do trabalho

Apesar do CaP ser uma neoplasia de alta incidência e mortalidade mundial, sua taxa de diagnóstico tardio e consequente mortalidade vem caindo nos últimos anos, devido aos novos métodos de rastreamento, diagnósticos precoces, novas terapias, além da disseminação da informação da doença à população, assim como a importância de exame da próstata precoce. O entendimento do processo de carcinogênese do CaP vem melhorando nos últimos anos, contribuindo assim, com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que interferem no prognóstico, sobrevida global e sobrevida livre de doença.

O intuito do diagnóstico precoce, o estadiamento, o tratamento e o seguimento rigoroso nos pacientes com CaP é, além de promover a cura, tentar evitar um desfecho desfavorável, que é a doença metastática, o que geralmente leva o paciente a um tratamento paliativo e não curativo.

Alguns pontos da carcinogênese já estão bem estabelecidos na literatura, como a atividade proliferativa celular, que ocorre na vigência de um desequilíbrio entre proteínas que regulam essa atividade, promovendo um descontrolado crescimento celular. Outro ponto é a angiogênese, pois somente o distúrbio proliferativo não é capaz de explicar todas as etapas do desenvolvimento tumoral, uma vez que, para o crescimento e estabelecimento das metástases é necessário um suprimento sanguíneo adequado. Sempre há dúvida do porquê alguns tumores conseguem desenvolver um potencial de agressividade maior que o outros? Embora a maioria dos estudos mostre alteração na expressão das moléculas de adesão celular e da matriz extracelular, correlacionando as mesmas com o grau de Gleason, nenhum estudo mensurou, de forma objetiva, o conteúdo tecidual dessas moléculas.

A melhor compreensão do papel representado por essas proteínas, pode trazer novas alternativas terapêuticas, como o desenvolvimento de medicações que atuem na matriz extracelular, impedindo a propagação de células tumorais e possivelmente o desenvolvimento de metástases.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o conteúdo e a expressão tecidual de colágeno tipo I, IV e laminina na matriz extracelular em portadores de adenocarcinoma da próstata.

2.2 Objetivos específicos

Correlacionar o conteúdo de colágeno tipo I, IV e laminina, presentes na MEC de portadores de adenocarcinoma da próstata com a estratificação da classificação do Grau de Gleason;

Correlacionar o conteúdo de colágeno tipo I, IV e laminina, presentes na MEC de portadores de adenocarcinoma da próstata com características clínicas do paciente como idade, doenças associadas e hábitos de vida, como o etilismo e tabagismo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

O projeto de pesquisa relacionado a esta Dissertação de Mestrado foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (CEP-USF), que segue as Propostas de Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (Conselho das Organizações Internacionais das Ciências Médicas – CIOMS/OMS, Genebra, 1982 e 1983). O protocolo foi registrado com o CAAE 48448921.1.0000.5514, e aprovado segundo parecer consubstanciado número 4.823.523 emitido em 02 de julho de 2021. (Anexo I)

3.2 Desenho do estudo

Estudo descritivo, transversal e retrospectivo, com pacientes operados no Serviço de Urologia do Hospital Universitário São Francisco de Assis (HUSF), por CaP. Foi realizada uma revisão de dados clínicos e laboratoriais dos prontuários, assim como o exame histopatológico da peça cirúrgica, produto de prostatovesicuclectomia radical em oncologia.

Foram revisadas as lâminas cirúrgicas e identificada por técnica imuno-histoquímica, a expressão de colágeno I, IV e laminina em cada doente, comparando o resultado com dados clínicos e laboratoriais.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com CaP submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa, no serviço de Urologia do HUSF, entre 01/01/2015 e 31/12/2020;
- Acompanhamento clínico pós-operatório de ao menos dois anos, a partir da cirurgia realizada;
- Pacientes acima de 45 anos;

3.2.2 Critérios de exclusão

- Portadores de outras neoplasias malignas de próstata que não adenocarcinoma;
- Doentes que apresentavam, no diagnóstico, neoplasia de outro órgão associada;

- Doentes com CaP que já apresentavam metástases no diagnóstico;
- Pacientes cujos dados não estavam completos no prontuário;
- Pacientes submetidos à radioterapia pélvica prévia;

3.2.3 Variáveis analisadas

- Variáveis quantitativas: idade, PSA diagnóstico, expressão de colágeno do tipo I, expressão de colágeno do tipo IV e expressão de laminina;
- Variáveis qualitativas: diabetes mellitus (DM), etilismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo e grau de Gleason.

3.3 Casuística

No Serviço de Urologia do HUSF, foram operados 115 pacientes com diagnóstico de Câncer de Próstata. Os critérios de inclusão não foram preenchidos em 34 casos, e os critérios de exclusão foram aplicados a 40. Dessa forma, foram incluídos em nosso estudo 41 pacientes (Figura 6).

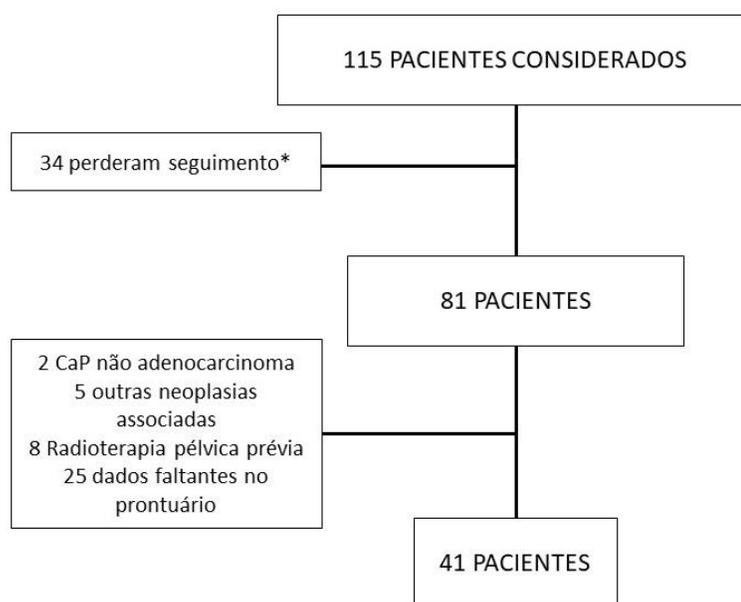


FIGURA 6. Fluxograma dos pacientes incluídos e excluídos no presente estudo. Legenda: * Pacientes que perderam seguimento ambulatorial nos primeiros dois anos, seja por mudança de cidade ou falta nas consultas.

3.4 Coleta de dados

Neste estudo retrospectivo, foram coletados dados pré e pós-operatórios. A coleta foi feita por revisão de prontuários físicos, após autorização prévia do HUSF (ANEXO II) e aprovação do CEP-USF (ANEXO I).

3.5 Blocos de parafina

Para a confecção das lâminas histológicas destinadas ao estudo imuno-histoquímico para a pesquisa das proteínas colágeno tipo I, IV e laminina, utilizou-se duplicatas dos blocos de parafina de cada um dos doentes selecionados para o presente estudo. Essas duplicatas foram cedidas pelo Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica (CEDAP) ao Laboratório de Investigação Médica da Universidade São Francisco (LIM-USF).

Os blocos cedidos e que se encontram sob a guarda do Professor Carlos Augusto Real Martinez, responsável pelo LIM-USF, foram doados ao pesquisador, após a autorização prévia do CEP-USF. No ANEXO III, encontra-se o Termo de Doação das amostras assinada pela Profa. Helenice Piovesan, patologista responsável pelo CEDAP e a carta de autorização para uso, assinada pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez (Anexo IV).

Cada bloco de parafina, que incluía tanto tecido neoplásico quanto tecido saudável, passou pelo processo de microtomia. Foram feitos cinco cortes, cada um com uma espessura de 5µm, para a elaboração de lâminas destinadas aos estudos histoquímicos e imuno-histoquímicos. Após a etapa de processamento histológico, os cortes foram colocados em lâminas de vidro com extremidades fosqueadas, as quais foram previamente marcadas e identificadas, sendo atribuído um número exclusivo para cada paciente.

3.6 Técnica de coloração

Para realizar a técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (HE), os cortes histológicos foram inicialmente colocados em lâminas de vidro e expostos a uma temperatura de 60°C por 12 horas. Após esta etapa, visando remover a parafina presente nas lâminas, os cortes foram imersos em dois banhos de xilol, cada um com duração de 10 minutos. Após a retirada das lâminas do banho em xilol, estas foram submetidas a três banhos de álcool etílico a 70%, cada um com duração de cinco minutos. Concluída a hidratação, as lâminas foram imersas no corante

Hematoxilina de Harris por um minuto, seguido por uma lavagem em água corrente para remover o excesso de corante.

Após essa etapa, as lâminas foram expostas ao corante Eosina por dois minutos e, em seguida, novamente lavadas com água corrente. Para a desidratação, foram utilizados três banhos de álcool absoluto, um em xilol/álcool e três em xilol puro. Concluída a técnica de coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas e resina, possibilitando o diagnóstico de adenocarcinoma de próstata, assim como a análise de todas as variáveis histopatológicas consideradas para o presente estudo.

3.7 Técnica de imuno-histoquímica

Depois de preparar as lâminas para o estudo imuno-histoquímico, elas foram imersas em uma solução de Trilogy (Trilogy, Cell Marque, Cod- 920P-04, Lote 1129101B) com uma diluição de 1:100 em três ocasiões. A primeira imersão ocorreu em banho-maria a 95°C por 45 minutos, a segunda na mesma temperatura por 10 minutos, e a terceira à temperatura ambiente por 30 minutos. Concluída esta etapa, as lâminas foram lavadas com dois banhos de água destilada, cada um com duração de dois minutos, além de dois outros banhos com tampão de fosfato (PBS), também com duração de dois minutos cada. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado incubando as lâminas em uma solução contendo peróxido de hidrogênio 10 V por dez minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas com dois banhos de água destilada e dois banhos com tampão de PBS, cada um com duração de dois minutos. Após a disposição dos tecidos a serem estudados, realizou-se o bloqueio de proteínas indesejáveis aplicando leite (Molico, Nestlé do Brasil, Três Corações, MG, Brasil) sobre as lâminas por um período de 30 minutos.

Para pesquisa do colágeno I foi utilizado o anticorpo primário anti-colágeno-I (SAB, Referência: SAB4500362, São Paulo, Brasil), na diluição de 1:100. Para identificar o Colágeno IV foi adotado o anticorpo primário anti-colágeno-IV (SAB, Referência: SAB4300738, São Paulo, Brasil), na diluição de 1:100. Para identificar a laminina foi adotado o anticorpo primário anti-laminina (SAB, Referência: ZRB1271, São Paulo, Brasil), na diluição de 1:100.

Após diluir conforme as recomendações para cada anticorpo primário, 100µl do anticorpo primário específico foram aplicados sobre os cortes histológicos em uma câmara úmida, sendo expostos por 1 hora à temperatura ambiente. Após a exposição ao anticorpo primário, as lâminas

foram submetidas a lavagens com água destilada, dois banhos de dois minutos cada, seguidos por dois banhos com solução tampão de PBS, cada um com a mesma duração.

Em seguida, procedeu-se à incubação com o sistema de avidina-biotina (anticorpos secundários) do Kit LSAB+System-HRP (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil; Referência K0690, Lote 10068233), com exposição das lâminas por um período de 35 minutos para cada reagente. Após a conclusão dessa fase, os cortes foram novamente lavados com dois banhos de solução tampão de PBS e revelados utilizando o Kit Líquid DAB + Substrate (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil; Referência K3468, Lote 10066912) na diluição de uma gota de cromógeno em 1 mL de solução tampão. Adicionalmente, foram adicionados 100µl do cromógeno sobre os cortes, com um tempo de incubação de três a cinco minutos à temperatura ambiente.

3.8 Medida do conteúdo tecidual de colágeno I, colágeno IV e laminina

A imunocoloração foi considerada positiva quando apresentava uma coloração acastanhada, com intensidade variada e distribuição homogênea no estroma tecidual da amostra de tecido prostático. A análise das lâminas foi realizada utilizando um microscópio óptico (Eclipse DS50® - Nikon Inc., Japan) com uma ampliação de imagem de 200x. Para confirmar o diagnóstico de adenocarcinoma de próstata e identificar todas as variáveis histopatológicas consideradas, todas as lâminas foram submetidas a uma revisão por um único patologista experiente em neoplasias prostáticas. Este profissional não tinha conhecimento do objetivo principal do trabalho nem da identificação do paciente estudado.

Foi quantificada a expressão de colágeno I, colágeno IV e laminina, no estroma celular de todas as lâminas, por três examinadores independentes, que também desconheciam os objetivos finais do presente estudo. Estes examinadores marcavam as áreas do estroma com colágeno e o software fazia a análise quantificando a expressão dos reagentes. Utilizamos a média das medidas dos três observadores como valor final. Após a escolha de um campo histológico de forma aleatória, cada avaliador examinou individualmente, mas ao mesmo tempo, três campos histológicos distintos em uma única lâmina, atribuindo pontuações à intensidade da coloração. Dessa maneira, o valor final calculado para o tecido neoplásico foi derivado da soma de nove leituras realizadas pelo programa, provenientes dos três observadores distintos. Apesar de avaliarem um mesmo campo histológico simultaneamente, os observadores não tinham conhecimento dos resultados de pontuação obtidos pelos outros dois.

3.9 Análise Estatística

Para a análise estatística, foram empregados os softwares SPSS V20, Minitab 16 e Excel Office 2010. Na descrição dos fatores quantitativos, os resultados foram apresentados por meio da média acompanhada do respectivo desvio padrão. Já os fatores qualitativos foram descritos em termos de frequência relativa, expressa em percentuais. A normalidade das variáveis quantitativas selecionadas foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Após analisar todas as lâminas de todos os pacientes, observou-se que havia uma distribuição normal, o que permitiu a aplicação de testes estatísticos paramétricos para a comparação pareada entre tecidos neoplásicos com Gleason 6 em comparação com os demais.

O Teste Z de Duas Proporções foi empregado para caracterizar a distribuição da frequência relativa (percentuais ou prevalências) dos fatores qualitativos. No que diz respeito às somas de Gleason, tratadas como um escore, optou-se por utilizar a Correlação de Pearson para avaliar o grau de correlação com colágeno e laminina. Na interpretação dos coeficientes de correlação (r), adotou-se a seguinte escala: $|0,10|$ a $|0,40|$ para correlação fraca; $|0,40|$ a $|0,60|$ para correlação moderada; e $|0,60|$ a $|1,00|$ para correlação forte.

Por fim, para análise de variância do conteúdo tecidual de colágeno I, colágeno IV e laminina nos diferentes graus de diferenciação tumoral, foi aplicado o teste de ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis Clínicas

A média de idade da população foi de $63,5 \pm 1,8$ anos, com mediana de 65 anos (Tabela 2). O PSA médio no diagnóstico foi de $10,41 \pm 2,60$ ng/ml. A média da expressão de colágeno I, IV e laminina foram, respectivamente: $7,16 \pm 1,03$ Pixels/Campo; $3,44 \pm 0,61$ Pixels/Campo e $5,19 \pm 0,79$ Pixels/Campo (Figura 7).

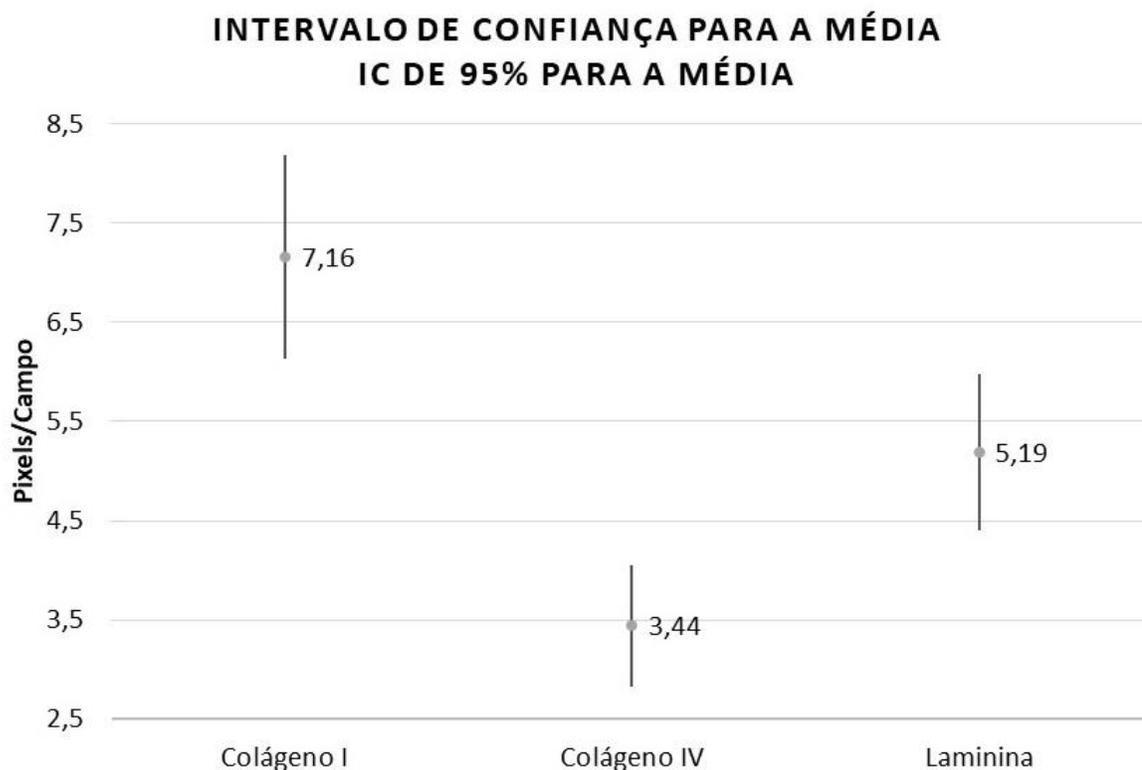


FIGURA 7. Intervalo de Confiança para a média. Essa figura mostra os intervalos de confiança para a média de expressão de colágenos I e IV e laminina (expresso em Pixels/Campo).

TABELA 2. Análise descritiva completa dos fatores quantitativos

	Média	Mediana	Desvio Padrão	CV¹	IC²
Idade (anos)	63,5	65	6,0	9%	1,8
PSA Diagnóstico (ng/ml)	10,41	8,26	8,48	82%	2,60
Colágeno I (pixel/campos)	7,16	6,90	3,37	47%	1,03
Colágeno IV (pixel/campos)	3,44	2,81	1,80	52%	0,61
Laminina (pixel/campos)	5,19	5,14	2,57	49%	0,79

Legenda: 1. CV: Coeficiente de variação; 2. IC: Intervalo de confiança. Teste de Kolmogorov-Smirnov. A Tabela resume as variáveis quantitativas do trabalho.

Com relação aos fatores de risco analisados, encontrou-se a prevalência de tabagistas em 41,5% e etilistas em 7,3% dos pacientes (Tabela 3). Já às morbidades relacionadas, 14,6%

dos doentes possuíam DM (Diabetes Mellitus) e 43,9% HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica). Uma porção expressiva da população estudada, possuía um Gleason 6 no diagnóstico (46,3%), sendo o Gleason 8, o menos prevalente (4,9%).

TABELA 3. Distribuição dos fatores qualitativos

		N¹	%²	p-valor
DM	Não	35	85,4	<0,001*
	Sim	6	14,6	
Etilismo	Não	38	92,7	<0,001*
	Sim	3	7,3	
HAS³	Não	23	56,1	0,269
	Sim	18	43,9	
Tabagismo	Não	24	58,5	0,122
	Sim	17	41,5	
GLEASON Parcial	3+3	19	46,3	Referência
	3+4	5	12,2	<0,001*
	3+5	1	2,4	<0,001*
	4+3	8	19,5	0,010*
	4+4	1	2,4	<0,001*
	4+5	5	12,2	<0,001*
	5+4	2	4,9	<0,001*
GLEASON Total	Seis	19	46,3	Referência
	Sete	13	31,7	0,174
	Oito	2	4,9	<0,001*
	Nove	7	17,1	0,004*

Legenda: 1. N= Número de doentes; 2. % = Porcentagem; 3. HAS = Hipertensão arterial sistêmica; * = amostra com significância estatística, onde o p valor é < 0,05. Teste Z de Duas Proporções. A tabela resume as variáveis qualitativas do trabalho. Trata-se apenas de uma análise inferencial da amostragem.

Para as variáveis com apenas dois níveis de resposta, o valor de p reflete diretamente a comparação entre eles. No caso das variáveis com três ou mais níveis de resposta, os valores de p na última coluna indicam as comparações de cada nível em relação ao mais prevalente, que é tomado como referência.

4.2 Correlação entre Gleason total, idade e PSA com colágeno e laminina

Considerando as somas de Gleason como sendo um escore e utilizou-se a Correlação de Pearson para medir o grau de correlação do gleason com colágeno e laminina (Tabela 4).

TABELA 4. Correlação do Gleason total, idade e PSA com colágeno e laminina

		GLEASON total	Idade	PSA¹
COLÁGENO I	Corr (r)	-0,521	0,018	-0,144
	P-valor	<0,001*	0,909	0,370
COLÁGENO IV	Corr (r) ²	-0,494	0,309	-0,290
	P-valor	0,003*	0,076	0,096
LAMININA	Corr (r)	-0,566	0,135	-0,378
	P-valor	<0,001*	0,399	0,015*

1. PSA = Antígeno prostático específico; 2. r = Coeficiente de correlação. Teste de Correlação de Pearson. * = Valores com significância estatística, onde o p valor < 0,05. Na Tabela, quando obtivemos resultados negativos, descrevemos como relações inversamente proporcionais e vice-versa.

A Idade não tem relação estatística nem com os valores dos subtipos de colágeno nem com laminina. O PSA, por sua vez, mostrou ter correlação somente com laminina, mas o r = -0,378 (p-valor = 0,015), mesmo significativo é um valor baixo, sendo classificado como fraco.

Já o grau de Gleason total apresentou correlação tanto com os subtipos de colágeno quanto com a laminina, sendo a maior correlação ocorrida com laminina de r = -0,566 (p-valor <0,001). As correlações foram todas negativas o que mostra que quanto maior o valor do colágeno/laminina, menor será o valor do Gleason total e vice-versa. Todas as três correlações com Gleason total podem ser classificadas como moderadas.

4.3 Comparação entre os Grupos de Gleason para colágeno e laminina

A seguir, ainda na análise bivariada de Gleason com colágeno e laminina, comparou-se os grupos de Gleason com a média de expressão de colágeno I, IV e laminina. Nessa análise desconsideramos o Gleason 8, devido a apenas dois pacientes na amostra. Vale ressaltar que o Gleason 7 foi subdividido em Sete A (4 + 3) e Sete B (3 + 4). Utilizando sempre o teste de ANOVA (Tabelas 5 e 6).

TABELA 5. Compara grupos (4 grupos) de Gleason para colágeno e laminina

	Gleason	Média P/C ¹	Mediana P/C ¹	DP²	N³	IC⁴	P-valor
COLÁGENO I	Seis	8,48	9,03	2,74	19	1,23	0,001*
	Sete A	7,07	6,92	3,12	8	2,16	
	Sete B	8,51	8,30	3,47	5	3,04	
	Nove	3,07	2,82	1,81	7	1,34	
COLÁGENO IV	Seis	4,13	3,92	2,00	18	0,93	0,008*
	Sete A	2,21	2,40	0,43	6	0,34	
	Sete B	4,68	4,15	1,03	3	1,16	
	Nove	1,96	1,93	0,32	6	0,26	
LAMININA	Seis	6,60	6,34	2,14	19	0,96	<0,001*
	Sete A	3,06	3,30	1,32	8	0,91	
	Sete B	6,46	5,78	2,66	5	2,33	
	Nove	3,47	2,34	2,14	7	1,59	

1. Pixels/Campo; 2. DP: desvio padrão; 3. N: Número de doentes; 4. IC: Intervalo de Confiança; 6; *: Resultados com significância estatística, onde o $p < 0,05$. Teste de Anova

TABELA 6. P-valor do post-hoc para 4 grupos de Gleason

Grau de GLEASON		Seis	Sete A	Sete B
COLÁGENO I (pixel/campo)	Sete A	0,630		
	Sete B	1,000	0,801	
	Nove	0,001*	0,042*	0,010*
COLÁGENO IV (pixel/campo)	Sete A	0,068		
	Sete B	0,942	0,142	
	Nove	0,031*	0,992	0,090
LAMININA (pixel/campo)	Sete A	0,001*		
	Sete B	0,999	0,033*	
	Nove	0,009*	0,981	0,084

Teste de Anova. * = Valores com significância estatística, onde o $p < 0,05$.

No trabalho, encontrou-se diferença média estatisticamente significativa tanto do colágeno quanto da laminina. Utilizando a Comparação Múltipla de Tukey (post-hoc) para comparar os grupos de Gleason aos pares e assim determinar precisamente entre quais deles ocorre a diferença (Figura 8).

Quando comparamos a expressão de colágeno I, na nossa amostra. Os pacientes do grupo Gleason 6 obtiveram um valor médio de expressão de $8,48 \pm 1,23$ pixels/campo. Quando comparamos com o grupo Gleason 9 esse valor médio foi de $3,07 \pm 1,34$ pixels/campo (p -valor = 0,001). Analisando a Tabela 6, percebe-se que ocorreu uma diferença entre esses dois grupos, com p -valor de 0,001. Quando comparamos tanto o Grupo 7A (Gleason 4+3) e o 7b (Gleason 3+4) com o grupo de Gleason 9, também houve significância estatística (p -valor de 0,042 e 0,010, respectivamente).

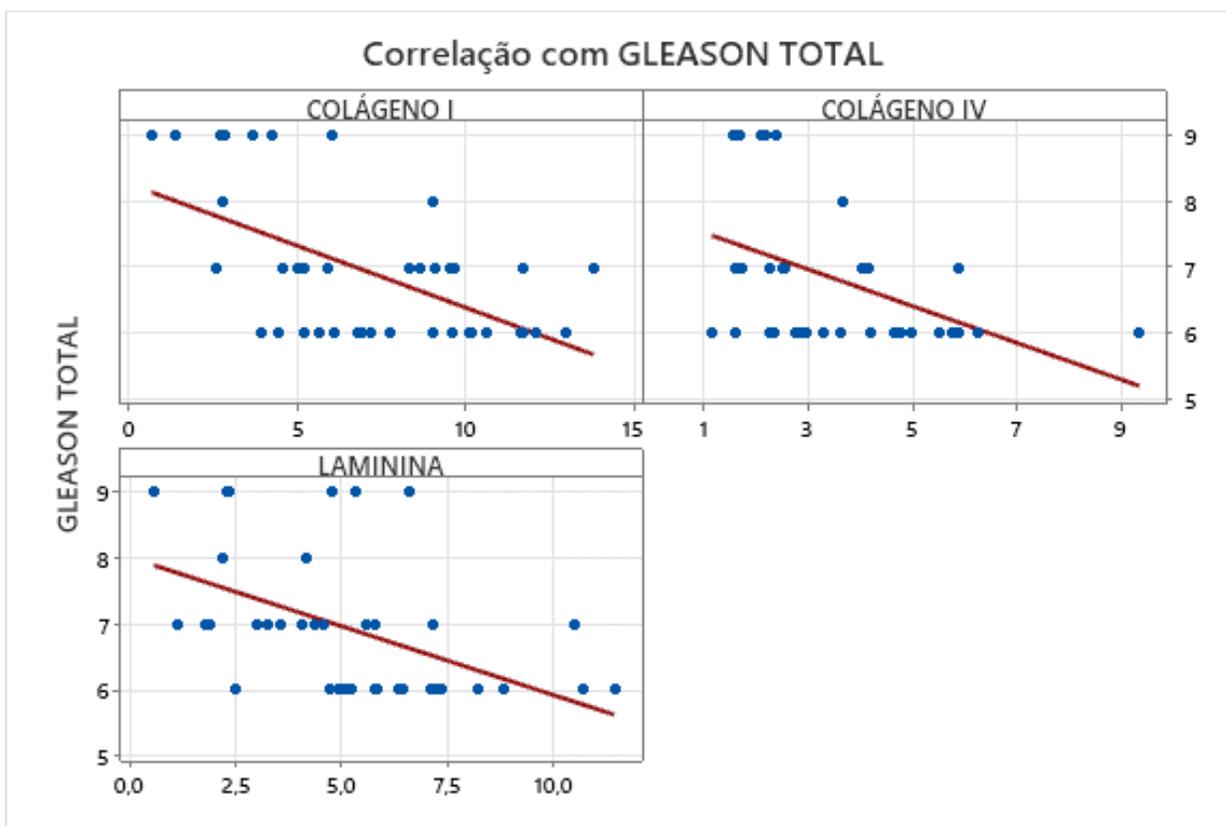


FIGURA 8: Correlação entre o conteúdo de colágeno I, IV e laminina com Gleason

No colágeno IV, não houve significância estatística ao compararmos o grupo 6 com o 7 (independe se Gleason 3+4 ou 4+3), tão pouco o grupo 7 com o grupo de Gleason 9. A única correlação com significância estatística se deu quando comparou-se o grupo 6 com o grupo 9, com um p -valor de 0,031.

Quanto a expressão de laminina entre os grupos, houve uma diferença significativa quando comparado o grupo 6 com o 7A (Gleason 4+3) com p valor de 0,001, Grupo 6 com o 9 (p -valor 0,009) e 7A com 7B (p -valor 0,033).

No trabalho, também agrupamos os pacientes de Gleason 7, somando os Gleason 3+4 com os 4+3 e obtivemos o resultado conforme as Tabelas 7 e 8.

TABELA 7. Compara grupos (3 grupos) de Gleason para colágeno e laminina

	Gleason	Média P/C¹	Mediana P/C¹	DP²	N³	IC⁴	P-valor
COLÁGENO I	Seis	8,48	9,03	2,74	19	1,23	
	Sete	7,62	8,30	3,20	13	1,74	<0,001*
	Nove	3,07	2,82	1,81	7	1,34	
COLÁGENO IV	Seis	4,13	3,92	2,00	18	0,93	
	Sete	3,04	2,56	1,38	9	0,90	0,026*
	Nove	1,96	1,93	0,32	6	0,26	
LAMININA	Seis	6,60	6,34	2,14	19	0,96	
	Sete	4,36	4,07	2,52	13	1,37	0,004*
	Nove	3,47	2,34	2,14	7	1,59	

1. Pixels/Campo; 2. DP: desvio padrão; 3. N: Número de doentes; 4. IC: Intervalo de Confiança; 6; *: Resultados com significância estatística, onde o $p < 0,05$. Teste de Anova

Na expressão de laminina temos que a média foi de 6,60 Pixels/Campo para Gleason 6 contra 4,36 Pixels/Campo em Gleason 7 e média de 3,47 Pixels/Campo para Gleason 9 (p-valor = 0,004 da Tabela 9). Analisando a Tabela 8 de p-valores, nós concluímos que em laminina a diferença ocorreu entre o Gleason 6 e os outros dois grupos de Gleason, com p-valor de 0,026 (para Gleason 7) e 0,010 (para Gleason 9).

TABELA 8. P-valor do post-hoc para 3 grupos de Gleason

	GLEASON	Seis P/C ¹	Sete P/C ¹
COLÁGENO I	Seite	0,671	
	Nove	<0,001*	0,004*
COLÁGENO IV	Seite	0,261	
	Nove	0,026*	0,448
LAMININA	Seite	0,026*	
	Nove	0,010*	0,679

1. P/C: Pixels/Campo; *: Resultados com significância estatística, onde o $p < 0,05$. Teste de Anova

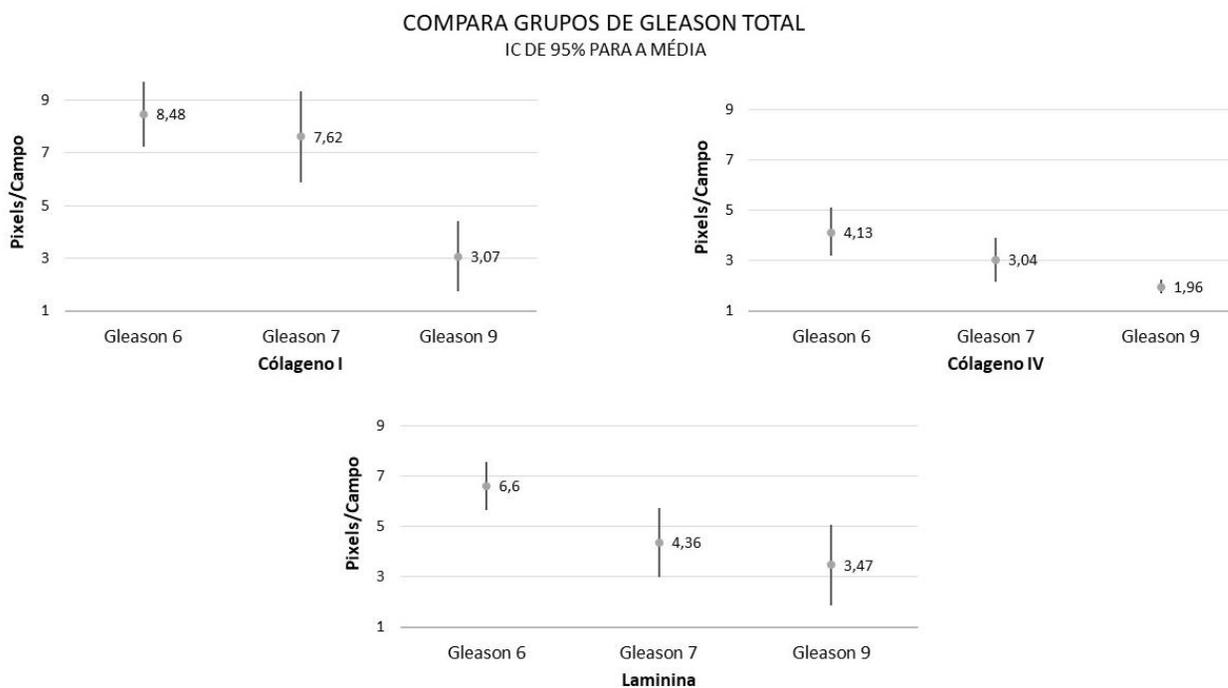


FIGURA 9. Compara grupos de Gleason com expressão de colágeno e laminina. A expressão de colágenos e laminina é dada em Pixels/Campo.

4.4 Comparação de fatores demográficos para colágenos e laminina

Por fim, comparamos os fatores demográficos de HAS, DM, tabagismo e etilismo, para a média dos colágenos e da laminina utilizando o teste de ANOVA (Tabelas 9,10 e 11). Nota-se que existe significância estatística na comparação de etilismo para colágeno I (Tabela 9), onde média de quem não é etilista ficou em 6,78 Pixels/Campo contra 11,94 Pixels/Campo de média para quem é sim etilista (p-valor = 0,009), dados também expressos na Figura 10.

TABELA 9. Comparação de fatores demográficos para colágeno I

		Média P/C ¹	Mediana P/C ¹	DP ²	CV ³	Min ⁴	Max ⁵	N ⁶	IC ⁷	P-valor
HAS⁷	Não	6,80	6,80	3,29	48%	0,66	13,81	23	1,35	0,446
	Sim	7,62	7,97	3,50	46%	1,34	12,98	18	1,62	
DM⁸	Não	6,85	6,80	3,39	49%	0,66	13,81	35	1,12	0,159
	Sim	8,96	9,35	2,84	32%	5,20	12,13	6	2,27	
TABAGISMO	Não	6,56	5,97	2,87	44%	0,66	11,72	24	1,15	0,183
	Sim	8,00	9,03	3,90	49%	1,34	13,81	17	1,85	
ETILISMO	Não	6,78	6,46	3,15	46%	0,66	12,13	38	1,00	0,009*
	Sim	11,94	12,98	2,55	21%	9,03	13,81	3	2,89	

1. P/C: Pixels/Campo; 2. DP: Desvio Padrão; 3. CV: Coeficiente de variação; 4. Min: Valor mínimo; 5. Max: Valor máximo; 6. N: Número de doentes; 7. IC: Intervalo de Confiança; 8. HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; 9. DM: Diabetes Mellitus.; * : Resultados com significância estatística, onde p-valor < 0,05. Teste de Anova

Quando foi comparado a expressão de colágeno IV (Tabela 10 e Figura 11) com as comorbidades e os fatores de risco, não houve significância estatística nas correlações.

Tabela 10. Comparação de fatores demográficos para colágeno IV

		Média	Mediana							P-valor
		P/C ¹	P/C ¹	DP ²	CV ³	Min ⁴	Max ⁵	N ⁶	IC ⁷	
HAS⁷	Não	2,94	2,35	1,45	49%	1,17	5,87	17	0,69	0,105
	Sim	3,95	3,63	2,02	51%	1,63	9,35	17	0,96	
DM⁸	Não	3,21	2,76	1,45	45%	1,17	5,88	29	0,53	0,066
	Sim	4,81	4,20	3,08	64%	1,71	9,35	5	2,70	
TABAGISMO	Não	3,25	2,81	1,53	47%	1,17	5,88	18	0,71	0,504
	Sim	3,67	2,78	2,10	57%	1,58	9,35	16	1,03	
ETILISMO	Não	3,54	2,93	1,82	51%	1,17	9,35	32	0,63	0,246
	Sim	1,99	1,99	0,51	26%	1,63	2,35	2	0,71	

1. P/C: Pixels/Campo; 2. DP: Desvio Padrão; 3. CV: Coeficiente de variação; 4. Min: Valor mínimo; 5. Max: Valor máximo; 6. N: Número de doentes; 7. IC: Intervalo de Confiança; 8. HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; 9. DM: Diabetes Mellitus.; * : Resultados com significância estatística, onde p-valor < 0,05. Teste de Anova

Das variáveis testadas na Tabela 11, quando comparado a laminina, nenhuma obteve significância estatística nesse estudo, também expresso na Figura 12

TABELA 11. Comparação de fatores demográficos para laminina

		Média		DP ²	CV ³	Min ⁴	Max ⁵	N ⁶	IC ⁷	P-valor
		P/C ¹	Mediana P/C ¹							
HAS⁷	Não	5,28	5,15	2,55	48%	1,13	10,72	23	1,04	0,795
	Sim	5,07	5,06	2,66	52%	0,57	11,45	18	1,23	
DM⁸	Não	5,25	5,15	2,64	50%	0,57	11,45	35	0,87	0,705
	Sim	4,82	5,06	2,29	47%	1,13	8,22	6	1,83	
TABAGISMO	Não	5,52	5,30	2,66	48%	1,13	11,45	24	1,06	0,338
	Sim	4,73	4,73	2,43	52%	0,57	10,72	17	1,16	
ETILISMO	Não	5,13	4,95	2,66	52%	0,57	11,45	38	0,84	0,588
	Sim	5,97	5,80	0,32	5%	5,78	6,34	3	0,36	

1. P/C: Pixels/Campo; 2. DP: Desvio Padrão; 3. CV: Coeficiente de variação; 4. Min: Valor mínimo; 5. Max: Valor máximo; 6. N: Número de doentes; 7. IC: Intervalo de Confiança; 8. HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; 9. DM: Diabetes Mellitus.; * : Resultados com significância estatística, onde p-valor < 0,05. Teste de Anova

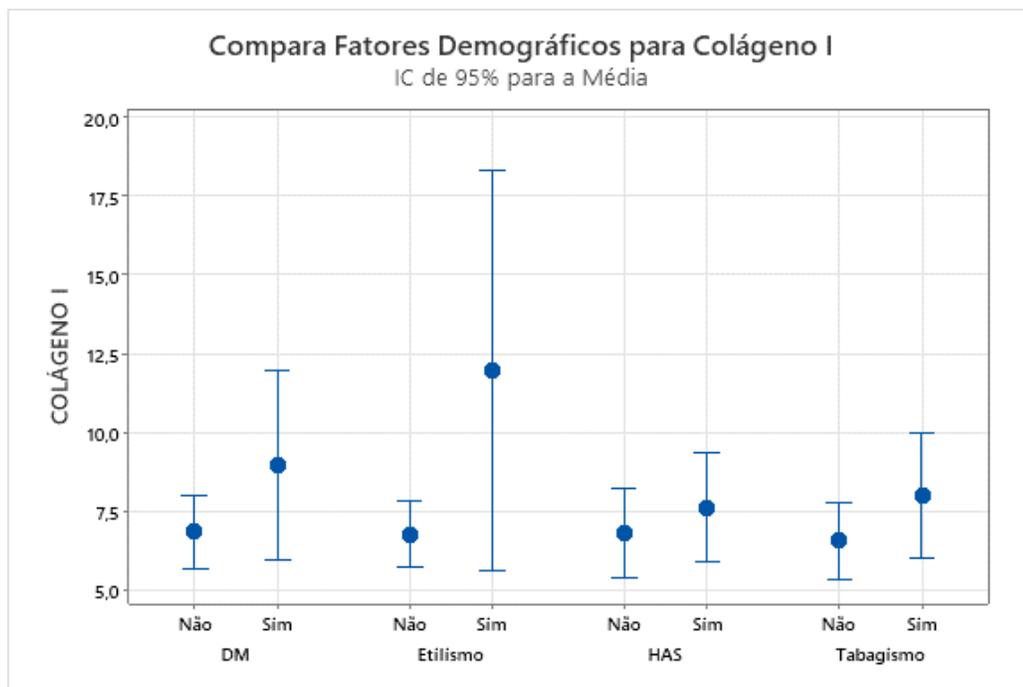


FIGURA 10. Compara fatores demográficos para colágeno I

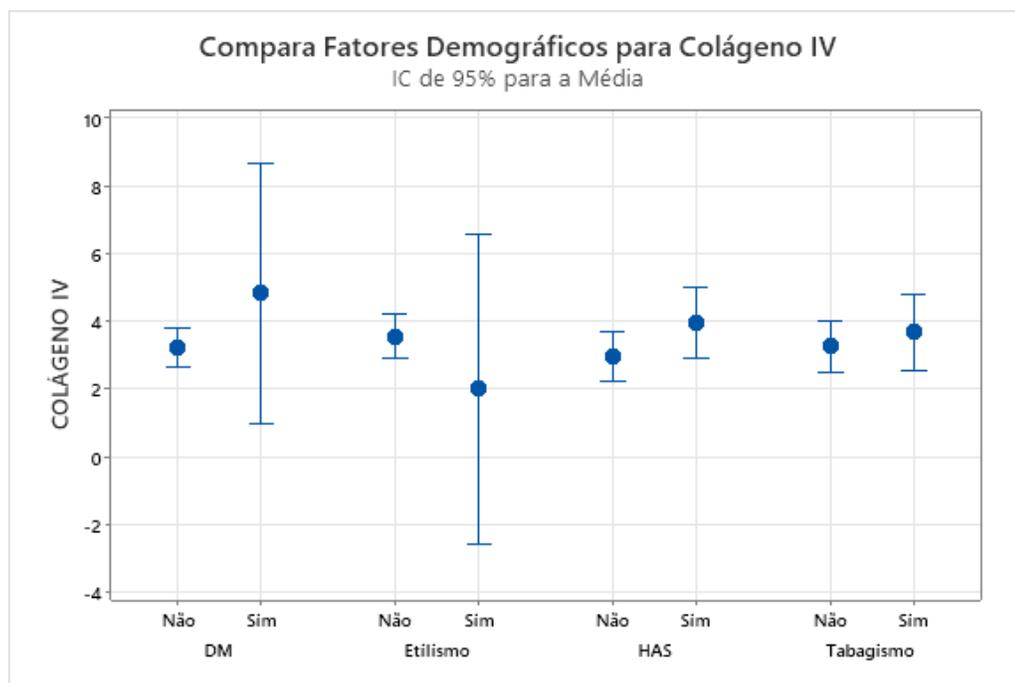


FIGURA 11. Compara fatores demográficos para colágeno IV

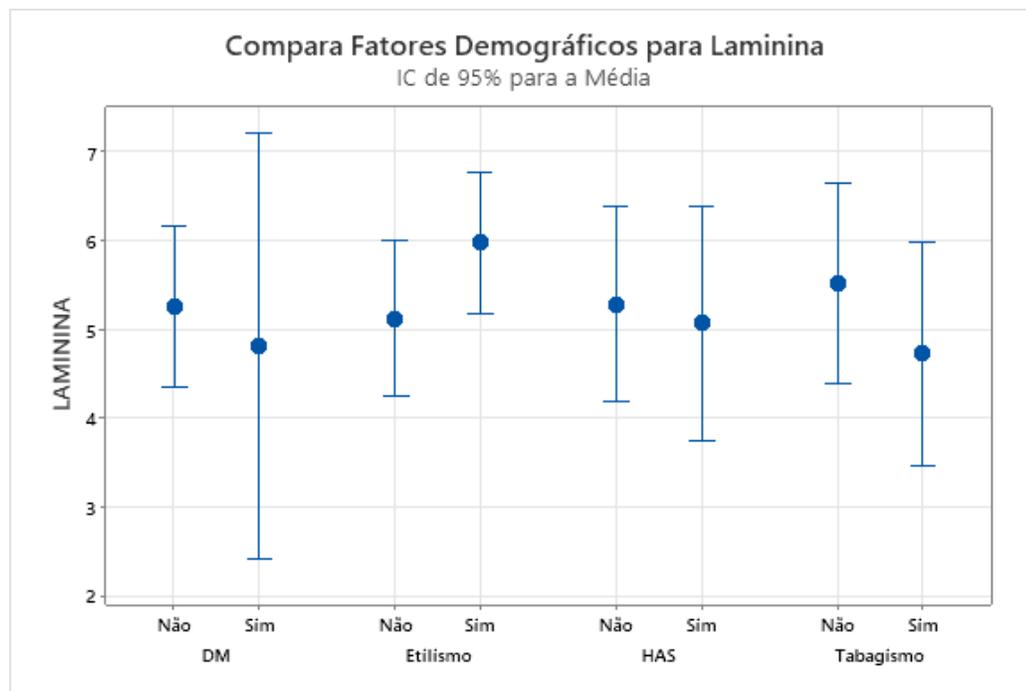


FIGURA 12. Compara fatores demográficos para laminina

4.5 Variáveis Histopatológicas

Nas Figuras 13, 14, 15 e 16, apresentam as características histológicas de paciente com neoplasia de próstata.

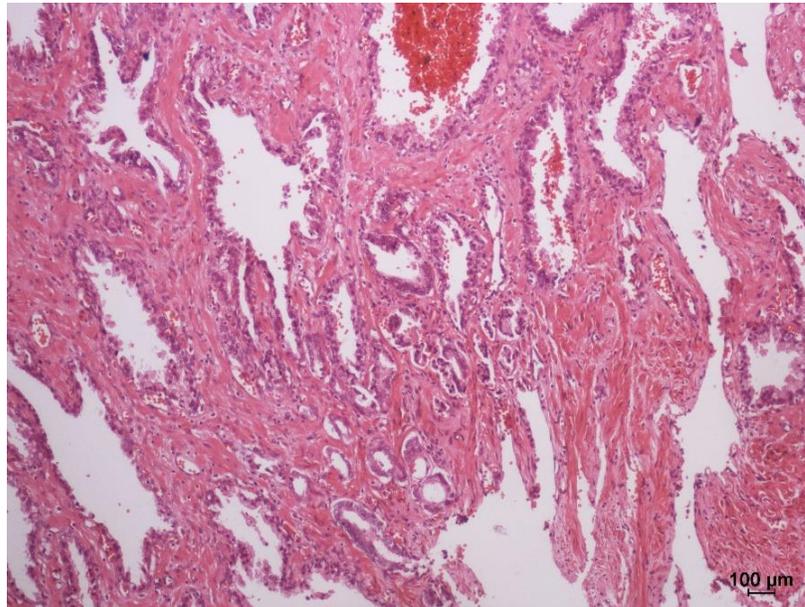


FIGURA 13. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 7. (100x). Paciente possuía um escore de Gleason 3+3. Fonte: Acervo dos autores.

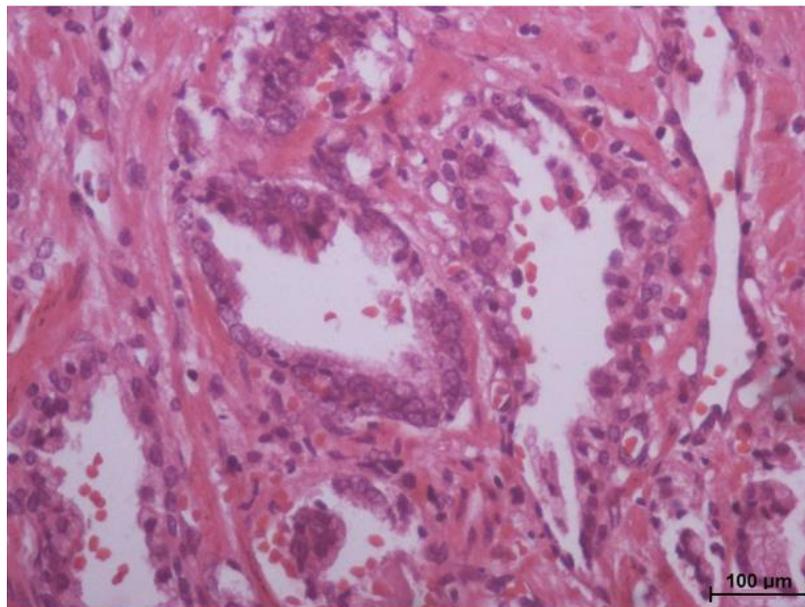


FIGURA 14. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 7. (400x). Podemos observar células com variações de tamanho e forma, glândulas menores, homogêneas, arestadas ou longas, individualizadas e dispersas de maneira desordenada pelo estroma. Elas podem formar massas fusiformes ou papilíferas. Fonte: acervo dos autores.

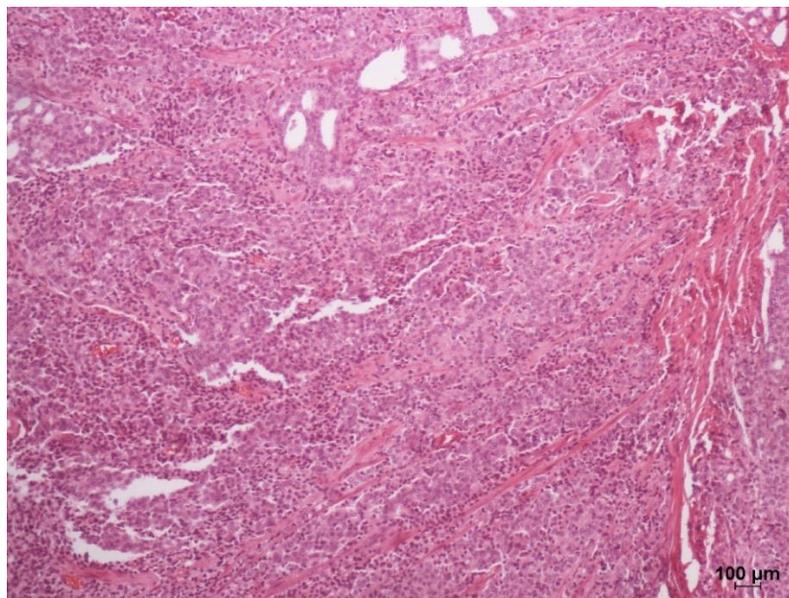


FIGURA 15. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 32. (100x). Trata-se de um Gleason 5+4. Fonte: acervo dos autores.

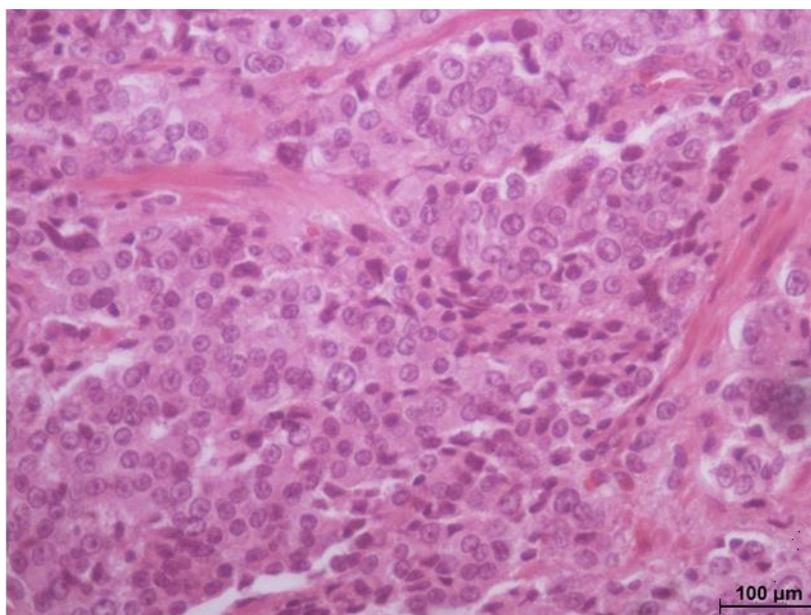


FIGURA 16. Hematoxilina-Eosina em tecido prostático neoplásico no doente número 32. (400x). Nota-se um tumor anaplásico, onde células agrupadas em grandes massas sem uma notável diferenciação, exibindo o padrão de crescimento infiltrativo, típico de um Gleason 5+4. Fonte: acervo dos autores.

Nas Figuras 17, 18 e 19 podemos notar, a expressão de colágeno I, colágeno IV e lamina em doentes portadores de CaP.

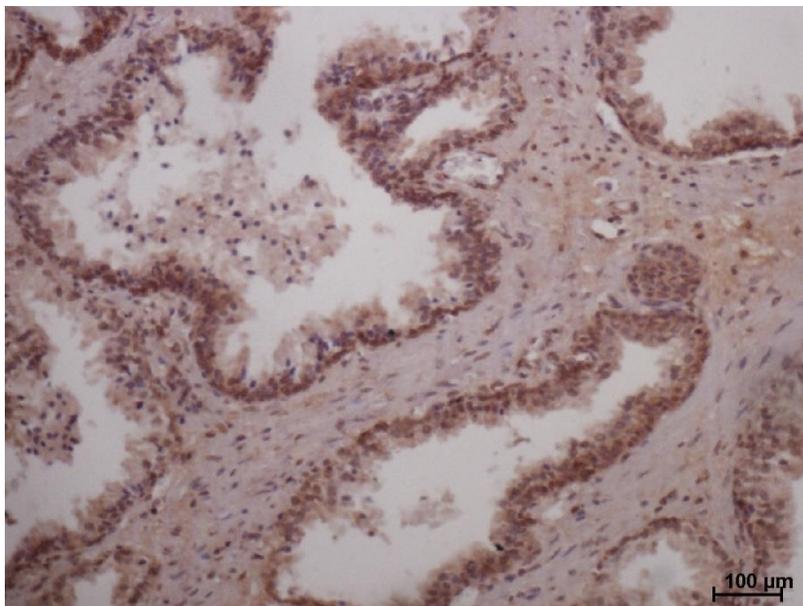


FIGURA 17. Imuno-histoquímica do colágeno do tipo I em tecido prostático neoplásico no doente número 18. (300x). Nota-se uma leve concentração de colágeno no estroma. Fonte: acervo dos autores.

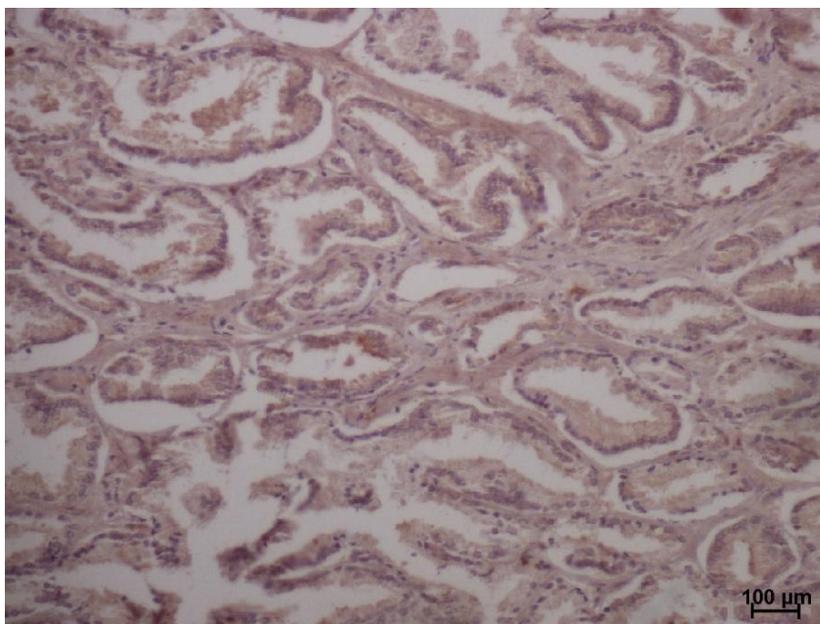


FIGURA 18. Imuno-histoquímica do colágeno IV em tecido prostático neoplásico no doente número 26. (200x). Podemos observar um estroma celular restrito, com grande proliferação de células neoplásicas. Fonte: acervo dos autores.

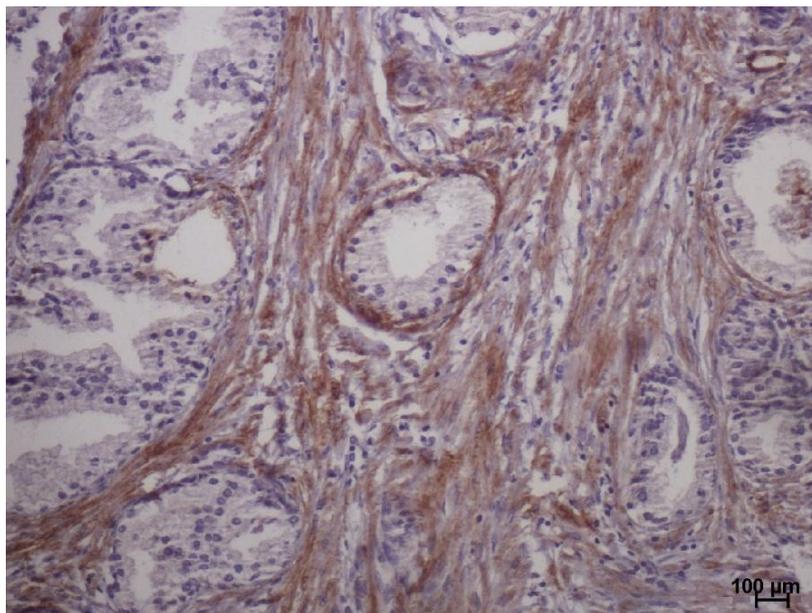


FIGURA 19. Imuno-histoquímica da laminina em tecido prostático neoplásico no doente número 5. (200x). Pode-se observar glândulas com boa diferenciação, pequenas e uniformes. No estroma celular, nota-se uma expressão de laminina robusta. Fonte: acervo dos autores.

5 DISCUSSÃO

Cerca de 1,4 milhão de novos casos de CaP foram diagnosticados em 2022, no mundo, sendo a maior parte em maiores de 65 anos. Apesar de sua alta prevalência e incidência, a porcentagem de doentes que já apresentam metástases quando do diagnóstico inicial é de 4% a 5%, a depender do estágio de desenvolvimento do câncer e de fatores inerentes à cada paciente. A letalidade do CaP é baixa, variando entre 5% e 10% e, o índice de sobrevida em 5 anos é de 99% para os pacientes com doença em estágio inicial e 66% para aqueles que possuem doença em estágio avançado (WHO,2023) .

A resposta ao tratamento é determinada por múltiplos fatores. Geralmente, ela tende a ser menos favorável naqueles enfermos que apresentam grau de Gleason elevados (8, 9 ou 10), estadiamento avançado, níveis elevados de PSA, nos tumores que invadem a cápsula prostática, comprometimento metastático linfonodal, metástases ósseas ou para outros órgãos (fígado, pulmão), idade avançada, histórico familiar e naqueles enfermos que apresentam pouca resposta inicial ao tratamento inicial. Apesar dos progressos terapêuticos registrados nas últimas décadas, lidar com o tratamento do câncer de próstata em estágio metastático continua a ser um desafio significativo (SBU, 2018).

Nem todos os mecanismos que fazem uma metástase se iniciar são claramente conhecidos. Sabe-se que a célula precisa se desprender do sítio tumoral primário, transformando o epitélio normal num tecido mesenquimal de transição (FIDLER, 2003). Nesse contexto, o colágeno I, IV e a laminina, por serem importantes componentes da MEC, podem estar envolvidos nesse processo.

A idade média do diagnóstico do CaP no mundo é de 66 anos, enquanto no Brasil é de 64 anos. (SBU, 2018). A idade emerge como um dos principais fatores de risco associados ao surgimento do câncer de próstata. Conforme os homens envelhecem, observa-se um aumento proporcional no risco de desenvolver câncer de próstata. Esses dados foram semelhantes ao presente estudo, onde a média idade foi de $63,5 \pm 1,8$ anos.

Em 2022, Chou et al., afirmou que doentes com PSA acima de 10 ng/dl tem risco de mais de 50% de ter CaP, enquanto pacientes com PSA entre 4-10 ng/dl tem uma chance de 25% de possuírem a doença. Steffen et al., 2018, em seu trabalho de rastreamento populacional encontrou a média de diagnóstico de 10,34 ng/dl, dados próximos ao de nosso estudo. O prognóstico desses pacientes está diretamente ligado ao PSA do diagnóstico, como descrito por Kordan et al., 2009. No trabalho, os autores mostraram que numa avaliação de 1.764 pacientes

portadores de CaP que foram submetidos a prostatectomia radical, apresentavam um pior prognóstico os pacientes que apresentavam o maior PSA no diagnóstico, com risco relativo de 1,03 (1,00-1,06; p-valor = 0,029).

Quanto ao grau de Gleason, no presente estudo, a maior parte dos doentes possuía, no espécime cirúrgico examinado neoplasias classificadas com 3+3 (46,3%). Esses achados são semelhantes aos encontrados por Cambruzzi et al. (2010), onde os autores pesquisaram a relação entre o escore de Gleason e os fatores prognósticos no adenocarcinoma de próstata. Verificaram que na amostra estudada, 46,61% dos doentes possuíam o grau de Gleason 6. Existe uma relação direta entre o prognóstico e a sobrevida livre de doença com o Grau de Gleason (SEHN, 2018).

Em nosso estudo, quando avaliamos o grau histológico Gleason em relação ao conteúdo das proteínas consideradas, verificou-se que ocorria uma correlação negativa tanto com colágeno quanto laminina. Esses achados mostram que, quanto maior o valor do colágeno e da laminina, menor será o valor do grau histológico do Gleason total e vice-versa. A maior correlação encontrada foi quando se analisou o conteúdo tecidual de laminina. Do melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo mensurou, com métodos objetivos de análise, o conteúdo das principais proteínas constituintes da MEC no CaP, o que torna nosso trabalho único. A quantificação tecidual dessas proteínas com um sistema de análise de imagem assistida por computador permite determinar de forma mais precisa o conteúdo tecidual dessas proteínas possibilitando uma maior precisão.

Apesar de não ter estudado apenas pacientes com CaP, o estudo conduzido por Duarte et al. (2012), analisou 33 doentes submetidos a prostatovesiculectomia radical, comparando com enfermos submetidos a prostatectomia por causas benignas, como a HPB. Os autores encontraram uma diferença significativa entre as amostras dos pacientes com CaP, demonstrando que havia redução da expressão do colágeno tipo I em todos os doentes com adenocarcinoma da próstata, independente do grau histológico de Gleason.

Em nosso trabalho, também comparamos, através de análise bivariada, cada grau de Gleason com a expressão das proteínas estudadas. Excluiu-se da comparação os pacientes portadores do grau histológico de Gleason 8, pelo fato de que neste grupo haviam apenas dois doentes, o que não possibilitaria uma análise fidedigna. Dos resultados encontrados, todos apresentavam significância estatística, demonstrando que quanto maior o Gleason, menor a expressão de colágeno do tipo I, tanto na análise de três grupos (Gleason 6, 7 e 9) como na análise de quatro grupos (Gleason 6, 7A, 7B e 9).

Ainda na expressão de colágeno I, para determinar com precisão entre quais grupos ocorre essa diferença, utilizamos a Comparação Múltipla de Tukey e demonstramos que existe uma diferença significativa na comparação entre os grupos Gleason 6 comparado ao Gleason 9 e no grupo de Gleason 7 comparado aos de Gleason 9. Por último, quando comparamos a expressão de colágeno do tipo I com as comorbidades pré-existentes (HAS, DM, etilismo e tabagismo), existe significância estatística na comparação apenas de etilismo para colágeno I, porém esse dado não nos permite trazer relações de causa e efeito.

Os estudos que abordavam esse tema, apesar de não quantificarem a expressão de colágeno objetivamente, demonstraram que a menor quantidade de colágeno do tipo I em tumores de grau de Gleason ≥ 8 pode levar à diminuição do sustento nutricional celular e, portanto, explicar o aumento de necrose tecidual de alto grau (NORRIS et al., 2020). Os autores também reforçam que o CaP de alto grau está associado à redução da resistência estrutural, aumento da celularidade, diminuição da MEC e aumento da friabilidade, o qual confirma a grande depleção de colágeno tecidual, particularmente na MEC.

Com os resultados apresentados, podemos supor que a perda expressão de colágeno do tipo I em pacientes portadores de CaP, poderia ser uma explicação plausível para a maior possibilidade de migração dessas células para o interior de vasos sanguíneos e linfáticos, aumentando a chance de metástases e, sem dúvidas, contribuindo para um pior prognóstico e desfecho clínico. Todavia, essa hipótese ainda merece investigação mais detalhada com estudo que avalie um maior número de doentes.

Discorrendo a respeito do colágeno tipo IV, Ma et al. (2020), descreveram que ocorria uma perda da expressão tecidual do colágeno do tipo IV em tecidos prostáticos neoplásicos, quando comparados aos tecidos saudáveis. Os autores sugerem que esse tipo de colágeno pode ser visto como uma proteína supressora tumoral, podendo ser um fator de proteção contra invasão e migração de células tumorais prostática. Contudo, é importante destacar que os autores apenas analisaram a presença do colágeno do tipo IV de uma maneira subjetiva, não utilizando nenhum método de análise que possibilitasse a medida do conteúdo da proteína de uma maneira mais precisa.

Já Podgorski et al. (2005), sugerem que a atividade proteolítica do CaP é maior no colágeno tipo IV quando comparado ao colágeno tipo I. Esses achados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo, uma vez que a expressão de colágeno IV foi menor que a de colágeno I nos pacientes com CaP.

Como a medida objetiva do conteúdo tecidual de colágeno ainda não foi realizada na literatura, dado exclusivo do nosso trabalho, não pudemos confrontar os valores encontrados com outras pesquisas. No trabalho de Calaluce et al. (2001), os autores demonstraram que existe perda da expressão tecidual de laminina nos tecidos neoplásicos de portadores de CaP, sem quantificar seu conteúdo. O artigo supõe que essa alteração ocorra, provavelmente, por um mecanismo de microarranjo de cDNA responsável pela síntese da proteína.

Em nosso trabalho, para o colágeno IV obtivemos, de forma objetiva, uma correlação negativa entre a expressão de colágeno do tipo IV e o Grau de Gleason, com significância estatística. Quando comparamos os grupos de Gleason aos pares, para determinar entre quais deles, especificamente, ocorre essa diferença, encontramos significância estatística apenas da comparação do grupo 6 de Gleason com o grupo 9. Por último, comparamos com as comorbidades e os fatores de risco com o colágeno IV, porém não encontramos significância estatística nessas comparações.

Esses achados estão de acordo com os resultados encontrados por outros autores. Sameni et al. (2008) e MA et al. (2020), também verificaram que ocorre redução do colágeno do tipo IV na MEC. Essa redução aumentava a chance de invasão tecidual e diminuição da adesão intercelular das células neoplásicas possibilitando, pelo menos do ponto de vista teórico, maior chance de metástases a distância. Dessa forma, os autores propuseram que o maior conteúdo tecidual de colágeno tipo IV poderia estar relacionado com a proteção contra a infiltração tecidual e migração de células neoplásicas a distância nos portadores de CaP. Outros autores acrescentaram ainda, que as MEC com maior concentração de colágeno tipo IV cursam com maior adesão celular e menor incidência de metástase linfonodal (DONALD et al., 1998).

Na contramão a esses trabalhos, Varisli (2013), apesar de demonstrar que o CaP está relacionado à menor expressão do gene que sintetiza o colágeno tipo IV, não encontrou correlação com o grau histológico de Gleason ou com a recidiva da doença. Cabe destacar que este autor não avaliou a presença tecidual da proteína e sim, apenas, o estado de expressão do gene responsável pela transcrição da proteína o que não permite avaliar se nos tumores mais indiferenciados, fenômenos pós-transcricionais possam ser os responsáveis pelo menor conteúdo tecidual da proteína.

Apesar de não encontrarmos uma correlação entre comorbidades clínicas e fatores de risco correlacionando-as com a expressão de colágeno IV, conseguimos demonstrar a correlação negativa entre o grau de Gleason e o colágeno do tipo IV, o que nos leva a supor, que essa proteína, poderia ser usada como um marcador prognóstico da doença, uma vez que já é sabido

e amplamente difundido que quanto maior o Gleason, pior desfecho clínico e maior risco de metástases.

Com relação a expressão de laminina em nossa análise, verificou-se uma correlação negativa entre a expressão de laminina e o Grau de Gleason, com significância estatística. Na análise comparativa pareada entre os grupos, houve significância estatística na comparação do Grupos de Gleason 6 com o 7, 7A ou com o 9 e do Gleason 7A com o Gleason 7B. Comparando a expressão de laminina com as Comorbidades, não houve significância estatística nessas comparações. Também não encontramos na literatura trabalhos que fizesse essas comparações.

Em concordância o presente estudo, Luthold et al., (2022), demonstraram que a perda da expressão tecidual de laminina na membrana basal prostática era inversamente proporcional ao grau de diferenciação dos tumores, ou seja, tumores bem diferenciados (Gleason 2-4) mostraram perda definitiva leve de laminina na membrana basal prostática. O estudo também mostrou que os tumores pouco diferenciados (Gleason soma 8-10) cursavam com perda generalizada de expressão da laminina. Os tumores classificados nos graus intermediários (Gleason 5-7) apresentavam graus intermediários de perda de laminina.

Apesar de não quantificarem a expressão, dado único do nosso trabalho, o estudo de Shimojo et al. (2011) utilizou um marcador para avaliar a expressão de laminina e a correlação com o grau histológico de Gleason. Verificaram que quanto menor a expressão de laminina maior era o grau de Gleason da peça e, por consequência, menos diferenciado era o tumor. Dubik e Mai (2020) também descreveram descontinuidade da expressão da laminina na membrana basal nos tumores com alto grau histológico.

Assim como o colágeno tipo I e o colágeno tipo IV, a laminina também apresentou uma correlação negativa com o grau de Gleason, com significância estatística. Esse fato, nos leva a crer sobre seu papel relevante como um marcador de pior prognóstico do CaP. É evidente que, para comprovar essa hipótese, necessitaríamos uma maior amostra e um maior seguimento clínico desses pacientes.

Como referido no capítulo de Introdução deste estudo existem vários fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do CaP. Os principais fatores incluem: histórico familiar, idade e obesidade. Fatores como etilismo, tabagismo, HAS e DM, ainda não tem correlação bem estabelecida com o adenocarcinoma da próstata (INCA, 2019), dessa forma, apesar do etilismo ser correlacionado com uma maior expressão de colágeno I, esse dado não nos permite fazer nenhuma correlação clínica.

É relevante notar que o presente estudo possui algumas limitações metodológicas. Ele se configura como um estudo transversal retrospectivo, no qual os pacientes foram incluídos de

maneira progressiva. Não se obteve equidade na seleção de um número equitativo de doentes com adenocarcinoma de próstata cujos tumores fossem Gleason 6, 7, 8 e 9. Contudo, na prática clínica, a maioria dos doentes tratados possuem grau de Gleason, semelhante ao que foi encontrado no presente estudo. Vale ressaltar que muitos pacientes com tumores iniciais que não tenham um bom status performance ou simplesmente não desejam operar, são passíveis de serem encaminhados para radioterapia, a qual também possui resultados oncológicos satisfatórios, um dos fatores que limita a amostra.

Outra limitação surge em virtude do número de pacientes incluídos no estudo. Apesar da seleção inicial de 115 pacientes, a ausência de dados clínicos e laboratoriais nos registros médicos resultou na exclusão de 25 pacientes. Esse desafio destaca a importância da implementação de bases eletrônicas na prática clínica para armazenar sistematicamente todos os dados coletados. Além disso, reforça a necessidade de conscientização dos profissionais de saúde, incluindo médicos assistentes, sobre a importância do preenchimento minucioso dos prontuários médicos.

Outro ponto limitante deste estudo em relação à coleta de dados nos prontuários está relacionado às variáveis clínicas de tabagismo e etilismo. Dado o caráter retrospectivo do estudo baseado nos registros médicos, muitas vezes essas informações não estavam devidamente especificadas. No caso do tabagismo, embora seja reconhecido como um fator de risco, não foi possível quantificar a carga tabágica. Quanto ao etilismo, não houve quantificação ou especificação da bebida consumida; apenas foi registrada a informação positiva ou negativa em relação ao consumo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo, considerando o conteúdo e expressão tecidual de colágeno I, IV e laminina na matriz extracelular em portadores de adenocarcinoma de próstata, permitiram concluir que:

- A expressão média de colágeno I na amostra de portadores de adenocarcinoma de próstata foi de $7,16 \pm 1,03$ pixels/campo. Na mensuração do colágeno tipo IV, a média foi de $3,44 \pm 0,61$ pixels/campo e, na mensuração da laminina, obtivemos uma média de $5,19 \pm 0,79$ pixels/campo.
- O Gleason total tem correlação negativa tanto com colágeno quanto laminina.
- A Idade não tem relação estatística nem com o conteúdo de colágeno e laminina.
- Dentre as doenças associadas e hábitos de vida, somente existe significância estatística na comparação de etilismo para colágeno I. Para colágeno IV e laminina, não se obteve significância estatísticas com as variáveis clínicas analisadas.

REFERÊNCIAS

1. ALBERTS, B.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, L.; WALTER, P. **ESSENTIAL CELL BIOLOGY**. 5. ed. New York: W. W. Norton & Company, 2019. 865 p.
2. ANJOS, A. R. DOS.; SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 3, p. 404-412, 2000.
3. BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos Envolvidos Na Cicatrização: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
4. BRAGA, S. F. M.; SILVA, R. P. D, GERRA JUNIOR, A. A.; CHERCHIGLIA, M. L. Prostate Cancer Survival And Mortality According To A 13-Year Retrospective Cohort Study In Brazil: Competing-Risk Analysis. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 24, p. 210006, 2021.
5. BRUM, I. S.; SPRITZER, P. M.; BRENTANI, M. M.. Biologia Molecular Das Neoplasias De Próstata. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 5, p. 797–804, out. 2005.
6. BURNS-COX, N. ; AVERY, N. C.; GINGEL, N. C.; BAILEY, A. J. Changes In Collagen Metabolism In Prostate Cancer: A Host Response That May Alter Progression. **The journal of urology**, v. 166, n. 5, p. 1698–1701, 2001.
7. CALALUCE, R.; KUNKEL, M. W.; WATTS, G. S. Laminin-5-Mediated Gene Expression In Human Prostate Carcinoma Cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 119–129, 2001.
8. CAMBRUZZI, E.; ZETTLER, C. G.; PEGAS, K. L.; TEIXEIRA, S. L. Relação Entre Escore De Gleason E Fatores Prognósticos No Adenocarcinoma Acinar De Próstata. **Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial**, v. , n. 1, p. 61-68, fev. 2010.
9. CAMERON, M. D. ; SCHMIDT, E. E.; KERKVLIT, N. Temporal Progression Of Metastasis In Lung: Cell Survival Dormancy, And Location Dependence Of Metastatic Inefficiency. **Cancer Research**, n. 9, p. 2541–2546, 2000.
10. CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Multitasking In Tumor Progression: Signaling Functions Of Cell Adhesion Molecules. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1014, n. 1, p. 58–66, 2004.
11. CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination And Growth Of Cancer Cells In Metastatic Sites: Metastasis. **Nature reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–572, 2002.

12. CHOU, R.; GRIFFIN, J.; CHENEY, T. Management Of Clinically Localized Prostate Cancer: A Systematic Evidence Review. **Pacific Northwest Evidence-Based Practice**, v. 23, n. 2, p. 150-162, 2022.
13. COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell: A molecular approach**. 1. ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, 2015. 1150 p.
14. CRUZ, M. A. E.; FERREIRA, C. R.; NOGUEIRA, L. F. B.; ANDRILLI, L. H. S.; MACEDO, J. N. M. Aspectos Químicos da Biomineralização Óssea. **Química Nova**, v. 45, n. 5, p. 578-593, 2022.
15. DONALD, C. D.; MONTGOMERY, D. E.; EMMETT, N.; COOKE, D. B. Invasive Potential And Substrate Dependence Of Attachment In The Dunning R-3327 Rat Prostate Adenocarcinoma Model. **Invasion & Metastasis**, v. 18, n. 4, p. 165–175, 1998.
16. DREYFUSS, J. L.; OLIVEIRA, J. S. R.. Matriz extracelular e enzimas degradatórias na hematopoese e doenças onco-hematológicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 398–405, 2008.
17. DUARTE, A. H.; COLLI, S.; ALVES-PEREIRA, J. L.; MARTINS, M. P.; SAMPAIO, F. J. B.; RAMOS, C. F. Collagen I And III And Metalloproteinase Gene And Protein Expression In Prostate Cancer In Relation To Gleason Score. **International Brazilian Journal Of Urology**. v. 38, n. 3, p. 341–54, 2012.
18. DUBIK, N.; MAI, S. Lamin A/C: Function In Normal And Tumor Cells. **Cancers**, v. 12, n. 12, p. 3688, 2020.
19. EPSTEIN, J. I.; ALLSBROOK, W.C.; AMIM, M.B.; EGEVAD, L. L. ISUP Grading Comittee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 9, p.1228-1242, 2005.
20. FELDMAN, G. J.; MULLIN, J. M.; RYAN, M. P. Occludin: Structure Function and regulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 883–917, 2005.
21. FIDLER, I. J. The Pathogenesis Of Cancer Metastasis: The ‘Seed And Soil’ Hypothesis Revisted. **Nat Rev Cancer**, n. 6, p. 453–458, 2003.
22. GOMES, R.; REBELLO, L. E. F.; ARAUJO, F. C.; NASCIMENTO, E. F.; A Prevenção Do Câncer De Próstata: Uma Revisão Da Literatura. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 235–246, 2008.
23. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer De Próstata**. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 1 de maio de 2023.

24. JOAQUIM, L. M.; EL-HANI, C. N. A Genética Em Transformação: Crise E Revisão Do Conceito De Gene. **Scientiae Studia**, v. 8, n. 1, p. 93–128, 2010.
25. KORDAN, Y.; CHANG, S. S.; SALEM, S.; COKSON, M. S.; CLARK, P. E.; DAVIS, R.; HERRELL, S. D.; BAUMGARTNER, R.; PHILLIPS, S.; SMITH JR, J. A.; BAROCAS, D. A. Pathological Stage T2 Subgroups To Predict Biochemical Recurrence After Prostatectomy. **The Journal Of Urology**, v. 182, n. 5, p. 2291–2295, 2009.
26. KORKES, F.; SMAIDI, K.; TIMOTEO, F.; GLINA, S. Recommendations For Prostate Cancer Diagnosis And Treatment During COVID-19 Outbreak Were Not Followed In Brazil. **International Brazilian Journal Of Urology**, v. 48, n. 4, p. 712–718, 2022.
27. LITWIN, M. S.; TAN, H.-J. The Diagnosis And Treatment Of Prostate Cancer: A Review: A Review. **JAMA: The Journal Of The American Medical Association**, v. 317, n. 24, p. 2532–2542, 2017.
28. LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; **MOLECULAR CELL BIOLOGY**. 7. ed. New York: WH Freeman, 2013. 732 p.
29. LUTHOLD, C.; HALLAL, T.; LABBÉ, D. P.; BORDELEAU, F. The Extracellular Matrix Stiffening: A Trigger Of Prostate Cancer Progression And Castration Resistance? **Cancers**, v. 14, n. 12, 2022.
30. MA, J. B.; BAI, J. Y.; ZHANG, H. B. ; GU, L. ; HE, D. ; GUO, P. Downregulation Of *Collagen α 6 β 1* Associated With Prostate Cancer Progression And Metastasis. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, v. 24, n. 7, p. 399–408, 2020.
31. MARTINEZ, C. A. R. ; KADRI, C. J. ; KANNO, D. T. ; ALVES, A. J. T.; COY, C. S. R.; PEREIRA, J. A. Claudin-3 And Occludin Content In The Glands Of Colonic Mucosa Devoid From Fecal Stream Submitted To Topical Intervention With Oil Extract Of Curcuma Longa. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 65–73, 2017.
32. MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. A Laminina Atua Na Morfogênese Dos Tecidos. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**, v. 20, n. 1, p. 255-284, 2004.
33. MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos Estruturais Da Membrana Eritrocitária. **Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.
34. NORRIS, J.M.; CARMONA, L.M.; BOTT, S. R. J.; BROWN, L. C.; BURNS-COX. N.; DUDDERIDGE, T.; BOSAILY A. E.; FRANGOU, E.; FREEMAN, A.; GHEI, M.; HENDERSON, A.; HINDLEY, R. G.; KAPLAN, R. S.; KIRKHAM, A.; OLDROYD, R.; PARKER. C.; PERSAD, R.; PUNWANI, S.; ROSARIO; D. J.; SHERGILL, I. S.; STAVRINIDES, V.; WINKLER, M.; WHITAKER, H. C.; AHMED, H.U.; EMBERTON, M. What Type Of Prostate Cancer Is Systematically Overlooked By Multiparametric Magnetic

- Resonance Imaging? An Analysis From The PROMIS Cohort. **European Urology**, v. 78, n. 2, p. 163–170, 2020.
35. PINHEIRO, R. M. DE S.; ECHALAR, A. D. L. F.; QUEIROZ, J. R. DE O. Conceito de Célula em Livros Didáticos de Biologia: Ciência Aproblemática e A-Histórica. **Ciência & Educação**, v. 27, p. e21010, 2021.
36. PODGORSKI, I.; LINEBAUGH, B.E.; SAMENI. M.; JEDESZKO. C.; BHAGAT. S.; CHER, M.L.; SLOANE, B.F. Bone Microenvironment Modulates Expression And Activity Of Cathepsin B In Prostate Cancer. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 7, n. 3, p. 207–223, 2005.
37. RASMUSSEN, D. G. K.; Karsdal, M. A. Biochemistry Of Collagens, Laminins And Elastin. **Academic Press**, v.15, n.3, p. 163-196, 2016.
38. REDMOND, C.E.; HEALY, G.M.; FLEMING, H.; MCCANN, J. W.; HEFFERNAN, E. J. The Integration of Active Learning Teaching Strategies Into a Radiology Rotation for Medical Students Improves Radiological Interpretation Skills and Attitudes Toward Radiology. **Current Problems in Diagnostic Radiology**, v. 29, n. 6, p. 386-391, 2020.
39. SAMENI, M.; DPSESCU.; YAMADA, K. M.; SLOANE, B. F.; MEDVED, D. C. Functional Live-Cell Imaging Demonstrates That Beta1-Integrin Promotes Type IV Collagen Degradation By Breast And Prostate Cancer Cells. **Mol Imaging**, v. 7, n. 5, p. 199–213, 2008.
40. SEHN, J. K. Prostate Cancer Pathology: Recent Updates And Controversies. **Missouri Medicine**, v. 115, n. 2, p. 151–155, 2018.
41. SHIMOJO, H.; KOBAYASHI, M.; KAMIGAITO, T.; SHIMOJO. Y.; FUKUDA. M.; NAKAYAMA, J. Reduced Glycosylation Of A-Dystroglycans On Carcinoma Cells Contributes To Formation Of Highly Infiltrative Histological Patterns In Prostate Cancer: Reduced Glycosylation Of A-Dystroglycans. **The Prostate**, v. 71, n. 11, p. 1151–1157, 2011.
42. Sociedade Brasileira de Urologia. **Câncer de Próstata**. Disponível em: <<https://sbu-sp.org.br/publico/cancer-de-prostata-3/>>. Acesso em: 3 de maio de 2023.
43. SOUZA, L. F. P. ; SOUZA, V. F. ; SILVA, L. D. G. ; SANTOS, J. N. ; REIS, S. R. Expressão Da Laminina Na Membrana Basal Em Carcinoma Escamocelular Oral. **Revista Brasileira De Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 768–774, 2007.
44. STEFFEN, R. E. ; TRAJMAN, A.; SANTOS, M.; CAETANO, R. Rastreamento Populacional Para O Câncer De Próstata: Mais Riscos Que Benefícios. **Physis: Revista De Saúde Coletiva**, v. 28, n. 2, p. e280209, 2018.

45. STEWART, D. A.; COOPER, C. R.; SIKES, R. A. Changes In Extracellular Matrix (ECM) And ECM-Associated Proteins In The Metastatic Progression Of Prostate Cancer. **Reproductive Biology And Endocrinology: RB&E**, v. 2, n. 1, p. 2, 2004
46. VAN LEENDERS, G. J. L. H.; VAN DER KWAST, T. H.; GRIGNON, D. J.; EVANS, A. J.; KRISTIANSEN, G.; KWELDAM, C. F.; LITJENS, G.; MCKENNEY, J. K.; MELAMED, J.; MOTTET, N.; PANER, G.P.; SAMARATUNGA, H.; SCHOOTS, I. G.; SIMKO, J.P.; TSUZUKI, T.; VARMA, M.; WARREN, AY.; WHEELER, T. M.; WILLIAMSON, S. R.; ICZKOWSKI, K. A. The 2019 International Society Of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference On Grading Of Prostatic Carcinoma. **The American Journal Of Surgical Pathology**, v. 44, n. 8, p. e87–e99, 2020.
47. VARISLI, L. Identification Of New Genes Downregulated In Prostate Cancer And Investigation Of Their Effects On Prognosis. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 7, p. 562–566, 2013.
48. VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno Na Cartilagem Osteoartrótica. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 43, n. 3, p. 160–166, 2003.
49. WANG, G.; ZHAO, D.; SPRING, D. J.; DEPINHO, R. A. Genetics And Biology Of Prostate Cancer. **Genes & Development**, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018.
50. World Health Organization. **Guide To Early Cancer Diagnosis**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241511940/>>. Acesso em: 20 de junho de 2023.
51. YING, M.; MAO, J.; SHENG, L.; WU, H.; BAI, G.; ZHONG, Z.; PAN, Z.; Biomarkers for Prostate Cancer Bone Metastasis Detection and Prediction. **Journal Of Personalized Medicina**. v. 13, n. 5, p. 705, 2023.

ANEXOS

ANEXO I . Aprovação na comissão de ética e pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONTEÚDO E EXPRESSÃO TECIDUAL DE COLÁGENO E INTEGRINAS NA MATRIZ EXTRACELULAR EM PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DA

Pesquisador: Igor Arantes de Oliveira Góes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48448921.1.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.823.523

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho visa analisar 50 prontuários e blocos de parafinas de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma da próstata, tratados cirurgicamente por prostatovesiculectomia radical em oncologia, no HUSF, entre 2015 e 2020. As variáveis a serem estudadas incluem: idade, etnia, hábitos de vida, doenças associadas, dados laboratoriais, como PSA, exames de imagem, presença de metástases, resultado anatomopatológico, grau de diferenciação do tumor, subtipo histológico e sobrevida do paciente neste período. Os critérios de inclusão estabelecidos para avaliação dos pacientes são presença de adenocarcinoma de próstata, independente do grau de diferenciação, e de seu estadiamento em pacientes acima de 18 anos. Todos os

pacientes deverão ter assinado o TCLE. Serão incluídos apenas pacientes que foram operados no HUSF no período de 01 de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2020. Os critérios de exclusão incluem menores de 18 anos, com outras neoplasias malignas de próstata que não seja o tipo adenocarcinoma, doentes que apresentem uma segunda neoplasia associada, população indígena, e pacientes que faltem dados em prontuário

clínico ou das variáveis consideradas para o presente estudo no exame anátomo-patológico.

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



Continuação do Parecer: 4.823.523

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o conteúdo e a expressão tecidual de colágeno tipo I, III e IV e das integrinas na matriz extracelular em portadores de adenocarcinoma da próstata.

Objetivo Secundário:

I – Correlacionar o conteúdo de colágeno tipo I, III, IV e integrinas, presentes na matriz extracelular de portadores de câncer de próstata correlacionando com metástases;

II – Correlacionar o conteúdo de colágeno tipo I, III, IV e integrinas, presentes na matriz extracelular de portadores de câncer de próstata correlacionando com desfechos clínicos;

III - Correlacionar o conteúdo de colágeno tipo I, III, IV e integrinas, presentes na matriz extracelular de portadores de câncer de próstata correlacionando com a classificação de Gleason

IV - Correlacionar o conteúdo de colágeno tipo I, III, IV e integrinas, presentes na matriz extracelular de portadores de câncer de próstata correlacionando com características clínicas do paciente como idade, doenças associadas e hábitos de vida, como o etilismo e tabagismo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esse trabalho não apresenta riscos para o paciente, pois ele será feito exclusivamente com a revisão de prontuários médicos e análise de blocos de parafinas de doentes já submetidos a tratamento cirúrgico prévio para o seu câncer de próstata no HUSF.

Benefícios:

O melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na disseminação do câncer de próstata, pode contribuir para um melhor entendimento da doença

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto visa encontrar correlações inéditas entre o conteúdo de expressão tecidual das proteínas Colágeno Tipo I, III, IV e integrinas, e as metástases do tumor de próstata, assim como correlação entre grau de Gleason e desfechos clínicos.

Esses resultados podem ser importante na identificação de pacientes com maior risco de disseminação metastática do tumor. Para isso serão analisados 50 prontuários e blocos de parafinas de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma da próstata, tratados cirurgicamente por prostatovesicuclectomia radical em oncologia, no HUSF, entre 2015 e 2020. Serão coletados dados nos prontuários destes doentes: idade, etnia, hábitos de vida, doenças associadas, dados laboratoriais, como PSA, exames de imagem, presença de metástases, anatomopatológico como grau de diferenciação do tumor, subtipo histológico e sobrevida do paciente neste período. Para a

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 4.823.523

confeção das lâminas histológicas destinados ao estudo imuno-histoquímico para a pesquisa das proteínas colágeno tipo I, III e IV e integrina, serão utilizadas duplicatas dos blocos de parafina de cada um dos doentes selecionados para o presente estudo. Essas duplicatas serão doadas, após a autorização do comitê de ética, pelo Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica (CEDAP) ao Laboratório de Investigação Médica da Universidade São Francisco (LIM-USF). As laminas obtidas serão submetidas à técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE), Imunohistoquímica e Morfometria Computadorizada.

Critério de Inclusão: Os critérios de inclusão estabelecidos para avaliação dos pacientes são presença de adenocarcinoma de próstata, independente do grau de diferenciação, e de seu estadiamento em pacientes acima de 18 anos. Todos os pacientes deverão ter assinado o TCLE. Serão incluídos apenas pacientes que foram operados no HUSF no período de 01 de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2020.

Critério de Exclusão: Os critérios de exclusão neste estudo são aqueles pacientes menores de 18 anos, com outras neoplasias malignas de próstata que não seja o tipo adenocarcinoma, doentes que apresentem uma segunda neoplasia associada, população indígena, e pacientes que faltem dados em prontuário clínico ou das variáveis consideradas para o presente estudo no exame anátomo-patológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos e estão de acordo, todos devidamente assinados .

Recomendações:

Não se aplica neste caso

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado , não foram encontrados óbices éticos

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 01/07/2021, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS. SENDO OBRIGATÓRIO O ENVIO DE RELATÓRIOS DE SEIS EM SEIS MESES E APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 4.823.523

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1773972.pdf	22/06/2021 12:47:15		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	22/06/2021 12:45:29	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	22/06/2021 12:45:14	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Outros	CartaSubmissaoCE.pdf	22/06/2021 12:43:56	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaHUSF.pdf	22/06/2021 12:43:10	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Outros	AutorizacaoUsoBlocosParafina.pdf	22/06/2021 12:42:29	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Outros	BlocosParafina.pdf	22/06/2021 12:41:11	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCUD.pdf	22/06/2021 12:39:42	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Confidencialidade.pdf	22/06/2021 12:39:26	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	22/06/2021 12:39:08	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	22/06/2021 12:38:14	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	22/06/2021 12:36:16	Igor Arantes de Oliveira Góes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 4.823.523

BRAGANCA PAULISTA, 02 de Julho de 2021

Assinado por:
CARLOS EDUARDO PULZ ARAUJO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br

ANEXO II. Autorização para realização da Pesquisa

Bragança Paulista, 21 de junho de 2021

Ao comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco

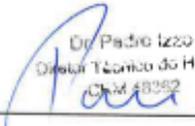
A/c Prof. Dr. Carlos Eduardo Pulz Araújo

Coordenador do CEP – Universidade São Francisco

Autorização para realização de pesquisa

Eu, Pedro Izzo, diretor técnico responsável do Hospital Universitário São Francisco de Assis da providencia de Deus (HUSF), venho por meio desta informar a V.S. que autorizo o pesquisador **Igor Arantes de Oliveira Góes**, aluno do curso de Pós Graduação Strictu Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco a consulta e transcrever dados de prontuário médico sob guarda do serviço médico e estatística (SAME) do HUSF, com o objetivo de desenvolver a pesquisa intitulada "**CONTEÚDO E EXPRESSÃO TECIDUAL DE COLÁGENO E INTEGRINAS NA MATRIZ EXTRACELULAR EM PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DA PRÓSTATA**", sob orientação do **Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez**.

Declaro conhecer e cumprir as resoluções éticas Brasileiras, em especial a resolução CNS 196/96. Esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e do compromisso no resguardo da segurança dos dados coletados e bem-estar dos participantes de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para garantia de tal segurança e bem-estar.


Dr. Pedro Izzo
Diretor Técnico do HUSF
CRM 48352

Assinatura e carimbo do responsável institucional

Dr. Pedro Izzo
Diretor Técnico do HUSF
CRM 48352

ANEXO III. Carta de doação dos blocos de parafina

	CENTRO DE DIAGNÓSTICO EM ANATOMIA PATOLÓGICA
	Dra. HELENICE PIOVESAN CRM 46.356
RUA CORONEL LEME, N° 360 - CENTRO BRAGANÇA PAULISTA - SP - CEP 12.900-340	FONE / FAX: (11) 4032-8979 FONE: (11) 2473-1000 cedaplaboratorio@uol.com.br

CARTA DE DOAÇÃO DOS BLOCOS DE PARAFINA

Declaro para os devidos fins, que com o encerramento das atividades do **Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica (CEDAP)** em Bragança Paulista, foram doadas ao Prof. Carlos Augusto Real Martinez, CPF: 884.072.925-34, Rg:5.568.740-4, CRM 37.663, duplicatas de blocos de parafina de doentes com adenocarcinoma da próstata que estava arquivadas no CEDAP, sob nossa responsabilidade.

A doação dessas duplicatas tem como objetivo permitir ativa a linha de pesquisa sobre câncer de próstata. O CEDAP manterá em seu acervo os blocos originais correspondentes a cada duplicata doada.

As duplicatas dos blocos de parafina doados passarão, a partir dessa data a ter o professor Carlos Augusto Real Martinez como fiel depositário das amostras.

É o que me cumpre declarar



Profa. Helenice Piovesan
Médica Patologista Responsável pelo Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica

CEDAP

ANEXO IV. Carta autorização para o uso dos blocos de parafina**Laboratório de Investigação Médica**

Bragança Paulista, 21 de junho de 2021

CARTÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA O USO DOS BLOCOS DE PARAFINA

Autorizo o **Dr. Igor Arantes de Oliveira Góes**, aluno regular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (PPGSSCS-USF) a utilizar 50 (cinquenta) blocos de parafina de doentes com Adenocarcinoma da próstata doados ao Laboratório de Investigação Médica da Universidade São Francisco (LIM-USF), pelo Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica (CEDAP). Esses blocos de parafina cedidos serão utilizados para confecção de lâminas histológicas necessárias para a realização do Projeto de Pesquisa intitulado **"CONTEÚDO E EXPRESSÃO TECIDUAL DE COLÁGENO E INTEGRINAS NA MATRIZ EXTRACELULAR EM PORTADORES DE ADENOCARCINOMA DA PRÓSTATA"**, que é tema da Dissertação de Mestrado do aluno.



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Professor Responsável pelo Laboratório de Investigação Médica da
Universidade São Francisco